การคัดแยกและการหาสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยแบคทีเรียที่มีความสามารถในในการย่อยสลายไขมัน

Isolation and optimization of the cultural condition of lipase production by lipid-degrading bacteria

ณัฏฐวี ชั่งชัย
จิริสุดา สินธุศิริ

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ปีการศึกษา 2558

ชื่อเรื่อง การคัดแยกและการหาสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน
ผู้วิจัย ณัฏฐวี ชั่งชัย และจิริสุดา สินธุศิริ
สถาบัน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ปีที่พิมพ์ 2560
สถานที่พิมพ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
แหล่งที่เก็บรายงานฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
จำนวนหน้างานวิจัย 72 หน้า
คำสำคัญ แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อ (1) ศึกษาค่าน้ำมันและไขมันในตัวอย่างน้ำเสียจากร้านจำหน่ายอาหาร (2) คัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันจากน้ำเสีย (3) ศึกษาสภาวะเพาะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ และ (4) ศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดค่าน้ำมันและไขมันในน้ำเสียที่มีไขมันสูง แบคทีเรียเป้าหมายถูกคัดแยกจากตัวอย่างน้ำเสียจากถังดักไขมันของร้านอาหารในโรงอาหาร มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ

ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำเสียจากร้านอาหารมีค่าน้ำมันและไขมันในอยู่ในช่วงระหว่าง 2,441– 215,200 มิลลิกรัมต่อลิตร ในงานวิจัยนี้แบคทีเรียเป้าหมาย จำนวน 41 ไอโซเลท ถูกคัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำเสีย โดย 2 ไอโซเลท (2/41, ร้อยละ 4.88) ผ่านการยืนยันบนอาหาร Tributyrin agar 1% ว่าเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน ตั้งชื่อเป็น NJS54 และ NJS72 ค่าดัชนีเอนไซม์และค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของไอโซเลท NJS54 มีค่าเท่ากับ 1.59 $\pm$ 0.14 และ 0.06 $\pm$ 0.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและไอโซเลท NJS72 มีค่าเท่ากับ 1.23 $\pm$ 0.09 และ 0.05 $\pm$ 0.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายไขมันของไอโซเลท NJS54 มีดังนี้ สภาวะเพาะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ การใช้น้ำมันกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนอาหารเพาะเลี้ยงปรับที่พีเอช 6 และระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่ 48 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดเท่ากับ 0.10 $\pm$ 0.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดย 48 ชั่วโมง มีปริมาณเซลล์สูงสุด 9.8×10^7 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ผลการศึกษาการกำจัดค่าน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีไขมันสูง (น้ำมันกากถั่วเหลืองเข้มข้นร้อยละ 1) ของไอโซเลท NJS54 พบว่ามีประสิทธิภาพการกำจัดค่าน้ำมันและไขมันได้สูงสุด คิดเป็นร้อยละ 76.05

Research Title	Isolation and optimization of the cultural condition of lipase production by lipid-degrading bacteria
Researcher	Nuttawee Changchai and Jirisuda Sinthusiri
Institute	Huachiew Chalermprakiet University
Year of Publication	2017
Publisher	Huachiew Chalermprakiet University
Source	Huachiew Chalermprakiet University
No of Pages	72 pages
Keywords	lipid-degrading bacteria
Copyright	Huachiew Chalermprakiet University

ABSTRACT

The objectives of this study were (i) to determine oil and grease in wastewater sample from restaurants (ii) to isolate lipid-degrading bacteria from wastewater (iii) to study optimum cultural condition for lipase production of isolated bacteria, and (iv) to evaluate the oil and grease removal efficiency in high lipid wastewater. The targeted bacteria were isolated from wastewater of restaurant grease traps in the canteen of Huachiew Chalermprakiet University, Samut Prakan Province.

The result of study showed that the range of oil and grease in restaurant wastewater were 2,441 to 215,200 mg/L. In this study, 41 isolates of targeted bacteria were obtained from wastewater samples and two of which (2/4, 4.88%) were approved on Tributyrin agar 1% to lipid-degrading bacteria, which were designated as NJS54 and NJS72. The enzyme index and the lipase activity of isolate NJS54 were 1.59 $\pm$ 0.14 and 0.06 $\pm$ 0.01 unit/ml, and isolate NJS72 were 1.23 $\pm$ 0.09 and 0.05 $\pm$ 0.01 unit/ml. Results of the lipid degradation capability of isolate NJS54 found that optimum cultural conditions were comprised of soybean oil as carbon source, culture medium adjusted to pH6 and incubation period at 48 hours, with maximum lipase activity of 0.10 $\pm$ 0.01 unit/ml. The highest number of cells was found at 48 hours as 9.8×10^7 CFU/ml. In addition to the study of the oil and grease removal efficiency in lipid strength-synthetic wastewater (soybean 1%) by isolate NJS54, the highest removal efficiency was 76.05%.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการดำเนินงานวิจัยจนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ดังนี้ ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย ขอขอบคุณสาขาวิชาอนามัยสิ่งแวดล้อมที่ให้ความอนุเคราะห์แก่คณะผู้วิจัยดำเนินการวิจัยในห้องปฏิบัติการสาขาวิชาอนามัยสิ่งแวดล้อมรวมทั้งอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ รวมทั้งขอขอบคุณร้านจำหน่ายอาหารในโรงอาหารของมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากถังดักไขมัน

ท้ายที่สุดนี้ หากงานวิจัยฉบับนี้มีความดีและก่อให้เกิดประโยชน์ต่อส่วนรวม คณะผู้วิจัยขอมอบความดีทั้งปวงให้แก่ บิดา มารดา ครอบครัว และเพื่อน ที่เป็นกำลังใจแก่คณะผู้วิจัยด้วยดีเสมอมา ตลอดจนอาจารย์ทุกท่านของคณะผู้วิจัยที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ทำให้คณะผู้วิจัยมีความรู้ความสามารถจนประสบความสำเร็จในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ณัฏฐวี ชั่งชัย

จิริสุดา สินธุศิริ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ฆ
สารบัญตาราง	จ
สารบัญแผนภูมิ	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม	
2.1 น้ำมันและไขมัน	5
2.2 น้ำเสียที่มีน้ำมันและไขมันจากร้านอาหาร	12
2.3 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน	16
2.4 การนำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันไปใช้ประโยชน์ด้านการบำบัดน้ำเสีย	25
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	26
2.6 กรอบแนวคิดในการวิจัย	29
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	
3.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง	30
3.2 เครื่องมือที่ใช้เก็บข้อมูล	30
3.3 การเก็บตัวอย่างน้ำเสีย	33
3.4 การดำเนินการวิจัย	34
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล	38

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 ค่าน้ำมันและไขมันในตัวอย่างน้ำเสีย	39
4.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน	39
4.3 สภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของไอโซเลท NJS54	44
4.4 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์	46
บทที่ 5 สรุปอภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการวิจัย	48
5.2 การอภิปรายผลการวิจัย	48
5.3 ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยครั้งต่อไป	53
บรรณานุกรม	55
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง	64
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	66
ภาคผนวก ค ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียจากถังดักไขมัน	70
ประวัติย่อผู้วิจัย	72

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชื่อเรียกตามระบบของกรดไขมันบางชนิด	6
2	ร้อยละของกรดไขมันในน้ำมันพืชบางชนิด	7
3	องค์ประกอบของน้ำมันและไขมันจากร้านอาหาร	13
4	จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส	18
5	พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส	23
6	สารกระตุ้นและสารยับยั้งต่อกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส	24
7	ค่าเฉลี่ยของค่าน้ำมันและไขมันในตัวอย่างน้ำเสีย	39
8	จำนวนแบคทีเรียเป้าหมายที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำเสีย	41
9	จำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันคัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำเสีย	41
10	ค่าน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ผ่านการบำบัดด้วยไอโซเลท NJS54	47

สารบัญแผนภูมิ

แผนภูมิที่		หน้า
1	ค่าดัชนีเอนไซม์ไลเปสของไอโซเลท NJS54 และไอโซเลท NJS72	43
2	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของไอโซเลท NJS54 และไอโซเลท NJS72	43
3	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของไอโซเลท NJS54 ที่ใช้แหล่งคาร์บอนต่างกัน	44
4	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของไอโซเลท NJS54 ที่พีเอชต่างกัน	45
5	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของไอโซเลท NJS54 ที่เวลาเพาะเลี้ยงต่างกัน	46
6	ร้อยละของประสิทธิภาพการกำจัดค่าน้ำมันและไขมันของไอโซเลท NJS54	47

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ปฏิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันระหว่างไตรเอซิลกลีเซอรอลกับแอลกอฮอล์	11
2	กระบวนการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล	12
3	ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ไลเปสกับ TAGs	17
4	กระบวนการสลายไขมัน (Lipid catabolism) ของจุลินทรีย์	17
5	จุดเก็บตัวอย่างน้ำเสียที่มีไขมันสูง	33
6	การวิเคราะห์ค่าน้ำมันและไขมันในตัวอย่างน้ำเสียจากถังดักไขมัน	34
7	แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันบนจานอาหาร SMP1B agar ที่ระดับการเจือจาง 10^{-1} - 10^{-8}	40
8	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียเป้าหมายบนจานอาหาร SMP1B agar	40
9	ลักษณะโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ (แบคทีเรียเป้าหมาย) บนจานอาหาร SMP1B agar	40
10	ลักษณะโคโลนีของไอโซเลท NJS54 และ NJS72 บนจานอาหาร Tributyrin agar 1%	42

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

น้ำมันและไขมันเป็นสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบหลักในน้ำเสียจากชุมชนและโรงงานอุตสาหกรรมที่ก่อมลพิษทางน้ำเป็นอย่างมาก มีผลกระทบต่อแหล่งน้ำ ได้แก่ เป็นอุปสรรคต่อการสังเคราะห์แสงของพืชในแหล่งน้ำ กีดขวางการแพร่กระจายของออกซิเจนจากอากาศลงสู่น้ำ รวมถึงทำให้เกิดสภาพที่ไม่น่าดู สำหรับน้ำเสียจากกิจกรรมประเภทร้านอาหารนั้นพบว่ามีปริมาณน้ำมันและไขมันสูงมาก ตัวอย่างเช่น ร้านอาหารตามสั่ง ร้านก๋วยเตี๋ยว มีค่าน้ำมันและไขมัน เฉลี่ย 7,199.21 - 125,743.50 มิลลิกรัมต่อลิตร(บุญส่ง ไข่เกษ, สุธาสินี อั้งสูงเนิน, จิรา แก้วดำ, และปัญจ์พัชรภร บุญพร้อม, 2554) ปัจจุบันวิธีการกำจัดไขมันและน้ำมันในน้ำเสียมีหลายวิธี ได้แก่ การเติมคลอรีน การเป่าอากาศ การทำให้ลอย (Flotation) การเพิ่มอุณหภูมิ โดยวิธีกำจัดไขมันที่นิยมใช้คือถังดักไขมันที่มีแผ่นขวางอยู่ในบ่อเพื่อดักไขมันไว้ให้ได้ปริมาณมาก เมื่อทิ้งไว้ระยะหนึ่งไขมันจะลอยตัวขึ้นมาสะสมบนผิวน้ำแล้วจึงตักออกไปกำจัด อย่างไรก็ตามเนื่องจากประเทศไทยมีอุณหภูมิสูงไขมันจึงจับตัวช้า (บุญส่งไข่เกษ และคณะ, 2554) จึงทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดไขมันลดลง และน้ำทิ้งที่ออกจากบ่อดักไขมันยังคงมีไขมันและน้ำมันสะสมอยู่ในปริมาณมาก ทั้งนี้ คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาการบำบัดน้ำเสียจากบ่อดักไขมันซึ่งมีค่าน้ำมันและไขมันสูงโดยวิธีทางชีวภาพ (Bioremediation treatment) ด้วยจุลินทรีย์ วิธีนี้กำลังได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายมากขึ้น

Lipolytic microorganisms หรือ Lipid-degrading microorganisms หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน มีทั้งกลุ่มที่ใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน ได้แก่ แบคทีเรีย จีนัส *Psudomonas* และ *Clostridium* ราจีนัส *Penicillium*, *Cladosporium* และ *Aspergillus* เป็นต้น ไขมันเป็นแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์จะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ไลเปส (Lipase enzyme) กลายเป็นกลีเซอรอล กรดไขมัน และน้ำ จุลินทรีย์ที่มีความสามารถย่อยสลายไขมันสามารถย่อยอาหารหรือวัสดุทางอุตสาหกรรมที่มีไขมันได้ ตัวอย่างเช่น เนย ปลา เนื้อสัตว์ พืชน้ำมัน และน้ำมัน (Prokhorov, 1979) จุลินทรีย์เหล่านี้ถูกแยกได้จากสิ่งแวดล้อมทั่วไป เช่น ดินหรือน้ำ ดังเช่นงานวิจัยของ Ruiz, Pastor, and Diaz (2005) คัดแยกจุลินทรีย์ทั้งหมด 724 ไอโซเลท จากดินที่อุดมไปด้วยน้ำมันปาล์มและสารไตรบิวไทรีน (Tributyrin) แบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายไขมันได้ดีคือ *Bacillus* sp. นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียอื่นๆ อีก ได้แก่ *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp., *Acinetobacter* sp., *Escherichia* sp. และรา *Candida* sp., *Rhodotorula* sp. และ *Yarrowia* sp. (Čipinytė, Grigiškis, & Baškys, 2009) อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากสิ่งแวดล้อมมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสน้อยเนื่องจากถูกจำกัดด้วยสารบางชนิดที่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ เช่น กรดไขมันสายยาว การคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงและสามารถย่อยสลายน้ำมันและไขมันได้ดีจึงเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง เป็นอีกแนวทางเลือกหนึ่งในการกำจัดน้ำมันและ

ไขมันในน้ำเสียด้วยด้วยวิธีทางชีวภาพ มีหลายงานวิจัยได้พัฒนาจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปสในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อกำจัดน้ำมันและไขมันในน้ำเสียด้วยกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงขึ้นมา สุรอรรถ ศุภจัตรัส, วีระสิทธิ์ กัลป์ยากฤต, วิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตนา, และศุภพงษ์ ภูวพัฒนะพันธุ์ (2550) ได้คัดแยกจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตะกอนเร่งของโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร และนำมาศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมัน พบว่ามีประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันสูงอยู่ระหว่างร้อยละ 84.10 ถึงร้อยละ 85.76

งานวิจัยนี้จึงได้มุ่งความสนใจไปยังการคัดแยกและการหาสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน โดยมีความคาดหวังนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้ไปใช้ประโยชน์ในการกำจัดน้ำมันและไขมันในน้ำเสียจากถังดักไขมันของร้านจำหน่ายอาหาร เป็นการช่วยสร้างสิ่งแวดล้อมที่ดีให้กับมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ รวมถึงในอนาคตยังสามารถพัฒนาต่อยอดเพื่อใช้ในงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้หลากหลายประเภทอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาค่าน้ำมันและไขมันในตัวอย่างน้ำเสียของร้านจำหน่ายอาหาร

1.2.2 เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการของการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่แยกได้

1.2.3 เพื่อศึกษาสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

1.2.4 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดค่าน้ำมันและไขมันในน้ำเสียที่มีไขมันสูง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้มีรูปแบบการวิจัยเป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research) แบบทดลองในห้องปฏิบัติการ (Laboratory experiment) เพื่อคัดแยกและหาสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันสำหรับบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมันและไขมันปนเปื้อน ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากถังดักไขมันของร้านจำหน่ายอาหารที่ตั้งอยู่ในโรงอาหารมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ และนำมาศึกษาค่าน้ำมันและไขมันในน้ำเสีย และคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันและไขมัน รวมทั้งศึกษาสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ แหล่งคาร์บอนพีเอช และระยะเวลาเพาะเลี้ยง และศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในน้ำเสียสังเคราะห์ ระยะเวลาดำเนินการวิจัย เป็นเวลา 1 ปี ตั้งแต่ เดือนเมษายน พ.ศ. 2559 ถึง เดือนมีนาคม พ.ศ. 2560

1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ

1.4.1 น้ำเสียที่มีไขมันสูง (High lipid-containing wastewater) หมายถึง น้ำเสียจากถังดักไขมันของร้านอาหารที่มีปริมาณน้ำมันและไขมันสูง ในงานวิจัยนี้ คือ น้ำเสียที่มีค่าน้ำมันและไขมันสูงกว่ามาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากอาคารบางประเภทและบางขนาด ตามประกาศกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ซึ่งกำหนดให้ปริมาณน้ำมันและไขมันในน้ำเสียจากร้านจำหน่ายอาหารต้องไม่เกิน 100 มิลลิกรัม/ลิตร

1.4.2แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน (Lipid-degrading bacteria) หมายถึงแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันโดยผลิตเอนไซม์ไลเปสไปย่อยสลายไขมันให้กลายเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ ในงานวิจัยนี้ คือ แบคทีเรียที่แสดงความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันบนจานอาหารทดสอบ Tributyrin agar 1%

1.4.3 เอนไซม์ไลเปส (Lipase enzyme) หมายถึง เอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของไฮโดรเลส มีชื่อเรียกตามระบบว่า กลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (Glycerol ester hydrolase) หรือไตรเอซิลกลีเซอรอลเอซิลไฮโดรเลส (Triacylglycerol acylhydrolase) หมายเลขรหัสเอนไซม์ E.C.3.1.1.3

1.4.4 ดัชนีเอนไซม์ (Enzyme index) หมายถึง ค่าการย่อยสลายน้ำมันและไขมันของจุลินทรีย์ วิเคราะห์ได้จากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีรวมกับขนาดของวงใสที่เกิดรอบโคโลนีบนอาหารทดสอบต่อเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี ในงานวิจัยนี้ คือ ดัชนีเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันบนจานอาหารทดสอบ Tributyrin agar 1%

1.4.5 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (Enzyme activity) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาของสารตั้งต้นหรือสับเตรท (Substrate) 1 ไมโครโมล (µmol) ต่อ 1 นาที ภายใต้สภาวะคือ พีเอชและอุณหภูมิที่คงที่หนึ่งๆ ที่ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้ดีที่สุด มีหน่วยเป็น ยูนิต (Unit, U) ในงานวิจัยนี้ คือ ปริมาณเอนไซม์ไลเปสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรท (p-nitrophenyl palmitate : pNPP) ให้กรดพลามิติกอิสระ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 55 $^{\circ}$C มีหน่วยเป็น ยูนิตต่อมิลลิลิตร (U/ml)

1.4.6 ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันและไขมัน หมายถึง ในงานวิจัยนี้คือ ประสิทธิภาพในการกำจัดค่าน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ในตัวอย่างน้ำเสียที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับค่าน้ำมันและไขมันเริ่มต้น โดยคิดเทียบเป็นค่าร้อยละ

1.4.7 น้ำมันและไขมัน (Oil & Grease : O&G) หมายถึง สารที่มีองค์ประกอบหลักเป็นธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ไม่ละลายน้ำ เมื่ออยู่ในน้ำจะแยกออกจากน้ำ แต่สามารถละลายได้ดีในสารที่เป็นน้ำมัน หรือในตัวทำละลายบางชนิด เช่น แอลกอฮอล์ น้ำมันและไขมันจัดเป็นสารกลุ่มเดียวกันเรียกว่าลิพิด (Lipid) ในงานวิจัยนี้ หมายถึง ค่าน้ำมันและไขมันที่อยู่ในน้ำเสีย วิเคราะห์ด้วยวิธี Soxhlet extraction มีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อลิตร

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

5.1 ทราบถึงปริมาณน้ำมันและไขมันในน้ำเสียจากถังดักไขมันของร้านจำหน่ายอาหารที่ตั้งอยู่ในโรงอาหาร มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการดำเนินการควบคุมการทำงานของถังดักไขมันให้สามารถลดปริมาณน้ำมันและไขมันในน้ำเสียก่อนนำเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสียของมหาวิทยาลัยฯ ต่อไป

5.2 ได้สภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน พีเอช และระยะเวลาการเพาะเลี้ยง เพื่อนำไปเพาะเลี้ยงแบคทีเรียให้สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงขึ้น

5.3 แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้เป็นจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่อาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมของน้ำเสียที่มีน้ำมันและไขมันปนเปื้อนสูงอยู่แล้ว มีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมดังกล่าวได้ดี สามารถนำไปใช้ทดลองบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันสูงโดยมีประสิทธิภาพในการกำจัดน้ำมันและไขมันได้สูง ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการใช้สารเคมี หรือค่าดำเนินการระบบบำบัดน้ำเสียในส่วนที่ต้องกำจัดน้ำมันและไขมัน อีกทั้งจุลินทรีย์เหล่านี้ยังเป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมมีอันตรายน้อยกว่าสารเคมี ปลอดภัยต่อผู้ที่เกี่ยวข้อง

บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรม

2.1 น้ำมันและไขมัน

ไขมันหรือลิพิด (Lipid) คือ สารชีวภาพพื้นฐานของสิ่งมีชีวิตที่สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ เช่น คลอโรฟอร์ม และเมธานอล มีกรดไขมัน (Fatty acids) เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ โดยไขมันจากพืชและสัตว์ส่วนมากมักจะพบกรดไขมันที่มีจำนวนอะตอมคาร์บอน 16 และ 18 อะตอม เช่น Palmitic Oleic Linolenic และ Stearic (Voet, Voet, & Pratt, 2008) ไขมันมีโครงสร้างเป็นไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีขั้วซึ่งจะแสดงคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (Hydrophobicity) และมีผลทำให้ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ ตัวอย่างของไขมัน เช่น กรดไขมัน กลีเซอรอล ขี้ผึ้ง (Wax) โคเลสเตอรอล กรดน้ำดี และวิตามินอี เป็นต้น (มนตรี จุฬาวัฒนฑล, ยงยุทธ ยุทธวงศ์, ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์, สกล พันธ์ยิ้ม, และภิญโญ พานิชพันธ์, 2542)

น้ำมันและไขมัน (Oil and Grease: O & G) เป็นไขมันประเภทหนึ่ง ซึ่งเป็นผลผลิตพลอยได้จากกระบวนการประกอบอาหาร ตามปกติประกอบไปด้วยเศษอาหาร ไขมันสัตว์จากหมู-วัว น้ำมันใช้แล้วทั้งน้ำมันพืชและสัตว์ เนยเหลว เนยแข็งและเนยเทียม น้ำซอสและเครื่องปรุงต่างๆ เป็นต้น น้ำมันและไขมันอาจประกอบไปด้วยสารประกอบที่มีลักษณะเป็นของแข็งหรือของเหลวที่ผสมกันหลายชนิด ขึ้นกับสภาวะอิ่มตัวของสายคาร์บอนของสารประกอบที่เกิดขึ้น (Lewkowltsch, 1922)

2.1.1 องค์ประกอบของน้ำมันและไขมัน

น้ำมันและไขมันประกอบไปด้วยสารประกอบต่างๆ ดังนี้

2.1.1.1 กรดไขมัน (Fatty acids: FAs)

เป็นสารประกอบกลุ่มไฮโดรคาร์บอนสายยาวที่มักอยู่ในรูปเอสเทอร์ (Esterified) ซึ่งมีมากถึง 1,000 ชนิด มีจำนวนอะตอมคาร์บอนอยู่ระหว่าง 8-22 อะตอม มักพบกรดไขมันอิสระที่มีจำนวนอะตอมคาร์บอน 18 อะตอม มากที่สุด ทั้งนี้ ชนิดของกรดไขมันขึ้นกับความยาวของสาย ตำแหน่งคาร์บอน ชนิดของการอิ่มตัวหรือไม่อิ่มตัว และหมู่ที่เพิ่มเติมในสายอะลิฟาติก (Aliphatic chain) สำหรับกรดไขมันที่มาจากอาหารมีประมาณ 20 ชนิด และส่วนใหญ่เป็นชนิดกรดไขมันไม่อิ่มตัวเช่น Palmitic Oleic และ Linoleic acids ซึ่งคิดเป็นมากกว่าร้อยละ 80 ของน้ำมันและไขมันตามธรรมชาติ (Gunstone, 2008; Voet, Voet, & Pratt, 2012) ชนิดของกรดไขมันตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชื่อเรียกตามระบบของกรดไขมันบางชนิด

Structure	Systematic Name	Abbreviation	Shorthand Name
$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	Dedecanoic	lauric	12:0
$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	Tetradecanoic	myristic	14:0
$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	Hexadecanoic	palmitic	16:0
$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_7COOH$	*Z*-9-hexadecenoic	palmitoleic	16:1 9*c*
$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	Octadecanoic	stearic	18:0
$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$	*Z*-9-octadecenoic	oleic	18:1 9*c*
$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_9COOH$	*Z*-11-octadecenoic	*cis*-vaccenic	18:1 11*c*
$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_9COOH$	*E*-11-octadecenoic	vaccenic	18:1 11*t*
$CH_3(CH_2)_3(CH_2CH=CH)_2(CH_2)_7$ COOH	*Z*,*Z*-9,12-octadecadienoic	linoleic (LA)	18:1 9*c*,12*c*
$CH_3(CH_2CH=CH)_3(CH_2)_7COOH$	*Z*,*Z*,*Z*- 9,12,15-octadecatrienoic	α-linolenic (ALA)	18:3 9*c*,12*c*,15*c*
$CH_3(CH_2)_3(CH_2CH=CH)_2(CH_2)_4$ COOH	*Z*,*Z*,*Z*- 6,9,12-octadecatrienoic	γ-linolenic (GLA)	18:3 6*c*,9*c*,12*c*
$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	eicosanoic	arachidic	20:0
$CH_3(CH_2)_3(CH_2CH=CH)_4(CH_2)_3$ COOH	*Z*,*Z*,*Z*,*Z*- 5,8,11,14-eicosatetraenoic	arachidonic (ARA)	20:4 5*c*,8*c*,11*c*, 14*c*
$CH_3(CH_2CH=CH)_5(CH_2)_3COOH$	*Z*,*Z*,*Z*,*Z*,*Z*-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic	EPA	20:5 5*c*,8*c*,11*c*, 14*c*, 17*c*
$CH_3(CH_2)_{20}COOH$	Docosanoic	behenic	22:0
$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_{11}COOH$	*Z*- 13-docosenoic	erucic	22:1 13*c*
$CH_3(CH_2CH=CH)_6(CH_2)_2COOH$	*Z*,*Z*,*Z*,*Z*,*Z*,*Z*-4,7,10,13,16,19-docosahezaenoic	DHA	22:6 4*c*,7*c*,10*c*, 13*c*, 16*c*,19*c*
$CH_3(CH_2)_{22}COOH$	tetracosanoic	lignoceric	24:0
$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_{13}COOH$	*Z*-15-tetracosenoic	nervonic	24:1 15*c*

ที่มา: Gunstone, Harwood, and Dijkstra (2007)

กรดไขมันแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ (มารุจ ลิมปะวัฒนะ, และวรรณวิมล คล้ายประดิษฐ์, 2552) ดังนี้

(1) กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acids) กรดไขมันชนิดนี้ระหว่างอะตอมคาร์บอนยึดติดกันด้วยพันธะเดี่ยว โดยมีอะตอมไฮโดรเจนติดกับทุกอะตอมคาร์บอน ตัวอย่างเช่น กรดไขมัน Stearic Lauric Myristic และ Palmitic พบมากในไขมันสัตว์และน้ำมันมะพร้าว

(2) กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ 1 ตำแหน่ง (Monounsaturated fatty acids) ตัวอย่างเช่น C18:1 (Oleic acid) พบในน้ำมันพืชบางชนิด ตัวอย่างเช่น น้ำมันปาล์ม

(3) กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่เท่ากับหรือมากกว่า 2 ตำแหน่ง (Polyunsaturated fatty acids) ส่วนใหญ่เป็นกรดไขมันที่จำเป็น เช่น C18:1 n-6 (Linoleic acid) และ C18:2 n-3 (Linolenic acid) ซึ่งพบมากในน้ำมันพืช เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันข้าวโพดน้ำมันทานตะวัน น้ำมันถั่วลิสง น้ำมันคาโนล่า และน้ำมันเมล็ดฝ้าย และกรดไขมันอื่นๆ ที่มีความสำคัญต่อมนุษย์ เช่น C20:5 n-3 (Eicosapentaenoic acid : EPA) และ C22:6 n-3 (Decosahexaenoic acid : DHA) ซึ่งพบมากในน้ำมันปลา ปริมาณกรดไขมันในน้ำมันพืชดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ร้อยละของกรดไขมันในน้ำมันพืชบางชนิด

Fatty acid	Carbon atom :Double bond	Coconut oil	Corn oil	Cottonseed oil	Palm oil	Sunflower oil	Soybean oil	Rice bran oil	Olive oil
Caproic	6:0	0.50							
Caprylie	8:0	8.00							
Caprie	10:0	6.40							
Lauric	12:0	48.50			0.30	0.50			
Mysristic	14:0	17.60		0.90	1.10	0.20	0.10	0.60	
Palmitic	16:1	8.40	12.20	24.70	45.10	6.80	11.00	21.50	6.90
Palmitoleic	16:1		0.10	0.70	0.10	0.10	0.10		
Margaric	17:0			0.10					
Stearic	18:0	2.50	2.20	2.30	4.70	4.70	4.00	2.90	2.30
Oleic	18:1	6.50	27.50	17.60	38.80	18.60	23.40	38.40	84.40
Linoleic	18:2	1.50	57.00	53.30	9.40	68.20	53.20	34.40	4.60
Linolenic	18:3		0.90	0.30	0.30	0.50	7.80	2.20	0.80
Arachidic	20:0	0.10	0.10	0.10	0.20	0.40	0.30		0.50
Behenic	22:0						0.10		0.50
% of Saturated Fats		83.60	2.30	3.40	6.30	5.80	4.50	25.00	9.20
% of Monounsaturated Fats		14.90	39.80	43.00	84.00	25.50	34.50	38.40	84.40
% of Polyunsaturated Fats		1.50	57.90	53.60	9.70	68.70	61.00	36.60	6.40

ที่มา: Chow (2008)

2.1.1.2 ไตรเอซิลกลีเซอรอล (Triacylglycerols : TAGs)/กลีเซอรอล (Glycerol)

ประกอบด้วยคาร์บอน จำนวน 3 อะตอม แต่ละอะตอมมีหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) ($HOCH_2CH$ (OH) CH_2OH) การแบ่งประเภทของกลีเซอรอลขึ้นกับจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ Monoacylglycerols (MAG) Diacylglycerols (DAG) และ Triacylglycerols (TAGs) ทั้งนี้ TAGs เป็นกรดไขมันที่พบมากในรูปของกลีเซอรอลเอสเทอร์ (Glycerol eaters) บางครั้งเรียกว่าไตรกลีเซอไรด์ (Triglycerides) TAGs มีคุณสมบัติคือ ไม่มีขั้ว (Nonpolar) และไม่ละลายน้ำ พบทั่วไปในน้ำมันและไขมัน โดยชนิดของ TAGs ที่พบนั้นขึ้นกับแหล่งของสิ่งมีชีวิต เช่น น้ำมันพืช (Plant oil) จะมีกรดไขมันอิสระแบบไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid) มากกว่าไขมันสัตว์ ทำให้น้ำมันพืชมีจุดหลอมเหลวต่ำกว่าไขมันสัตว์ ดังนั้น ที่อุณหภูมิห้องน้ำมันพืชจึงอยู่ในรูปของเหลวในขณะที่ไขมันสัตว์อยู่ในรูปของของแข็ง (Gunstone, 2004)

2.1.1.3 เอสเทอร์แว็กซ์ (Ester waxes)

เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีลักษณะเป็นสายยาว ประกอบด้วยไฮโดรคาร์บอน (TCH_3) แอลกอฮอล์ (RCH_2OH) อัลดีไฮด์ (RCHO) กรด (RCOOH) และเอสเทอร์ ($RCOOR'$) แว็กซ์มีทั้งที่มาจากพืช เช่น ไขคาร์นูบา (Carnauba) และโจโจบาออยล์ (Jojoba) และแว็กซ์ที่มาจากสัตว์ เช่น ขี้ผึ้ง (Beeswax) และขี้ผึ้งขนแกะ (Woolwax) (Madan, 2013)

2.1.1.4 ฟอสโฟลิพิด (Phospholipids)

เป็นไขมันที่มีลักษณะแบบแอมฟิฟิลิก (Amphiphilic) คือ สามารถละลายได้ทั้งตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น น้ำ และไม่ขั้ว เช่น น้ำมัน ทำให้ไขมันประเภทนี้มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อาหาร เครื่องสำอาง และเภสัชกรรม อย่างไรก็ตาม ไขมันประเภทนี้มักเกิดการเสื่อมสลายในขั้นตอนการกลั่นน้ำมัน ทั้งนี้ ไขมันชนิดนี้มักพบในน้ำมันพืช และปนเปื้อนในน้ำเสียในรูปของน้ำมันและไขมัน (Solomon, Fryhle, & Snyder, 2013)

2.1.1.5 สตีรอล (Sterols) และสตีรอลเอสเทอร์ (Sterol esters) หรือที่เรียกว่าโคเลสเตอรอล (Cholesterol)

สารประกอบชนิดนี้ไม่ใช่ไขมันแต่พบมากในน้ำมันและไขมัน และมีผลยับยั้งคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของน้ำมันและไขมันด้วย สตีรอลสามารถเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชั่น (Esterification) กลายเป็นกรดไขมันสายยาว ซึ่งในน้ำมันดิบส่วนใหญ่จะประกอบด้วย Phytosterol ร้อยละ 0.10-2.20 โดยอยู่ในรูปของสตีรอลอิสระ (Free sterol) (Patrick, 2012)

2.1.2 การใช้ประโยชน์จากน้ำมันและไขมัน

น้ำมันและไขมันถูกนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายประเภท ดังนี้

2.1.2.1 อุตสาหกรรมอาหาร (Food industry)

ไขมันเป็นสารตั้งต้นของผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องในอุตสาหกรรมอาหารหลายประเภท เช่น เนยเทียม ไขมันเนย เนยขาว น้ำมันสลัด และน้ำมันประกอบอาหาร นอกจากนี้ยังเป็นส่วนประกอบในอาหารอีกหลากหลาย เช่น ผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ อาหารสำหรับทารก ขนมหวาน และอาหารในชีวิตประจำวันอื่นๆ สำหรับน้ำมันประกอบอาหาร (Cooking oil) ใช้ในการประกอบอาหารประเภททอดโดยเป็นตัวกลางให้ความร้อนถ่ายเทสู่อาหารทำให้อาหารมีกลิ่นและเนื้อสัมผัสตามต้องการ โดยทั่วไปแล้วน้ำมันใช้ในงานทอดที่อุณหภูมิสูงถึง 180 °C น้ำในอาหารเมื่อถูกความร้อนจะไปทำให้กรดไขมันในน้ำมันแตกหักหรือเรียกกระบวนการนี้ว่าปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ซึ่งทำให้น้ำมันมีคุณภาพเปลี่ยนแปลงไป มีจุดเกิดควัน (Smoke point) ลดลง สีเข้มขึ้น และมีกลิ่นเปลี่ยนแปลงไป ในกระบวนการให้ความร้อนนี้น้ำมันจะมีสภาพเปลี่ยนแปลงไปเกิดเป็นสารประกอบที่มีขนาดใหญ่ขึ้น (Polymerization) เป็นยางเหนียว เนื่องจากมีการดูดซับอาหารไว้ เกิดเป็นลักษณะเหมือนคราบไขมันหรือจาระบี (Grease) ขึ้น (Gunstone, 2008)

2.1.2.2 อุตสาหกรรมโอลิโอเคมี (Oleochemical industry)

เป็นอุตสาหกรรมผลิตสารเคมีจากไขมันและน้ำมันพืช ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสของน้ำมันและไขมันได้เป็นกรดไขมัน เมธิล เอสเทอร์ แอลกอฮอล์ เอมีน และกลีเซอรอล ซึ่งมีองค์ประกอบคล้ายคลึงกับสารเคมีที่มาจากปิโตรเคมี อุตสาหกรรมโอลิโอเคมีกำลังเจริญเติบโตในหลายประเทศทั่วโลก ระหว่างปี 2000-2010 มีปริมาณผลผลิตจากอุตสาหกรรมโอลิโอเคมีเพิ่มขึ้น 1 ใน 3 ของปริมาณทั้งหมด จาก 5.76 เป็น 7.75 ล้านตัน วัตถุดิบของอุตสาหกรรมโอลิโอเคมี ได้แก่ น้ำมันทอลล์ (น้ำมันจากผิวเซลล์ทั้งพืชและสัตว์) น้ำมันปาล์ม น้ำมันที่มีกรดไขมัน Erucic น้ำมันกากถั่วเหลือง และน้ำมันดอกทานตะวันส่วนผลิตภัณฑ์ที่ได้จากอุตสาหกรรมโอลิโอเคมีจะถูกนำไปใช้ประโยชน์เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมต่างๆ ตัวอย่างเช่น เทียน สารทำความสะอาด เครื่องสำอาง สารช่วยให้ลอยตัว (Flotation agents) สารอีมัลซิไฟเออร์ในอุตสาหกรรมอาหาร น้ำหมึก ยาฆ่าแมลง อุตสาหกรรมหนัง น้ำมันหล่อลื่น สี สารปราบศัตรูพืช อุตสาหกรรมยา พลาสติก สบู่ อุตสาหกรรมเส้นใยและสิ่งทอ และยางรถยนต์ เป็นต้น ทั้งนี้ เพื่อให้การเกิดปฏิกิริยาของกระบวนการไฮโดรไลซิสของน้ำมันและไขมันดียิ่งขึ้นทำให้ได้กรดไขมันตามต้องการ ได้มีการนำเอาเอนไซม์ไลเปสเข้ามาช่วยในการทำงาน โดยเอนไซม์ดังกล่าวได้มาจาก *Rhizomucor miehei* และ *Candida rugosa* ใช้เวลาเพาะเลี้ยง 20 ชั่วโมง อุณหภูมิ 20 °C หรือเวลาเพาะเลี้ยง 6 ชั่วโมง อุณหภูมิ 45 °C ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความสะอาดและเกิดของเสียน้อยกว่ากระบวนการแยกไขมัน (Fat splitting process) และยังมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่า แต่อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันเอนไซล์ไลเปสนี้ยังไม่เป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายในระดับอุตสาหกรรม (Gunstone, 2008)

2.1.2.3 การผลิตสารลดแรงตึงผิว (Surfactant production)

สารลดแรงตึงผิว คือ สารที่มีอนุภาคขนาดเล็กที่มีทั้งด้านขั้วที่ชอบน้ำ (Hydrophilic -lipophobic) และด้านขั้วที่ไม่ชอบน้ำ-ชอบไขมัน (Hydrophobic -lipophilic) เมื่ออยู่ในสารละลาย โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวจะสะสมอยู่บริเวณผิวของตัวทำละลาย ทำให้เกิดการลดค่าแรงตึงผิวของตัวทำละลายนั้น ทำให้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนละลายได้ในน้ำ หรือส่วนของน้ำละลายในสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ทำให้สารลดแรงตึงผิวมีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นผสมของสารทำความสะอาด (Detergent) สารเกิดฟอง และการเกิดอิมัลชัน (Desai & Banat, 1997) ตัวอย่างเช่น สบู่มีสายของกรดไขมัน Palmitic เป็นด้านขั้วที่ชอบไขมัน (Lipophilic) และหมู่คาร์บอกซีเลท (Carboxylate group) เป็นด้านขั้วที่ชอบน้ำเป็นต้น สารลดแรงตึงผิวผลิตได้มาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีและอุตสาหกรรมโอลิโอเคมี สำหรับสารตั้งต้น Lipophilic alkyl chain มักเป็น C12 และ C14 ผลิตจาก Lauric oil หรือ C16 และ C18 ผลิตจากน้ำมันทอลล์ น้ำมันปาล์ม หรือ C20 และ C22 ผลิตจากน้ำมันปลา น้ำมันที่มีกรดไขมัน Eruci สารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในอุตสาหกรรมมีแบ่งได้ 4 ประเภท ได้แก่ สารอิออนลบ (Anionic) สารไม่มีประจุ (Non-ionic) สารประจุบวก (Cationic) และ และสารที่มีทั้งประจุบวกและลบ (Zwitterionic หรือ Amphoteric) สารลดแรงตึงผิวถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมอื่นๆ ได้แก่ Emulsification, Deemulsification, Wetting, Foaming, Defoaming, Water-repelling, Solubilisers-Dispersing agents, Sanitizing Lubricity และ Emolliency (Gunstone, 2008)

2.1.2.4 ผลิตเครื่องสำอาง

ไขมันมีความสำคัญถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์บำรุงผิว วัตถุประสงค์เพื่อให้มีเนื้อสัมผัสที่เหมาะสมและเพื่อเพิ่มคุณภาพเครื่องสำอาง เช่น Tocopherols และ Phytosterols ช่วยให้ผิวหนังมีสุขภาพดีขึ้น หน้าที่ของไขมันในเครื่องสำอางได้แก่ Emollients Moisturizers Emulsifiers Solubilisers-Dispersing agents Texturisers และ Skin-feel improvers นอกจากนี้กรดไขมันบางชนิดยังมีความสามารถที่น่าสนใจ เช่น Antioxidative anti-inflammatory สังเคราะห์โปรตีนและคอลาเจน และย่อยสลายผิวหนัง ได้อีกด้วย ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ เช่น ผลิตภัณฑ์บำรุงผิวประเภท Oilments balm ผสมในเครื่องสำอาง เจลอาบน้ำ แชมพู และครีมนวดผม เป็นต้น (Gunstone, 2008)

2.1.2.5 ผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ (Biofuels)

ปัญหาการใช้เชื้อเพลิงจากซากฟอสซิลส่งผลกระทบทำให้เกิดภาวะโลกร้อน การใช้พลังงานทางเลือกจากเชื้อเพลิงชีวภาพที่ผลิตจากพืชและสัตว์ จึงกลายเป็นที่นิยมมากขึ้นในปัจจุบัน ตัวอย่างเช่น เชื้อเพลิงชีวภาพประเภทไบโอดีเซล (Biodiesel) ที่ผลิตจากเมทิลเอสเทอร์ (Methyl ester) ที่มาจากพืชน้ำมันและไขมันสัตว์หลายประเทศในทวีปยุโรป ทวีปอเมริกาเหนือ และทวีปอเมริกาใต้ เริ่มหันมาใช้ไบโอเอทานอล (Bioethanol) และไบโอดีเซลโดยในปี 2004 ประเทศ

สหรัฐอเมริกาผลิตไบโอเอทานอล ปริมาณ 4 พันล้านแกลลอน (หรือ 19 ล้านตัน) และไบโอดีเซล ปริมาณ 30 ล้านแกลลอน (หรือ 0.13 ล้านตัน)

ไตรเอซิลกลีเซอรอล (TAGs) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนสายยาวที่พบในน้ำมันและไขมัน เกิดจากปฏิกริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน (Tranesterification) โดย TAGs จะทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์สายสั้น เช่น เมทิลและเอทิลแอลกอฮอล์เมื่อมีตัวเร่งปฏิกิริยา จากนั้น TAGs จะเปลี่ยนไปเป็นโมโนเอซิลกลีเซอรอล (MAG) และไดเอซิลกลีเซอรอล (DAG) และสุดท้ายจะได้กลีเซอรอล ตามลำดับ ดังภาพที่ 1 (ปกรณ์ วินะยานุวัติคุณ, 2554)

ภาพที่ 1 ปฏิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชันระหว่างไตรเอซิลกลีเซอรอลกับแอลกอฮอล์

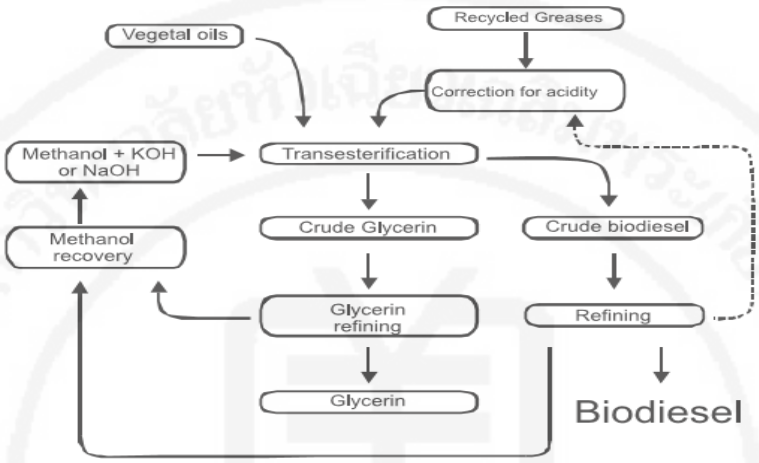
ที่มา: ปกรณ์ วินะยานุวัติคุณ (2554)

การเปลี่ยนพืชน้ำมันและไขมันสัตว์ไปเป็นเมทิลเอสเทอร์ ซึ่งเป็นส่วนผสมในน้ำมันไบโอดีเซลนั้นมีกระบวนการดังภาพที่ 2 โดยวัตถุดิบสำคัญที่สามารถนำมาผลิตไบโอดีเซล ได้แก่ น้ำมันพืช ไขมันสัตว์ น้ำมันจากสาหร่ายขนาดเล็ก และผลิตภัณฑ์จากของเสีย สำหรับตัวเร่งปฏิกิริยาอาจเป็นสารเคมีประเภทกรดหรือด่าง หรืออาจเป็นตัวเร่งทางชีวภาพก็ได้ (ปกรณ์ วินะยานุวัติคุณ, 2554) อย่างไรก็ตามการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ เช่น เอนไซม์ไลเปส กำลังได้รับความสนใจเนื่องจากเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถลดค่าใช้จ่ายของกระบวนการหลังการผลิตเพราะแยกผลิตภัณฑ์ออกได้ง่าย และไม่มีค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสีย ดังนั้น การนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้ประโยชน์จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อผลิตไบโอดีเซล

น้ำมันและไขมันที่เกิดขึ้นในถังดักไขมันของร้านอาหารนั้น ก็เป็นวัตถุดิบประเภทหนึ่งที่สามารถนำไปผลิตไบโอดีเซลได้เช่นกัน Husuntree et al. (2011) ใช้กรดซัลฟุริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นของน้ำมันและไขมันจากถังดักไขมันของโรงอาหาร ได้ผลผลิตเมทิลเอสเทอร์ร้อยละ 83.59$\pm$ร้อยละ 1.51 ทั้งนี้ สำนักงานปกป้องสิ่งแวดล้อมประเทศสหรัฐอเมริกา (United States Environmental Protection Agency: EPA) ได้ให้คำแนะนำว่าน้ำมันและไขมันจากถังดักไขมัน จากอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เครื่องสำอาง สบู่ และอีกหลาย

อุตสาหกรรมที่มีน้ำมันและไขมันที่เกิดขึ้นกลายเป็นของเสียนี้ สามารถนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลได้เป็นอย่างดี (EPA, 2013)

ภาพที่ 2 กระบวนการผลิตน้ำมันไบโอดีเซล



ที่มา: Pinto et al. (2005)

2.1.2.5 ด้านอื่นๆ

นอกจากนี้น้ำมันและไขมันยังถูกนำไปใช้ในการผลิตอื่นๆ เช่น น้ำมันหล่อลื่น (Lubricants) เป็นต้น

2.2 น้ำเสียที่มีน้ำมันและไขมันจากร้านอาหาร

น้ำเสียจากร้านอาหารที่มีน้ำมันและไขมันปนเปื้อนส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะหากน้ำเสียเหล่านี้ถูกปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อมโดยไม่ได้ผ่านการบำบัดอย่างเหมาะสม จะก่อให้เกิดปัญหาแหล่งน้ำเน่าเสีย หรือเกิดการปนเปื้อนสู่ดินได้ นอกจากนี้ยังอาจทำให้ท่อระบายน้ำเสียอุดตัน ระบบการระบายน้ำล้มเหลว และเป็นปัญหาต่อระบบบำบัดน้ำเสียในที่สุด ทำให้ระบบบำบัดน้ำเสียมีประสิทธิภาพลดลง เป็นอุปสรรคต่อการทำงานในระบบขั้นตอนต่างๆ (Nuri & Taner, 2004)

2.2.1 องค์ประกอบของน้ำเสียจากร้านอาหาร

กรมควบคุมมลพิษได้แสดงองค์ประกอบของน้ำเสียจากร้านอาหารดังตารางที่ 3น้ำเสียจากร้านอาหารมีปริมาณน้ำมันและไขมันสูงมาก ตั้งแต่ 14 จนถึง 38,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่ามาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากอาคารบางประเภทและบางขนาด ของกรมควบคุม

มลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม กำหนดให้น้ำทิ้งต้องมีค่าน้ำมันและไขมัน ไม่เกิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้น การกำจัดน้ำมันและไขมันในน้ำเสียก่อนปล่อยระบายลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง น้ำเสียมาจากกระบวนการผลิตอาหารและฟาร์มเลี้ยงสัตว์มักมีสารอินทรีย์ที่ย่อยสลายได้อยู่ในปริมาณมาก รวมทั้งมีปริมาณไขมันและโปรตีนปนเปื้อนสูง ส่งผลให้การบำบัดด้วยวิธีทางชีวภาพมีประสิทธิภาพต่ำ ถ้าไม่มีการบำบัดสารอินทรีย์ออกก่อน เมื่อปล่อยน้ำเสียลงดินหรือแหล่งน้ำสาธารณะจะส่งผลกระทบอย่างรุนแรง เนื่องจากน้ำเสียมีค่า Biochemical oxygen demand (BOD) และค่า Chemical oxygen demand (COD) อยู่ในระดับสูง ปัจจุบันยังไม่มีเทคโนโลยีที่สามารถบำบัดหรือย่อยสลายไขมันได้ในระดับปริมาณมากที่นับหน่วยเป็นตัน และในกรณีอุตสาหกรรมอาหารและร้านอาหารต่างๆ ที่มีสารอินทรีย์ประเภทไขมันปนเปื้อนสูงยิ่งกลายเป็นปัญหาสำคัญที่ต้องเร่งดำเนินการแก้ไข

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของน้ำมันและไขมันจากร้านอาหาร

พารามิเตอร์ (หน่วย)	ความเข้มข้น
ความเป็นกรดด่าง (pH)	5-7
สภาพการนำไฟฟ้า (Conductivity) (ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร)	300-2,500
สี (Color) (ADMI)	60-700
ไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) (มิลลิกรัมต่อลิตร)	9-106
กรดไขมันอิสระ (Free Fatty acid) (ร้อยละ)	0.02-85
ไขมันและน้ำมัน (Grease and Oil) (มิลลิกรัมต่อลิตร)	14-38,000
ฟอสฟอรัสรวม (Total Phosphorus) (มิลลิกรัมต่อลิตร)	0.13-100

ที่มา: กรมควบคุมมลพิษ (2551)

2.2.2 การกำจัดน้ำมันและไขมันในน้ำเสีย

2.2.2.1 วิธีการกำจัดน้ำมันและไขมันในน้ำเสีย

การบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันสูงจำเป็นต้องลดความเข้มข้นหรือกำจัดน้ำมันและไขมันออกก่อนนำน้ำเสียเข้าระบบบำบัดน้ำเสีย เพื่อป้องกันไม่ให้มีสารยับยั้งใดๆ ที่มีในสารอินทรีย์ที่จะไปมีผลต่อประสิทธิภาพของระบบบำบัดน้ำเสียดังกล่าว โดยทั่วไปการบำบัดเบื้องต้น (Pre-treatment) มักใช้ถังดักไขมัน (Grease trap) ถังแยกไขมัน ระบบทำให้ลอยตัวโดยการเป่าอากาศ และวิธีการบำบัดทางกายภาพ-เคมี เพื่อกำจัดน้ำมันและไขมันออกจากน้ำเสีย อย่างไรก็ตามสารเคมีที่ใช้นี้มีราคาแพง ประสิทธิภาพการกำจัดน้ำมันและไขมันต่ำ ทำให้มีน้ำมันและไขมัน

หลงเหลือในน้ำเสียและเป็นปัญหาต่อระบบบำบัดน้ำเสียหลายประการ ตัวอย่างเช่น ส่งกลิ่นเหม็นรบกวน หรือลดอัตราการแลกเปลี่ยนระหว่างเซลล์จุลินทรีย์กับน้ำเสีย (เช่น สสารต่างๆ และการละลายของออกซิเจน) เนื่องจากน้ำมันและไขมันจะห่อหุ้มรอบตะกอนจุลินทรีย์หรือเกิดเป็นแผ่นฟิล์มไขมันลอยอยู่บนผิวหน้าของน้ำเสีย (Cammarota & Freire, 2006) โดยเฉพาะหากพบแผ่นฟิล์มไขมันในถังเติมอากาศจะมีผลต่อประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียได้นอกจากนี้ยังทำให้เกิดปัญหาตะกอนลอยเนื่องจากมีจุลินทรีย์กลุ่มเส้นใยเจริญมากผิดปกติ (Filamentous microorganism blooms) รวมทั้งปัญหาตะกอนจุลินทรีย์ลอยปนกับน้ำมันและไขมันหลุดออกนอกระบบบำบัดน้ำเสียอีกด้วย (Vidal, Carvalho, Méndez, & Lema, 2000)

โดยทั่วไปแล้วการกำจัดน้ำมันและไขมันในน้ำเสีย มี 3 วิธี (บุญส่ง ไข่เกษ และคณะ, 2554) ดังนี้

(1) วิธีการทางกายภาพ

เป็นวิธีควบคุมกำจัดและเก็บกวาดน้ำมันและไขมันด้วยวิธีทางกลศาสตร์หรือใช้อุปกรณ์เครื่องมือซึ่งหลักการและประสิทธิภาพในการทำงานของอุปกรณ์แต่ละชนิดแตกต่างกันไปและในบางครั้งอาจใช้อุปกรณ์ในการทำงานมากกว่าหนึ่งชนิดวิธีการกำจัดทางกายภาพเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากเนื่องจากทำได้รวดเร็วค่าใช้จ่ายในการดำเนินการต่ำกระบวนการไม่ซับซ้อนวิธีการทางกายภาพมีดังนี้

- การเติมอากาศเป็นวิธีการเป่าอากาศลงไปในน้ำเสียโดยตรงเพื่อให้ฟองอากาศพาน้ำมันและไขมันในน้ำเสียลอยขึ้นสู่ผิวน้ำโดยฟองอากาศเป็นตัวช่วยพาให้น้ำมันและไขมันลอยตัวขึ้นสู่ผิวน้ำเร็วยิ่งขึ้นโดยเฉพาะไขมันที่ไม่สามารถแยกได้ด้วยถังดักไขมันหรือต้องใช้ระยะเวลาในการกักพักนานทำให้ถังดักไขมันมีขนาดใหญ่

- การทำให้ลอยตัวโดยธรรมชาติเป็นวิธีการที่อาศัยคุณสมบัติในด้านความถ่วงจำเพาะซึ่งน้ำมันและไขมันจะมีความถ่วงจำเพาะที่น้อยกว่าน้ำเมื่อมีระยะเวลาการกักพักภายในถังเพียงพอที่จะทำให้น้ำมันและไขมันลอยตัวขึ้นมาอยู่ที่ผิวน้ำได้วิธีการนี้จะใช้ถังดักไขมันและเครื่องแยกไขมันเหมาะสมกับแหล่งกำเนิดน้ำเสียที่มีปริมาณน้ำเสียและปริมาณการปนเปื้อนของน้ำมันและไขมันไม่มากนัก

- การใช้วัสดุดูดซับเป็นวิธีการทางกายภาพที่ใช้วัสดุที่มีคุณสมบัติในการดูดซับน้ำมันและไขมันโดยวัสดุที่นำมาใช้อาจทำมาจากเส้นใยสังเคราะห์หรือเส้นใยพืชซึ่งอาจจะเป็นวัสดุที่หาได้ง่ายในท้องถิ่นโดยทั่วไปวัสดุดูดซับควรมีคุณสมบัติดังนี้คือสามารถลอยตัวอยู่ได้บนน้ำมีความหนาแน่นต่ำเพื่อทำให้ลอยตัวได้และสามารถดูดซับน้ำมันและไขมันไว้ในตัวได้ดีสะดวกต่อการใช้งานขั้นตอนการใช้ไม่ยุ่งยากไม่เป็นพิษหรือส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

(2) วิธีการทางเคมี

เป็นวิธีการกำจัดน้ำมันและไขมันด้วยการเติมสารเคมีที่ใช้สำหรับแยกน้ำมันและไขมันออกจากน้ำโดยการใช้สารเคมีที่มีส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิวเป็นส่วนประกอบทำให้น้ำมันแตกตัวโดยสารเคมีนี้จะทำให้ความแตกต่างของแรงตึงผิวระหว่างน้ำมันและไขมันกับน้ำลดลงจนแรงตึงผิวของน้ำมันและไขมันใกล้เคียงกับน้ำทำให้น้ำมันและไขมันกระจายตัวและช่วยป้องกันการรวมตัวของน้ำมันและไขมันอีกนอกจากนี้ยังมีการใช้สารเคมีทำให้น้ำมันและไขมันรวมตัวกันโดยการใช้สารเคมีฉีดลงบนจุดที่มีน้ำมันและไขมันอยู่จะทำให้คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของน้ำมันและไขมันเกิดการรวมตัวกันกลายเป็นก้อนแล้วจมลงในน้ำแต่สารเคมีที่ใช้ในขณะนี้มีราคาแพงและยังมีการใช้ไม่แพร่หลายมากนัก

(3) วิธีการทางชีวภาพ

เป็นวิธีการกำจัดน้ำมันและไขมันที่อาศัยจุลินทรีย์ เช่น ยีสต์ รา และแบคทีเรีย ช่วยในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันการย่อยสลายโดยธรรมชาตินี้เป็นไปอย่างช้าๆ ใช้เวลานาน โดยปกติแล้วในแหล่งน้ำธรรมชาติจะมีจุลินทรีย์ประเภทต่างๆ อาศัยอยู่ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะดำรงชีวิตอยู่ได้โดยอาศัยอาหารที่มีอยู่ในแหล่งน้ำ จึงอาศัยหลักการตามธรรมชาติดังกล่าว สารปนเปื้อนที่อยู่ในน้ำเสียอยู่ในรูปของสารอนินทรีย์จะกลายเป็นอาหารและถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์วิธีการกำจัดทางชีวภาพ สามารถแบ่งออกตามลักษณะของปฏิกิริยาการย่อยสลายของจุลินทรีย์ได้เป็น 2 ประเภท คือ การย่อยสลายโดยใช้ออกซิเจนและการย่อยสลายโดยไม่ใช้ออกซิเจน การย่อยสลายโดยใช้ออกซิเจนเป็นการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยอาศัยจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจนซึ่งส่วนมากเป็นออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำ เมื่อจุลินทรีย์ทำการย่อยสลายสารอินทรีย์จะทำให้ปริมาณออกซิเจนในน้ำลดลง ถ้าปริมาณออกซิเจนมีไม่เพียงพอจุลินทรีย์จะตายลง จึงจำเป็นต้องมีการเติมออกซิเจนลงไปในน้ำ วิธีการนี้มักจะใช้ในระบบเอเอสถังเลี้ยงตะกอนและลานกรอง ส่วนการย่อยสลายโดยไม่ใช้ออกซิเจนเป็นการย่อยสลายสารอินทรีย์โดยอาศัยจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ใช้ออกซิเจน มักจะใช้ในระบบถังกรองแอนแอโรบิคบ่อพักไร้อากาศและถังหมัก เป็นต้น

2.2.2.2 ปฏิกิริยาของน้ำมันและไขมันในน้ำเสีย

การย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสีย ตามปกติแล้วจะเกิดจากจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อไปทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันและไขมันกลายเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันสายยาว ซึ่งสารเหล่านี้มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมการจุลินทรีย์ที่มีหน้าที่บำบัดน้ำเสีย (Hanaki, Nagase, & Matsuo, 1981; Angelidaki & Ahring, 1992) จึงต้องมีการกำจัดน้ำมันและไขมันในน้ำเสียออกก่อนที่จะนำน้ำเสียเข้าสู่ระบบบำบัดขั้นตอนต่อไป ทั้งนี้ ที่สภาวะอุณหภูมิสูงจุลินทรีย์จะปลดปล่อยเอนไซม์ไลเปสเพื่อย่อยสลายน้ำมันและไขมันได้ดี (Becker et al., 1999) ดังนั้น เพื่อควบคุมกระบวนการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในระบบบำบัดน้ำเสียจึงจำเป็นต้องมีระบบให้ความร้อนเพื่อให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการปลดปล่อยเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์

2.2.2.3 ปัญหาของการบำบัดทางชีวภาพของระบบบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันสูง

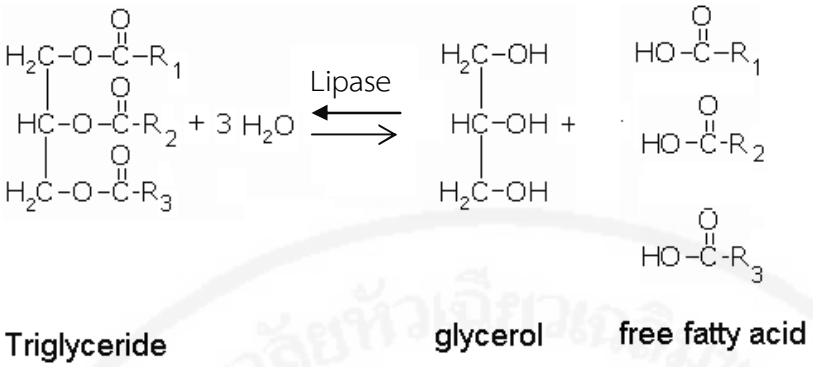
ผลจากการมีไขมันปนเปื้อนในน้ำเสียปริมาณมากจะทำให้เกิดกรดไขมันสายยาวที่มีความเป็นพิษและยับยั้งการทำงานจุลินทรีย์กลุ่มไม่ใช้อากาศ กรดไขมันสายยาว (Long chain fatty acid : LCFA) ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัวที่คาร์บอน 12 – 14 อะตอม และกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีคาร์บอน 18 อะตอม (กรดไขมันสายยาว คือ กรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 13 - 21 อะตอมขึ้นไป (Beermann, Jelinek, Reinecker, Hauenschild, Boehm, & Klör, 2003) ยิ่งมีกรดไขมันสายยาวเกิดขึ้นมากยิ่งมีผลยับยั้งเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ส่วนผลิตภัณฑ์อื่นที่เกิดขึ้นคือกลีเซอรอลไม่มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ (Hanaki et al., 1981; Angelidaki & Ahring, 1992; Perle, Kimchie,& Shelef, 1995) LCFA จะไปลดการทำงานของ Adenosine triphosphate (ATP) และลดการผลิตไฮโดรเจนของแบคทีเรียกลุ่ม Acetogenic ซึ่งจะมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของระบบบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศและการผลิตแก๊สชีวภาพ เช่น มีเทน (Hanaki et al., 1981; Perle et al., 1995) Vidal et al. (2000) ศึกษาผลกระทบของไขมันต่อการบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ พบว่าระบบบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันสูงจะมีอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพต่ำกว่าระบบบำบัดน้ำเสียที่ที่มีไขมันน้อยกว่าเนื่องจากมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสต่ำ

2.3 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันมีทั้งกลุ่มที่ใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน จุลินทรีย์ที่สำคัญ ได้แก่ แบคทีเรีย เช่น *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Burkholderia* sp. รา เช่น *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. และ *Candida*sp. รวมถึงยีสต์ เช่น *Zygosaccharomyces* sp., *Pichia* sp., *Lachancea* sp. และ *Kluyveromyces* sp. เป็นต้น (Verma, Thakur, & Bhat, 2012; Thakur, 2012) การย่อยสลายไขมันของจุลินทรีย์เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสซึ่งขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์และสภาวะในการเกิดปฏิกิริยา โดยจุลินทรีย์จะสร้างเอนไซม์และหลั่งเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์เพื่อให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับไขมันหรือไตรเอซิลกลีเซอรอล (TAGs) ที่อยู่ภายนอกเซลล์ และได้ผลผลิตคือกลีเซอลรอล และกรดไขมัน (Hasan, Shah, & Hameed, 2009) ดังภาพที่ 3

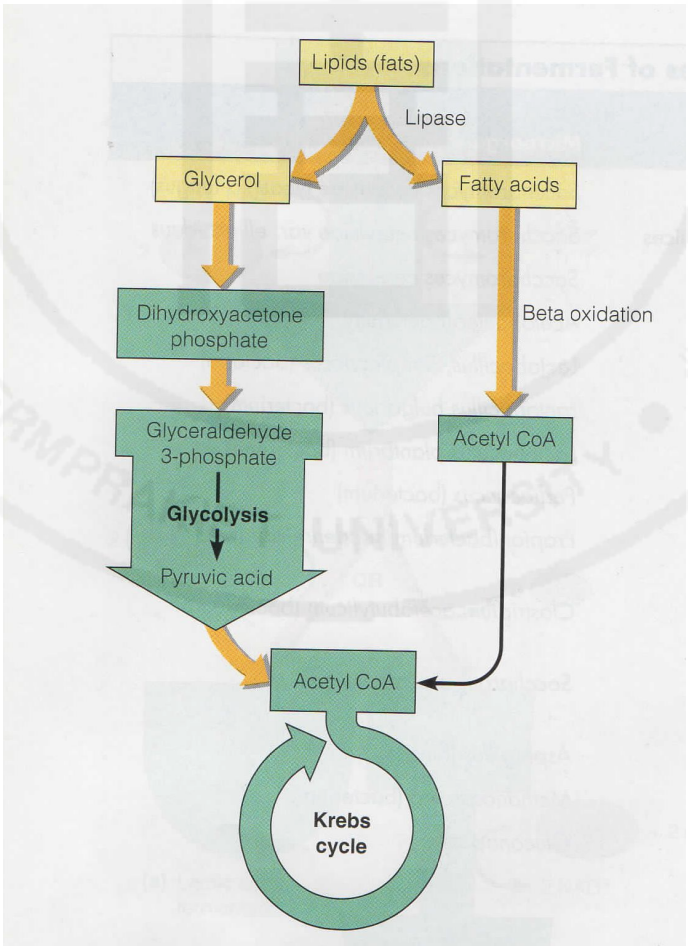
กระบวนการสลายไขมัน (Lipid catabolism) ของจุลินทรีย์เกิดขึ้นเมื่อกรดไขมันเข้าถูกลำเลียงเข้าสู่เซลล์จะถูกย่อยสลายโดยผ่านวิถี Bete-oxidation จนกระทั่งได้อะซิทิลโคเอ (Acetyl-CoA) และเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ (Kreb’s cycle) ส่วนกลีเซอเรอลจะถูกนำเข้าสู่วิถีไกลโคไลซีสได้เป็นฟอสโฟอีนอลไพรูเวท (Phosphoenol-pyruvate) และเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ (Kreb’s cycle) (Rehm & Reed, 1981) เช่นกันตามภาพที่ 4

ภาพที่ 3 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ไลเปสกับ TAGs



ที่มา: Andualema and Gessesse (2012)

ภาพที่ 4 กระบวนการสลายไขมัน (Lipid catabolism) ของจุลินทรีย์



ที่มา: Tortora, Funke, and Case (2003)

2.3.1 เอนไซม์ไลเปส

ไลเปส (Lipase) หรือ กลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (Glycerol ester hydrolase) หรือไตรเอซิลกลีเซอรอลไฮโดรเลส (Triacylglycerol hydrolase) (EC 3.1.1.3) เป็นตัวเร่งปฏิกริยาไฮโดรไลซิสทำให้ไตรเอซิลกลีเซอรอลเปลี่ยนเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน (Gupta, Gupta, & Rathi, 2004) สำหรับแหล่งของเอนไซม์ไลเปสพบได้ทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ โดยเฉพาะปัจจุบันไลเปสจากจุลินทรีย์กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องเจริญเติบโตได้รวดเร็วเลี้ยงง่ายกว่าพืชและสัตว์ การเพาะเลี้ยงไม่ขึ้นกับสภาพภูมิอากาศ ประหยัดพื้นที่ในการเพาะเลี้ยง ไม่สิ้นเปลืองแรงงานในการเพาะเลี้ยงและการเก็บเกี่ยว อีกทั้งความเข้มข้นของเอนไซม์ก็สูงกว่า นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในสภาวะรุนแรง เช่น อุณหภูมิ พีเอช สารละลายอินทรีย์ สารเคมี เป็นต้น

คุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดต่างกัน มีความแตกต่างกัน เช่น ความจำเพาะ อุณหภูมิ พีเอช ความเป็นอิสระ กิจกรรมในตัวทำละลายอินทรีย์ และสารพิษตามธรรมชาติ ในสภาพแวดล้อมที่อาศัย อย่างไรก็ตาม ไลเปสที่เป็นที่ต้องการนั้นจะต้องมีคุณสมบัติดังนี้ สามารถทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ Mono-, Di- และ Tri- acylglycerol เป็นตัวเร่งที่ดีในปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่น มีสารยับยั้งน้อย มีกิจกรรมสูง/ให้ผลผลิตสูงในอาหารที่ไม่ใช่ของเหลว มีระยะเวลาเพาะเลี้ยงน้อย ทนทานที่อุณหภูมิ พีเอช แอลกอฮอล์ ต่างๆ และยังสามารถตรึงเอนไซม์ให้ใช้งานได้นาน (Kumar, Sharma, & Kanwar, 2012) จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสมีหลายสายพันธุ์ มีทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

จุลินทรีย์	จีนัส	สปีชี่ส์
Bacteria (Gram-positive)	*Bacillus*	*B. megaterium* *B. cereus* *B. stearothermophilus* *B. subtilis* *B. thermocatenulatus* *B. coagulans* *B. acidocaldarius* *B. thermoleovorans*
	Staphylococcus	*S. carnosus* *S. aureus* *S. epidermidis* *S. warneri*

ตารางที่ 4 (ต่อ)

จุลินทรีย์	จีนัส	สปีชี่ส์
แบคทีเรีย แกรมบวก (Gram-positive bacteria)	*Lactobacillus*	*L. delbruckii sub sp. bulgaricus*
	Lactococcus	*L. lactis*
	Micrococcus	*M. freudenreichii* *M. luteus*
	Propionibacterium	*Pr. acne* *Pr. granulosum*
	Burkholderia	*Burkholderia sp.* *Bu. glumae*
แบคทีเรีย แกรมลบ (Gram-negative bacteria)	*Pseudomonas*	*P. aeruginosa* *P. fragi*
		P. mendocina *P. putida* *P. glumae* *P. cepacia* *P. fluorescens* *P. aeruginosa* *P. pseudoalcaligenes*
	Chromobacterium	*Ch. viscosum*
	Acinetobacter	*Aci. pseudoalcaligenes* *Aci. radioresistens*
	Aeromonas	*Ae. hydrophila* *Ae. sorbia*
รา (Fungi)	*Rhizopus*	*Rhizop. Delemar* *Rhizop. oryzae* *Rhizop. arrhizus* *Rhizop. nigricans* *Rhizop. nodosus*

ตารางที่ 4 (ต่อ)

จุลินทรีย์	จีนัส	สปีชี่ส์
รา (Fungi)	*Rhizopus*	*Rhizop. chinensis* *Rhizop. japonicus* *Rhizop. niveus*
	Aspergillus	*A. flavus* *A. niger* *A. awamori* *A. fumigatus* *A. oryzae* *A. carneus* *A. repens* *A. nidulans*
	Penicillium	*Pe. cyclopium* *Pe. citrinum* *Pe. roqueforti* *Pe. fumiculosum* *Pe. camambertii* *Pe. wortmanii*
	Candida	*C. rugosa* *C. tropicalis* *C. antarctica* *C. cylindracea* *C. deformans* *C. curvata* *C. valida*
ยีสต์ (Yeasts)	*Yarrowia*	*Y. lipolytica*
	Rhodotorula	*Rho. glutinis* *Rho. pilimornae*
	Saccharomyces	*Sa. lipolytica* *Sa. crataegenesis*

ตารางที่ 4 (ต่อ)

จุลินทรีย์	จีนัส	สปีชี่ส์
ยีสต์ (Yeasts)	*Streptomyces*	*Str. fradiae* *Str. coelicolor* *Str. cinnamomeus*

ที่มา : Sharmaa, Chistib, and Banerjeea (2001)

จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถคัดแยกได้จากสิ่งแวดล้อมต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนน้ำมันสูง เช่น น้ำเสียจากสถานที่กำจัดขยะ และน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการอยู่อาศัยของจุลินทรีย์ผลิตไลเปส (Abd Rahman, Leow, Salleh, & Basri, 2007)

2.3.2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตเอนไซม์ไลเปส

ปัจจัยที่มีผลต่อจุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสมีหลายประการด้วยกัน มีทั้งปัจจัยที่ส่งเสริมและปัจจัยที่ยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไลเปส ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีปัจจัยเหล่านี้แตกต่างกัน

2.3.2.1 ปัจจัยทางกายภาพ (Physical factors)

ปัจจัยทางกายภาพของสภาวะเพาะเลี้ยง ได้แก่ พีเอช อุณหภูมิอายุจุลินทรีย์ ขนาดของอุปกรณ์เพาะเลี้ยง การกวน และระยะเวลาเพาะเลี้ยง ถือเป็นปัจจัยสำคัญต่อผลผลิตของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ (Hasan, Shah, & Hammeed, 2009) ปัจจัยทางกายภาพบางประการที่สำคัญ มีดังนี้

(1) ระยะเวลาเพาะเลี้ยง จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้มากที่สุดแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น *Bacillus* sp. เริ่มเข้าสู่การเจริญระยะคงที่ (Stationary phase) ที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 36 ชั่วโมง จะให้ผลผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุด (Handelsman & Shoham, 1994) หรือ *Bacillus cereus*และ *Bacillus coagulans* ให้ผลผลิตไลเปสสูงสุดที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง หรือ 2 วัน (El-Shafei & Rezkallah, 1997)

(2) การเติมอากาศ อัตราการเติมอากาศมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์พวกที่ใช้อากาศ (Aerobic microorganisms) โดยตามปกติแล้วในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงจำเป็นต้องเติมอากาศด้วยการเขย่าภาชนะที่เพาะเลี้ยง เพื่อให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์และปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (Extracellular enzymes) อัตราอากาศต่ออาหารเพาะเลี้ยงควรเป็น 1 ต่อ 4 ซึ่งจะทำให้ได้ผลผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุด ตัวอย่างเช่น *Bacillus* sp. ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ (Lipase activity) สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน และมีการเติมอากาศด้วยการเขย่าอย่างต่อเนื่อง (El-Shafei & Rezkallah, 1997) นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่

เพาะเลี้ยงร่วมกับการเขย่าทำให้ได้ผลผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงเช่น เช่น *Psuedomas aerugunosa* KKA-5 (Sharon, Furugoh, Yamakido, Ogawa, & Kato, 1998) และ *Rhizopus oryzae* (Salleh, Musani, Basri, Ampon, Yunus, & Razak, 1993)

2.3.2.2 ปัจจัยทางชีวเคมี/กายภาพเคมี (Biochemical/Physiochemical factors)

(1) สารตั้งต้น (Substrates) ชนิดของไขมันในอาหารเพาะเลี้ยงมีผลส่งเสริมผลผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยไตรเอซิลกลีเซอรอลที่ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวหรือกรดไขมันอิ่มตัวที่มีขนาดกลาง (C_8 – C_{12}) เป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ไลเปส เนื่องจากถ้ามีสายกรดไขมันสั้นหรือยาวกว่านี้จะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ไม่ดี (Hasan et al., 2009) อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่จำเพาะต่อกรดไขมันได้แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น *Streptococcus faecalis* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสไปไฮโดรไลซิสกรดไขมันสายสั้นได้ดี ในขณะที่กรดไขมันสายยาว เช่น กรดไขมัน Oleic กลับมีผลต่อการยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไลเปส (Chander, Ranganathan, & Singh, 1979) *Acinetobacter radioresistens* เมื่อเติมน้ำมันมะกอกที่มีกรดไขมัน n-hexadecane ในอาหารเพาะเลี้ยงจะทำให้ผลผลิตเอนไซม์ไลเปสเพิ่มสูงขึ้น (Dasai & Banat, 1998) นอกจากนี้ น้ำมันปลาซาร์ดีน น้ำมันกากถั่วเหลืองและไตรโอเลอิน (Triolein) มีผลต่อการส่งเสริมผลผลิตเอนไซม์ไลเปสให้เพิ่มสูงขึ้นเช่นกัน (Kamini, Fujii, & Iefuji, 2000)

(2) สารเหนี่ยวนำ (Inducers) สารลดแรงตึงผิวสามารถช่วยส่งเสริมผลผลิตเอนไซม์ไลเปสให้เพิ่มสูงขึ้น โดยทำหน้าที่เป็นสารเหนี่ยวนำของสารตั้งต้น (ไขมัน) ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ไลเปส เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวนี้มีคุณสมบัติคล้ายกับสารตั้งต้นตามธรรมชาติและยังช่วยกระตุ้นการปลดปล่อยเอนไซม์ไลเปสจากเซลล์ได้เป็นอย่างดี (Espinosa, Sahchez, Farres, 1990; Song, Lin, Rong, & Wei, 2001) ตัวอย่างเช่น Tween80 ช่วยส่งเสริมผลผลิตเอนไซม์ไลเปสของ *Bacillus* sp. CM7 (Emanuilova, Kambourova, Dekosvka, & Manolov, 1993) นอกจากนี้สารอื่นๆ เช่น โซเดียมอะซิเตต กรดไขมัน Oleic น้ำมันมะกอก Triton X-100 และ Tween20 เมื่อเติมในอาหารเพาะเลี้ยง ก็สามารถเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เช่นกัน (Breuil & Kushner, 1975)

(3) สารอนินทรีย์ (Inorganic substances) สารอนินทรีย์ เช่น Na^+, PO_4^{3-} และ Ca^{2+} เป็นสารที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย มีรายงานว่าการเติมโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเพาะเลี้ยงช่วยส่งเสริมผลผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ (Okhkuro, Komatsuzaki, Kawashima, & kuriyama, 1978)

(4) แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน (Carbon and Nitrogen sources) คาร์บอนและไนโตรเจนเป็นสารจำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรียเช่นกัน หลายงานวิจัยได้ใช้น้ำมันพืชชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อส่งเสริมผลผลิตเอนไซม์ไลเปส ดังเช่น *Bacillus coagulans* BTS-3 ซึ่งผลิตเอนไซม์ไลเปสแบบ Alkaline extracellular enzyme ได้มาจากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติม

น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน และเติมเปบโตน (Peptone) และสารสกัดยีสต์ (Yeast extract) (1:1) เป็นแหล่งไนโตรเจน (Kumar, Kikon, Upadhyay, Kanwar, & Gupta, 2005) Gilbert เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าให้มวลชีวภาพ (Biomass) อยู่ในระดับสูงเช่นกัน (Fadiloglu & Erkmen, 2002) ทั้งนี้ สัดส่วนระหว่างคาร์บอน-ไนโตรเจนก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ไลเปส

2.3.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

กิจกรรมของเอนไซม์ (Enzyme activity) หมายถึง ปริมาณ (หน่วยเป็น μmole หรือ μg) ของสารตั้งต้นที่เปลี่ยนแปลงโดยปฏิกิริยาเฉพาะของเอนไซม์จำนวนหนึ่งภายในหนึ่งหน่วยเวลา (หน่วยเป็นนาทีหรือวินาที) หน่วยเป็น ยูนิต (Unit : U) สามารถใช้บ่งบอกประสิทธิภาพของเอนไซม์ได้ มีหลายงานวิจัยได้ศึกษาถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ ทั้งลักษณะเป็นเอนไซม์บริสุทธิ์ (Purified enzymes) และเอนไซม์หยาบ (Crude enzyme) มีดังนี้

2.3.3.1 พีเอชและอุณหภูมิ สำหรับพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์บางชนิด ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

Microorganisms	Range of pH and temp. stability			Optimum value	
	pH	Temp (°C)	Time (h)	pH	Temp (°C)
Aspergillus oryzae RIB128	4-7.5	30	24	5.5	40
Aeromonas sobria LP004	6.5-10	<40	-	6	45
Cryptococcus sp. S-2	5-9	50	-	7	37
Rhizopus oryzae	4.5-7.5	-	-	7.5	35
Acinetobacter radioresistens	6-10	-	-	10	-
Bacillus sp. LBN4	7-8	65	-	8	-
Staphylococcus sp.	5-9	-	-	8	55
Pseudomonas moteilli	-	-	1	6	40

ที่มา: Hasan et al. (2009)

2.3.3.2 สารกระตุ้นและสารยับยั้ง สำหรับสารกระตุ้นและสารยับยั้งต่อกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์บางชนิด ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 สารกระตุ้นและสารยับยั้งต่อกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

Microorganisms	Activators	Inhibitors
Acinetobacter sp. CR9	PMSF, DDT, 2-ME Cu^{2+}, Mo^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}	EDTA Ca^{2+}
Acinetobacter baumannii BD5	Tween20, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+},	SDS, Triton X-100, Cu^{2+}, Zn^{2+}
Pseudomonas putida 3SK *Pseudomonas aeruginosa* MB 5001	$CaCl_2$, Taurocholic acid	$ZnSO_4$, SDS
Serratia marcescens 345	Mg^{2+}	Ni^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Hg^{2+}
Bacillus sp. FH5	Ba^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Hg^{2+}	Cu^{2+}, Co^{2+}, Na^{2+}, Zn^{2+}
Staphylococcus aureus	Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}	Co^{2+}, Zn^{2+}
Rhizopus oryzae	Glycerol, Olive oil, Triolein และ Oleic acid, Saturated fatty acid chain (C_8-C_{18})	Fe^{3+}, Fe^{2+}, Cu^{2+}, Hg^{2+}

ที่มา: Hasan et al. (2009)

2.3.4 การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ไลเปส

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญทางเทคโนโลยีชีวภาพถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เอนไซม์ไลเปสส่วนใหญ่ผลิตมาจากจุลินทรีย์กลุ่มที่มีความสามารถสูงในการผลิตเอนไซม์ไลเปสซึ่งมีบทบาทอย่างยิ่งในทางการค้า (Gupta et al., 2004) สำหรับการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ไลเปสมีดังนี้ อุตสาหกรรมโอลิโอเคมี ผลิต Biodegradable polymers หรือ ไบโอโพลีเมอร์ ผลิตไบโอดีเซลอุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมสารทำความสะอาด อุตสาหกรรมอาหาร ผลิต Racemic mixtures อุตสาหกรรมยาและเวชภัณฑ์สารปราบศัตรูพืชการสังเคราะห์กลิ่น เครื่องสำอาง Biosensor บำบัดน้ำเสียและกากของเสีย เป็นต้น (Jaeger & Eggert, 2002; Hasan, Shah, & Hameed, 2006)

2.4 การนำแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันไปใช้ประโยชน์ด้านการบำบัดน้ำเสีย

ส่วนใหญ่แล้วน้ำมันและไขมันในน้ำเสียจากบ้านเรือน ฟาร์มเลี้ยงสัตว์ หรืออุตสาหกรรมอาหารมักจะอยู่ในรูปของไตรเอซิลกลีเซอรอล (Cammarota & Freire, 2006) ซึ่งจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายได้ด้วยเอนไซม์ไลเปสโดยเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสดังที่กล่าวมาข้างต้น มีหลายรายงานวิจัยได้ใช้ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ไลเปสที่มีสภาพเป็นด่างหรือกรดเพื่อย่อยสลายน้ำมันและไขมัน เช่น การใช้เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Candida rugosa* ย่อยสลายน้ำเสียชุมชนและทำความสะอาดท่อน้ำทิ้งและส้วมซึม (Jaeger & Reetz, 1998) หรือเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa*เพื่อบำบัดน้ำเสียจากร้านอาหาร (Dharmsthiti & Kuhasuntisuk, 1998) และเอนไซม์ไลเปสยังสามารถย่อยสลายโพลีเมอร์และสารเหนียวข้นที่ปนเปื้อนด้วยเอสเทอร์สังเคราะห์ที่ปนเปื้อนในน้ำเสียจากกระบวนการเจาะหลุมน้ำมันได้อีกด้วย (Alipat, Perie, Zurdo, & Martingon, 1998) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาจุลินทรีย์เหล่านี้ให้มีประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันสูงขึ้นเพื่อใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมันและไขมันสูงอีกด้วย ดังเช่น จุลินทรีย์สายพันธุ์WW07P ซึ่งมีส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิวและสารแทรกซึม (Penetrant) ที่ช่วยให้การย่อยสลายไขมันเกิดขึ้นได้ดี (Hasan et al., 2009) แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันมีบทบาทอย่างมากในการบำบัดน้ำเสียจากบ้านเรือนและถังหมักแบบไม่ใช้อากาศ (Godfrey & Reichelt, 1983) โดยขั้นตอนในการกำจัดน้ำมันและไขมันในน้ำเสียโดยแบคทีเรียมี 2 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ ขั้นตอนที่ 1 การย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียโดยการทำให้สารต่างๆ ละลายน้ำและง่ายต่อการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ขั้นตอนที่ 2 การย่อยสลายแบบไม่ใช้อากาศ สารโมเลกุลขนาดใหญ่จะแตกตัวกลายเป็นสารโมเลกุลขนาดเล็ก เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ร่วมกัน (เช่น เอนไซม์โปรติเอส เอนไซม์ไลเปส และเอนไซม์กลูโคซิเดส) ในขั้นตอนนี้เองที่เริ่มเกิดเป็นกากตะกอนน้ำเสียขึ้นจากงานวิจัยของ Hsu, Jones, Foglia, and Marmer (2002) คัดแยก *Pseudomonas cepacia*จากน้ำเสียร้านอาหารที่มีไขมันสูง ไขมันประเภทนี้เป็น Simple alkyl ester derivatives โดย *P. cepacia* จะย่อยสลายไขมันด้วยกระบวนการ Methanolysis และ Ethanolysis นอกจากนี้ Parmar, Singh, and Ward (2001) ได้ใช้เอนไซม์โปรติเอส เอนไซม์ไลเปส และเอนไซม์กลูโคซิเดส ทำงานร่วมกันในการบำบัดน้ำเสีย พบว่าสามารถกำจัดค่าของแข็งละลายน้ำทั้งหมด (Total suspended solid; TSS) ได้ร้อยละ 30-50 และมีผลต่อการตกตะกอนของกากตะกอนน้ำเสียอีกด้วย โดยการกำจัดของแข็งในน้ำเสียจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์

งานวิจัยนี้สนใจที่จะคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันสูง เนื่องจากแบคทีเรียสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย ใช้เวลาการเจริญน้อยกว่าราและยีสต์ อีกทั้งมีความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Matsumiya, Wakita, Kimura, Sampa, and Kubo (2007) ศึกษา *Bukholderia* sp. DW2-1 ซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างดินและความสามารถในการย่อยสลายไขมันโดยศึกษาการย่อยสลายไขมันของแบคทีเรียนี้ที่อุณหภูมิต่างๆ ผลการศึกษาพบว่า *Bukholderia* sp. DW2-1 มีอัตราการย่อยสลายสูงสุด โดยใช้สับสเตรทประเภทต่างๆ ดังนี้ น้ำมันสลัด น้ำมันมะกอก น้ำมันงา และไขมันวัว คิดเป็นร้อยละ 96.70, 92.30, 90.10 และ 77.40 ตามลำดับ ใช้เวลาเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง โดยแบคทีเรียนี้สามารถเจริญได้ดีในอาหารสังเคราะห์ผสมน้ำเสียที่ปริมาณมากกว่า 1×10^{10} CFU ต่อมิลลิลิตรที่อุณหภูมิระหว่าง 20 - 38 °C มีอัตราการย่อยสลายน้ำมันสลัดมากกว่าร้อยละ 90 ขึ้นไป และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 1,720 ยูนิตต่อลิตรหรือ 1.72 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และค่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ (Biosurfactant; BSF) 480 ยูนิตต่อลิตร หรือ 0.48 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลาเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง

Savitha et al. (2007) คัดแยกราจากตัวอย่างดินพื้นที่ต่างๆ เมืองบังกาลอร์ (Bangalore) ประเทศอินเดีย จำนวน 32 ไอโซเลท และเป็นราที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน จำนวน 4 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 12.50 ได้แก่ *Aspergillus* sp. 3 ไอโซเลท และ *Mucor* sp. 1 ไอโซเลท โดย *Mucor* sp. มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดบนอาหาร Rhodamine B แสดงวงฟลูออเรสเซนต์ขนาด 350 นาโนเมตร มีสภาวะที่เหมาะของการผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ พีเอช 10 อุณหภูมิ 40 °C และแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด คือ น้ำมันดอกทานตะวัน

Liu, Chen, and Chang (2007) คัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีสภาพเป็นกรดจากเศษอาหาร ได้แบคทีเรีย จำนวน 16 ไอโซเลท ซึ่งทุกไอโซเลทมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสอยู่ในระดับสูงที่พีเอช 6 และ *Aeromonas* sp. C14 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด เท่ากับ 0.70 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Čipinytė et al. (2009) ทดสอบการย่อยสลายไขมันของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อม ในเบื้องต้นมีจุลินทรีย์ทดสอบ จำนวน 124 ไอโซเลท และมีจุลินทรีย์ที่ผ่านการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไขมัน จำนวน 5 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 4.03 ได้แก่ UP2, F2, E13, K11 และ N3 เมื่อทดสอบค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสพบว่าไอโซเลท E13 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดมากกว่าไอโซเลทอื่นๆ ที่เวลาเพาะเลี้ยง 8 และ 48 ชั่วโมง E13 มีค่า 0.32 ± 0.00 และ 0.45 ± 0.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ไอโซเลท E13 ถูกจัดจำแนกเป็น *Enterobacter aerogens* นอกจากนี้ ไอโซเลท N3 ยังได้แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสอยู่ในระดับสูง ที่เวลาเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.41 ± 0.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและถูกจัดจำแนกเป็น *Arthrobacter* sp. สำหรับการทดสอบการย่อยสลายไขมันโดยใช้น้ำมันดอกทานตะวันเป็นแหล่งคาร์บอน และเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท E13 ร่วมกับไอโซเลท N3 ที่อุณหภูมิ 30 °C เวลาเพาะเลี้ยง 8-72 ชั่วโมง พบว่าอัตราการย่อยสลายและอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นไปอย่างรวดเร็วในช่วง 8 ชั่วโมง

แรก หลังจากนั้นเมื่อครบ 72 ชั่วโมง สามารถย่อยสลายไขมันถึงร้อยละ 90 ทั้งนี้ อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์เริ่มคงที่ที่เวลา 56 ชั่วโมง

Prasad and Manjunath (2011) ศึกษาการบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมันและไขมันสูงด้วยแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Bacillus lichenuformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginsa* และ *Staphylococus aureus* ซึ่งคัดแยกได้จากดินจากแหล่งที่ใกล้อุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มและบ่อฝังกลบขยะชุมชน สำหรับน้ำเสียที่นำมาทดลองบำบัด มีดังนี้ อุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม โรงฆ่าสัตว์ อุตสาหกรรมสบู่ และน้ำเสียชุมชน ผลการศึกษาพบว่า *P. aeruginosa* สามารถกำจัดค่า BOD และค่าน้ำมันและไขมันของน้ำเสียทุกประเภทได้ดีที่สุด มีค่า BOD ที่ลดได้อยู่ระหว่าง 9 – 145 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าน้ำมันและไขมันที่ลดได้อยู่ระหว่าง 17 - 325 มิลลิกรัมต่อลิตร

Odeyemi, Aderiye, and Bamidele (2013) คัดแยกแบคทีเรีย จำนวน 32 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันจากน้ำเสียร้านอาหารและแหล่งน้ำที่ปนเปื้อนน้ำมันปาล์ม แบคทีเรียเหล่านี้แบ่งเป็น 6 จีนัส ได้แก่ *Enterococcus* sp., *Escherichia* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp. และ *Staphylococcus* sp. ค่าน้ำหนักแห้งของทุกไอโซเลทที่เวลาเพาะเลี้ยง 12 ชั่วโมง อยู่ระหว่าง 0.33 - 0.60 มิลลิกรัมและเวลาเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง อยู่ระหว่าง 0.25 - 0.51 มิลลิกรัมระยะเวลาเจริญที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 5-7 วัน และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสอยู่ระหว่าง 0.04-0.07 มิลลิโมลาร์ต่อนาทีต่อมิลลิลิตร โดย *Pseudomonas* sp. มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุด ที่เวลาเพาะเลี้ยง 12 ชั่วโมง

Patcha and Wiyada (2013) คัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสจากดินปนเปื้อนน้ำมันพืชใช้แล้วในจังหวัดขอนแก่น ผลการวิจัยพบว่า *Pseudomonas aeruginosa* NA37 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดมากว่าไอโซเลทอื่น และสภาวะที่เหมาะของการผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ พีเอช 9 อุณหภูมิ 30 °C มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงถึง 481 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตรหรือ 0.48 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และน้ำมันปาล์มใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด

Affandi, Suratman, Abdullah, Ahmad, and Zakaria (2014) ศึกษาการใช้แบคทีเรียกำจัดน้ำมันและไขมันในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอาหารเครื่องใช้ไฟฟ้า อิเล็กทรอนิกส์ และน้ำมันปาล์ม (Oil palmหรือ POME) สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันได้ จำนวน 3 ไอโซเลท คือ *Serratia marcescens* EU555434, *Aeromonas hydrophila* KF049214 และ *Bacillus cereus* KJ605415 โดยแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทสามารถกำจัดน้ำมันและไขมันในน้ำเสียได้แตกต่างกัน ดังนี้ *S. marcescens* เหมาะสมกับการกำจัดน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว ส่วน *B. cereus* เหมาะสมกับการกำจัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมประเภท POME และ *A. hydrophila* เหมาะสมกับการกำจัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิกส์ ทั้งนี้พบว่า *S. marcescens* มีค่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ (BSF) และค่าการยึดเกาะของแบคทีเรียบนไฮโดรคาร์บอน

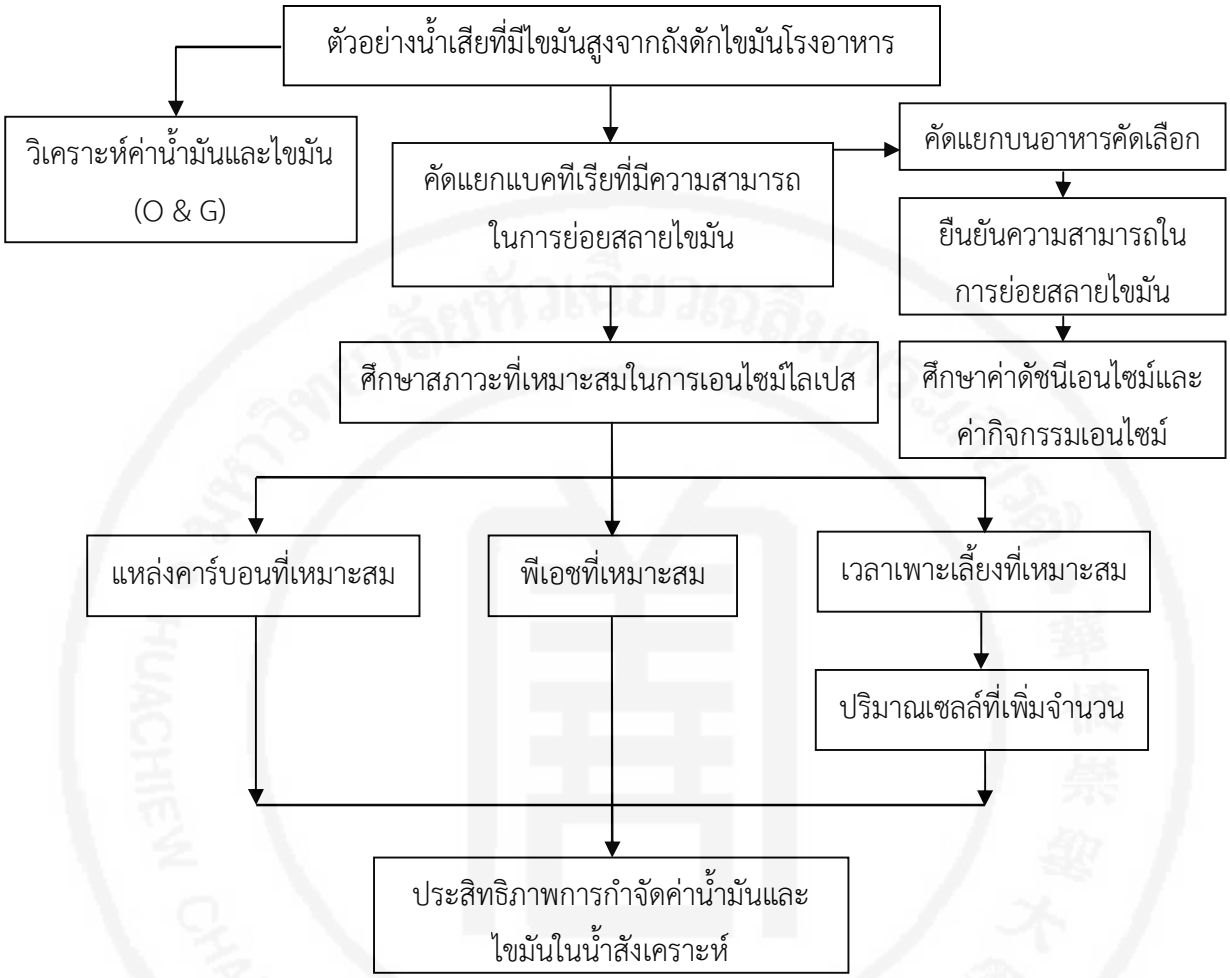
(Bacterial adherence to hydrocarbon; BATH) สูงสุด และสามารถย่อยสลายน้ำมันและไขมันได้ถึงร้อยละ 91 ที่พีเอช 7 ใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน

Namwong and Tanasupawat (2014) คัดแยกแบคทีเรีย *Staphylococus xylosus* CH1-8 ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพจากปลาร้าหมัก โดยสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส คือ พีเอช 7 อุณหภูมิ 37 °C และเจริญได้ที่ปริมาณเกลือร้อยละ 0-5 (w/v) สามารถย่อยน้ำมันทานตะวัน น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันรำข้าวได้ มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และค่าการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ (BSF) 52mN ต่อมิลลิลิตรเวลาเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง

Phong, Duyen, and Diep (2014) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำเสียโรงงานผลิตอาหารและร้านอาหาร เมืองเกิ่นเทอ (Can Tho) ประเทศเวียดนาม คัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 102 ไอโซเลท และมี 6 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 5.88 เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน แบ่งเป็น 5 จีนัส ได้แก่ *Acenitobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Stenotrophomoas* sp. และ *Bacillus* sp. โดย*Acenitobacter* sp. MT9 แสดงความสามารถในการย่อยสลายไขมันได้ดีที่สุดบนอาหารทดสอบ Tween20 แสดงวงใสขนาด 40 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 30 °C เวลาเพาะเลี้ยง 96 ชั่วโมง

Soares, Facundes, Junior, and de Silva (2015) คัดแยกจุลินทรีย์มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันจากตัวอย่างดินบริเวณเพาะปลูกถั่ว *Caryocar brasiliense* เมือง Gurupi รัฐ Tocantins ประเทศบราซิล ได้แบคทีเรีย จำนวน 17 ไอโซเลท และยีสต์ 35 ไอโซเลท โดยแบคทีเรีย ไอโซเลท AP5 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 0.07 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและยีสต์ ไอโซเลท AS16 มีค่าเท่ากับ 0.07 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สภาวะในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม มีดังนี้ อาหารเพาะเลี้ยงคืออาหารที่มีน้ำมันมะกอก ร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอนและเติมกลูโคสร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิ 40 °C เวลาเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง

2.6 กรอบแนวคิดในการวิจัย



บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

งานวิจัยนี้มีรูปแบบการวิจัยเป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research) แบบทดลองในห้องปฏิบัติการ (Laboratory experiment) เพื่อศึกษาปริมาณน้ำมันและไขมันในตัวอย่างน้ำเสียจากถังดักไขมัน และคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันจากน้ำเสียของถังดักไขมัน หลังจากนั้นได้นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาศึกษาสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส รวมทั้งศึกษาถึงประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3.1ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรของงานวิจัยนี้คือ น้ำเสียที่มีไขมันสูงจากถังดักไขมันของร้านจำหน่ายอาหาร กลุ่มตัวอย่างคือ ตัวอย่างน้ำเสียที่มีไขมันสูงจากถังดักไขมันของร้านจำหน่ายอาหาร จำนวน 10 ตัวอย่าง ภายในโรงอาหาร1 มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

3.2 เครื่องมือที่ใช้เก็บข้อมูล

3.2.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- Filter paper diameter 47 mm. (Whatman, Buckinghamshire, United Kingdom)
- Cellulose extraction Thimble size 30 mm. × 100 mm. (Whatman, Buckinghamshire, United Kingdom)
- Auto pipette P10 P100 P1000 P5000 (FINPIPETTE, Massachusetts, United States)
- Incubator (MEMMERT, Schawabach, Germany)
- Hot air oven (MEMMERT, Schawabach, Germany)
- Autoclave (Sanyo Labo Autoclave, Gunma, Japan)
- Shaking incubator (LabTech Daihan, New Delhi, India)
- Water bath (MEMMERT, Schawabach, Germany)
- High speed microcentrifuge (Sartorius, Goettingen, Germany)
- Vacuumpump (Sartorius stedim biotech, Goettingen, Germany)
- Classic soxhlet apparatus (Gerhardt, Königswinter, Germany)
- Balance 3 digital (Sartorius, Goettingen, Germany)
- Balance 4 digital (Mettler, Greifensee, Switzerland)

- Spectrophotometer (Thermo SCIENTIFIC, Massachusetts, United States)
- pH bench (QHAUS, Shanghai, China)
- Deep freezer (Haier, Qingdao, China)
- Refrigerator (Panasonic, Osaka, Japan)
- Glassware (Pyrex, Massachusetts, United States)

3.2.2 สารเคมี

- Amonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$) (UNIVAR, New South Wales, Australia)
- Bromocresol purple (LABCHEM, New South Wales, Australia)
- Calcium chloride ($CaCl_2$) (UNIVAR, New South Wales, Australia)
- Celite 545 coarse (Sigma-Aldrich, Missouri, United States)
- Ethyl alcohol 95% (Alcoh-A, Bangkok, Thailand)
- Glycerol 99.5% (QRëC, New Zealand)
- Gum arabic powder (ACROS ORGANICS, New Jersey, United States)
- n-Hexane 99% (QRëC, New Zealand)
- Magnesium Sulfate Heptahydrate ($MgSO_4.7H_2O$) (UNIVAR, New South Wales, Australia)
- Mono sodium phosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.2H_2O$) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- 4-nitrophenyl palmitate (Sigma-Aldrich, Missouri, United States)
- Nitric acid 70% (QRëCs, New Zealand)
- Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (UNIVAR, New South Wales, Australia)
- Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) (UNIVAR, New South Wales, Australia)
- 2-propanol (QRëC, New Zealand)
- Sodium carbonate (Na_2CO_3) (UNIVAR, New South Wales, Australia)

- Sodium chloride (NaCl) (UNIVAR, New South Wales, Australia)
- Sodium dihydrogen phosphate monohydrate (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Sodium deoxycholate (HIMEDIA, Mumbai, India)
- Sodium hydroxide pellets (QRëC, New Zealand)
- Sodium sulfate Anhydrous (Na_2SO_4) (QRëC, New Zealand)
- Sulfuric acid 98% (H_2SO_4) (QRëC, New Zealand)
- Tributyrin 98% (ACROS ORGANICS, New Jersey, United States)
- Tween80 (LABCHEM, New South Wales, Australia)

3.2.3 อาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

- Agar powder (HIMEDIA, Mumbai, India)
- Cystine tryptic agar (HIMEDIA, Mumbai, India)
- Nutrient broth (HIMEDIA, Mumbai, India)
- Peptone (HIMEDIA, Mumbai, India)
- Yeast extract (HIMEDIA, Mumbai, India)
- น้ำมันพืชสำหรับปรุงอาหาร (Commercial cooking oil) ได้แก่ น้ำมันปาล์ม, น้ำมันดอกทานตะวัน, น้ำมันรำข้าว, น้ำมันกากถั่วเหลือง, น้ำมันมะกอก และน้ำมันมะพร้าว

3.2.4 ค่าที่วิเคราะห์และวิธีการวิเคราะห์

ค่าที่วิเคราะห์และวิธีการวิเคราะห์มีดังนี้

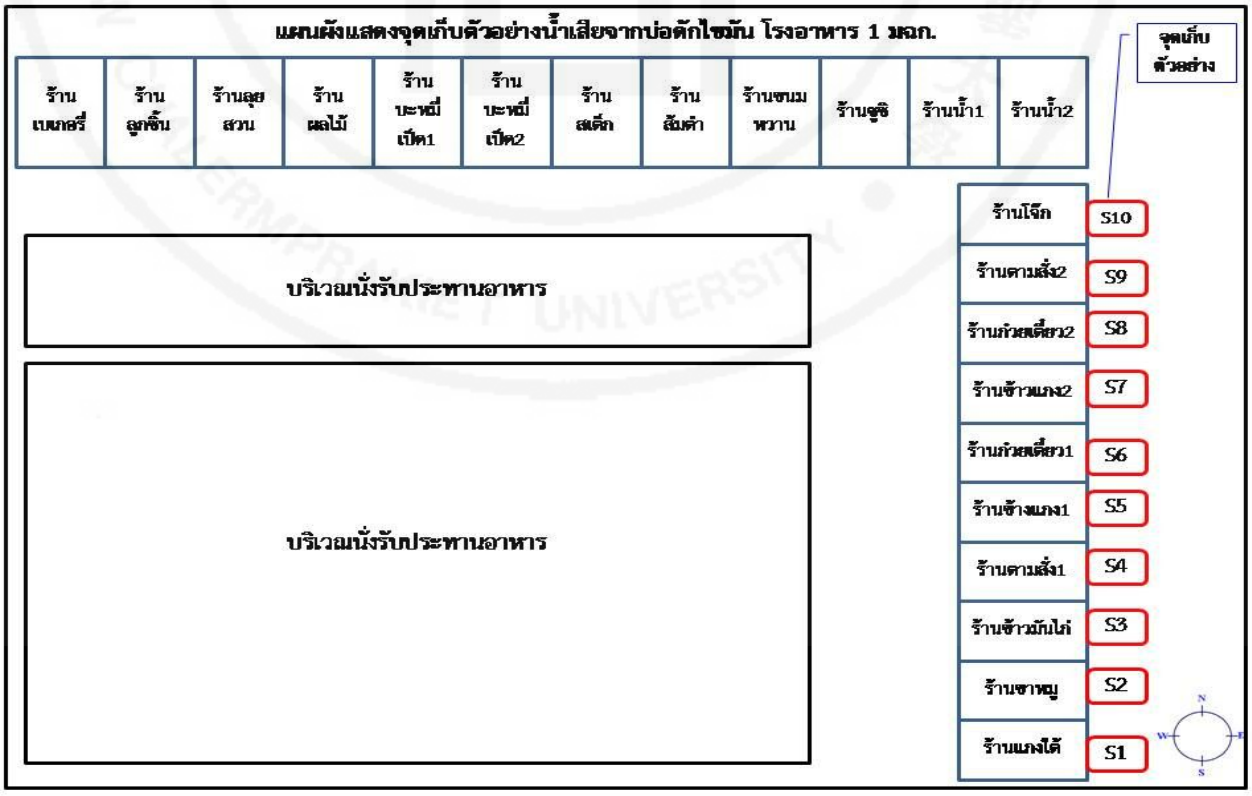
ค่าที่วิเคราะห์	วิธีการวิเคราะห์
(1) ค่าน้ำมันและไขมัน (O & G)	วิธี Soxhlet extraction (APHA, 2012)
(2) ค่ากิจกรรมดัชนีเอนไซม์ไลเปส (EI)	วิธีวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (Hendrick, Doyle, & Hugley, 2007)
(3) ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (EA)	Colorimetric method โดยใช้ p-nitrophenyl palmitate (pNPP) เป็นสับสเตรท (Hoshino, Sasaki, Watanabe, Nagasawa, & Yamane, 1992)

3.3การเก็บตัวอย่างน้ำเสีย

ตัวอย่างน้ำเสียที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ น้ำเสียที่มีไขมันสูงที่เก็บจากถังดักไขมันของร้านจำหน่ายอาหาร โรงอาหาร 1 มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ทำการสุ่มตัวอย่างแบบวัตถุประสงค์เฉพาะ (Purposive sampling)เนื่องจากงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำเสียที่มีไขมันสูง ดังนั้น ถังดักไขมันที่เป็นจุดเก็บตัวอย่างต้องมีน้ำเสียที่มีสภาพทางกายภาพมีน้ำมันและไขมันลอยปรากฏอย่างชัดเจน ดำเนินการเก็บตัวอย่างน้ำเสียแบบจ้วง (Grab sampling) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดแก้วสะอาดแบบปากกว้างมีฝาเกลียวปิดมิดชิด นำตัวอย่างมายังห้องปฏิบัติการเพื่อดำเนินการวิจัยทันที ช่วงระยะเวลาเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ตัวอย่างตั้งแต่เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2559 ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2560 รวมจุดเก็บตัวอย่างรวมทั้งหมด 10 จุด ช่วงเวลาการเก็บตัวอย่างประมาณ 09.00 – 17.00 น. (ช่วงเวลาที่โรงอาหารเปิดดำเนินการ) รายละเอียดจุดเก็บตัวอย่างแสดงในภาพที่ 5

การรักษาสภาพตัวอย่างน้ำเสียมีดังนี้ ตัวอย่างน้ำเสียที่สำหรับวิเคราะห์ค่าน้ำมันและไขมัน ทำการรักษาสภาพตัวอย่างโดยเติมกรดไนตริกเข้มข้น จนพีเอชน้อยกว่า 2 และแช่เก็บรักษาในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 4 °C และตัวอย่างน้ำเสียที่ต้องนำมาคัดแยกแบคทีเรียหากไม่สามารถดำเนินการวิจัยได้ทันทีจะทำการรักษาสภาพตัวอย่างน้ำเสียโดยแช่เก็บรักษาที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 4 °C (APHA, 2012)

ภาพที่ 5 จุดเก็บตัวอย่างน้ำเสียที่มีไขมันสูง



(1) ร้านข้าวแกง จำนวน 3 ร้าน คือ S1, S5 และ S7
(2) ร้านอาหารตามสั่ง จำนวน 2 ร้าน คือ S4 และ S9
(3) ร้านอาหารจานเดียว จำนวน 2 ร้าน คือ S2 และ S3
(4) ร้านก๋วยเตี๋ยว จำนวน 3 ร้าน คือ S6, S8 และ S10

3.4 การดำเนินการวิจัย

3.4.1 การวิเคราะห์ค่าน้ำมันและไขมันในตัวอย่างน้ำเสีย

ตัวอย่างน้ำเสีย จำนวน 10 ตัวอย่าง ปริมาตร 5-50 มิลลิลิตร ถูกนำมาวิเคราะห์ค่าน้ำมันและไขมัน (O & G) ด้วยวิธี Soxhlet extraction (ภาพที่ 6) ตามวิธีการของ APHA (2012) หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตรรายละเอียดวิธีวิเคราะห์ตามภาคผนวก ก

ภาพที่ 6 การวิเคราะห์ค่าน้ำมันและไขมันในตัวอย่างน้ำเสียจากถังดักไขมัน

3.4.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน

3.4.2.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน

งานวิจัยนี้ได้คัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันโดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงแบบเพิ่มพูน (Enrichment culture method) ดัดแปลงจาก Chigusa, Hasegawa, Yamamoto, and Watanabe (1996) และสุรอรรถ ศุภจัตุรัส และคณะ (2550) ดังนี้

(1) การเพาะเลี้ยงเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแบบเพิ่มพูน (Enrichment culture method) มีดังนี้ ปิเปตตัวอย่างน้ำเสีย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มเข้มข้นร้อยละ2 (v/v) (Enrichment medium with palm oil 2% : EMP2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

นำไปนำไปเติมอากาศด้วยวิธีการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 2 วัน (ครั้งที่ 1) ด้วยเครื่องเขย่าแบบวน (Rotary shaker)

(2) ถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเหลว EMP2 ใหม่อีกครั้ง เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 2 วัน (ครั้งที่ 2)

(3) ถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเหลว EMP2 ใหม่อีกครั้ง นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 2 วัน (ครั้งที่ 3)

(4) นำหลอดตัวอย่างมาทำการเจือจางด้วยวิธีเจือจางลงครั้งละ 10 เท่า (10-Fold serial dilution) ที่ระดับเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} และ 10^{-8} ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น ร้อยละ 0.85 (NaCl 0.85%)

(5) นำหลอดตัวอย่างแต่ละระดับการเจือจางไปเกลี่ย (Spread) บนจานอาหารแข็งที่มีน้ำมันปาล์มเข้มข้นร้อยละ 1 และเติมสาร Bromocresol purple (Screening medium with palm oil 1% and Bromocresol purple : SMP1B) บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดแยกแบคทีเรียเป้าหมายที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน โดยมีลักษณะโคโลนีบนจานอาหาร SMP1B ดังนี้ โคโลนีสีเหลืองและเกิดบริเวณสีเหลืองแผ่รอบโคโลนี คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะและขนาดแตกต่างกัน อย่างน้อย 3-5 โคโลนีต่อตัวอย่าง

(6) นำโคโลนีไปเพาะเลี้ยงแบบจุด (Spot) บนจานอาหารแข็ง SMP1B ใหม่อีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดแยกแบคทีเรียเป้าหมายที่มีโคโลนีสีเหลืองบนอาหาร SMP1B agar

3.4.2.2 การยืนยันแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน

แบคทีเรียที่คัดแยกได้ถูกนำมายืนยันว่าเป็นแบคทีเรียเป้าหมายที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน โดยทดสอบการย่อยสลายน้ำมันบนจานอาหารทดสอบที่เติมสารไตรบิวไทรีนเข้มข้น ร้อยละ 1 (Tributyrin agar 1 %) ดังนี้ นำโคโลนีจากข้อ 3.4.2.1 ทุกไอโซเลทไปเพาะเลี้ยงแบบจุดบนจานอาหาร Tributyrin agar 1 % บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 48-96 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่เกิดวงใสรอบโคโลนีบนจานอาหารทดสอบถือเป็นแบคทีเรียเป้าหมายที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน (Lipid-degrading bacteria) และนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.4.2.3 การวิเคราะห์ค่าดัชนีเอนไซม์และค่ากิจกรรมเอนไซม์

(1) ค่าดัชนีเอนไซม์ (Enzyme index: EI) แบคทีเรียเป้าหมายที่ผ่านการยืนยันแล้วจาก ข้อ 3.4.2.2 นำไปเพาะเลี้ยงแบบจุดบนจานอาหาร Tributyrin agar 1 % บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 2 วัน ทำการทดลองแบบ 3 ซ้ำ วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีเพื่อหาค่าดัชนีเอนไซม์ไลเปส (Hendrickset al., 1995) รายละเอียดตามภาคผนวก ก

(2) ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (Enzyme activity : EA) แบคทีเรียเป้าหมายที่ผ่านการยืนยันแล้วจาก ข้อ 3.4.2.2 นำไปเพาะเลี้ยงในหลอดอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มเข้มข้นร้อยละ 1 (Screening medium with palm oil 1% : SMP1) นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 2 วัน ทำการทดลองแบบ 3 ซ้ำ หลังจากนั้นทำการสกัดเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีการสกัดอย่างหยาบ (Crude enzyme extraction) ดังนี้ ปิเปตเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่ปราศจากเชื้อ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ด้วยเครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์ ดูดสารละลายส่วนใส (Supernatant) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เก็บในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ ได้เป็นสารสกัดเอนไซม์ไลเปสอย่างหยาบ (Crude enzyme) นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C สำหรับการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี Colorimetric methodใช้ p-nitrophenyl palmitate (pNPP) เป็นสับสเตรท หน่วยเป็นยูนิตต่อมิลลิลิตร (Hoshino et al., 1992; Patcha & Wiyada, 2013) รายละเอียดดังภาคผนวก ก

3.4.2.4 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน

เก็บรักษาแบคทีเรียที่คัดแยกได้บนจานอาหารแข็งที่มีน้ำมันปาล์มเข้มข้นร้อยละ 1 (Screening medium with palm oil 1% : SMP1) ที่อุณหภูมิ 4 °C ถ่ายเชื้อลงอาหารสูตรเดิมทุก 14 วัน และเก็บรักษาในอาหารเหลวนิวเตรียนท์ที่เติมกลีเซอรอลเข้มข้น ร้อยละ 30 (v/v) และน้ำมันปาล์มเข้มข้น ร้อยละ 1 (v/v) (Nutrient broth + Gycerol 30%+ Palm oil 1%) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C (ได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์)

3.4.3 การศึกษาสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียเป้าหมาย

3.4.3.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อบริสุทธิ์จากหลอดเชื้อที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C ไปเพาะเลี้ยงในหลอดอาหารเหลว SMP1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 2 วัน ทำการทดลองแบบ 3 ซ้ำ หลังนั้นนำไปทดสอบการใช้น้ำมันชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ได้แก่ น้ำมันปาล์ม น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันรำข้าว น้ำมันกากถั่วเหลือง น้ำมันมะกอก และน้ำมันมะพร้าว ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 (v/v) ดังนี้ ปิเปตเชื้อที่เพาะเลี้ยง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเหลว SMP1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เติมน้ำมันชนิดต่างๆ นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นดูดเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปสกัดเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีการสกัดอย่างหยาบและวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

3.4.3.2 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อบริสุทธิ์จากหลอดเชื้อที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C มาเพาะเลี้ยงในหลอดอาหารเหลว SMP1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 2 วันทำการทดลองแบบ 3 ซ้ำ หลังนั้นนำไปทดสอบผลผลิตเอนไซม์ไลเปสที่เพาะเลี้ยงในพีเอชต่างๆ จำนวน 8 ค่า ได้แก่ พีเอช 4, พีเอช 5, พีเอช 6, พีเอช 7, พีเอช 8, พีเอช 9, พีเอช 10 และพีเอช 11 ดังนี้ ปิเปตเชื้อที่เพาะเลี้ยง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเหลว SMP1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่เติมปรับพีเอชต่างๆ นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้น ดูดเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปสกัดเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีการสกัดอย่างหยาบและวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

3.4.3.3 การศึกษาระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม

ถ่ายเชื้อบริสุทธิ์จากหลอดเชื้อที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C มาเพาะเลี้ยงในหลอดอาหารเหลว SMP1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 2 วัน ทำการทดลองแบบ 3 ซ้ำ หลังนั้นนำไปทดสอบระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม ได้แก่ 24 ชั่วโมง, 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง ดังนี้ ปิเปตเชื้อที่เพาะเลี้ยง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดอาหารเหลว SMP1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 °C เมื่อครบตามระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่ศึกษา ดูดเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปสกัดเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีการสกัดอย่างหยาบและวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสำหรับการศึกษาปริมาณเซลล์ของแต่ละระยะเวลาเพาะเลี้ยงเพื่อหาระยะคงตัว (Stationary phase) ของแบคทีเรียเป้าหมาย มีดังนี้ นำเชื้อจากหลอดอาหาร SMP1 ของแต่ละระยะเวลาเพาะเลี้ยงมาทำการเจือจางลงครั้งละ 10 เท่า ที่ระดับเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-10} ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 และดูดเชื้อแต่ละระดับการเจือจาง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มานับปริมาณเซลล์บนจานอาหาร SMP1 ด้วยวิธี Drop plate หน่วยเป็นซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร

3.4.3.3 การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดค่าน้ำมันและไขมันของแบคทีเรียเป้าหมาย

นำแบคทีเรียเป้าหมายไปศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดค่าน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ ซึ่งเป็นการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ (Lab-scale experiment) ดังนี้

(1) การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายถ่ายเชื้อบริสุทธิ์จากหลอดเชื้อที่เก็บรักษา ไปเพาะเลี้ยงในหลอดอาหารเหลว SMP1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

(2) ถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำเสียสังเคราะห์ซึ่งเตรียมจากอาหารเหลว SMP1 เติมน้ำมันพืช ร้อยละ 1 (v/v) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงทำการทดลองแบบ 3 ซ้ำ

(3) นำน้ำเสียไปวิเคราะห์ค่าน้ำมันและไขมันด้วยวิธี Soxhlet extraction ของ APHA (2012)

3.5การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลของการศึกษาในครั้งนี้จะทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าร้อยละ

3.6ระยะเวลาของการทำวิจัย

ระยะเวลาทำการวิจัยตลอดโครงการ เป็นเวลา 1 ปี ตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ. 2559 ถึง เดือนมีนาคม พ.ศ. 2560

บทที่ 4
ผลการวิจัย

ผลการวิจัยแบ่งเป็น 4 ส่วน ดังนี้

4.1 ค่าน้ำมันและไขมันในตัวอย่างน้ำเสีย

4.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสารถในการย่อยสลายไขมัน

4.3 สภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของไอโซเลท NJS54

4.4 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์

4.1 ค่าน้ำมันและไขมันในตัวอย่างน้ำเสีย

ตัวอย่างน้ำเสียมีค่าน้ำมันและไขมันอยู่ในช่วงอยู่ระหว่าง 2,441– 215,200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยตัวอย่าง S7 ร้านข้าวแกงมีค่าน้ำมันและไขมันสูงที่สุด มีค่าเฉลี่ย 215,200 ± 8,626.70 มิลลิกรัมต่อลิตร และตัวอย่าง S10 ร้านก๋วยเตี๋ยวมีค่าน้ำมันและไขมันน้อยที่สุด มีค่าเฉลี่ย 2,441± 159.68 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าเฉลี่ยของค่าน้ำมันและไขมันของตัวอย่างน้ำเสียดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยของค่าน้ำมันและไขมันในตัวอย่างน้ำเสีย

ตัวอย่างน้ำเสีย	ค่าเฉลี่ยค่าน้ำมันและไขมัน (มิลลิกรัม/ลิตร)
S1 ร้านข้าวแกง	29,600 ± 1,272.79
S2 ร้านอาหารจานเดียว	24,480 ± 753.39
S3 ร้านอาหารจานเดียว	25,020 ± 1,385.93
S4 ร้านอาหารตามสั่ง	8,807 ± 883.88
S5 ร้านข้าวแกง	28,042 ± 1,190.30
S6 ร้านก๋วยเตี๋ยว	74,543 ± 1,190.37
S7 ร้านข้าวแกง	215,200 ± 8,626.70
S8 ร้านก๋วยเตี๋ยว	8,373±117.25
S9 ร้านอาหารตามสั่ง	9,670 ± 815.53
S10 ร้านก๋วยเตี๋ยว	2,441± 159.68

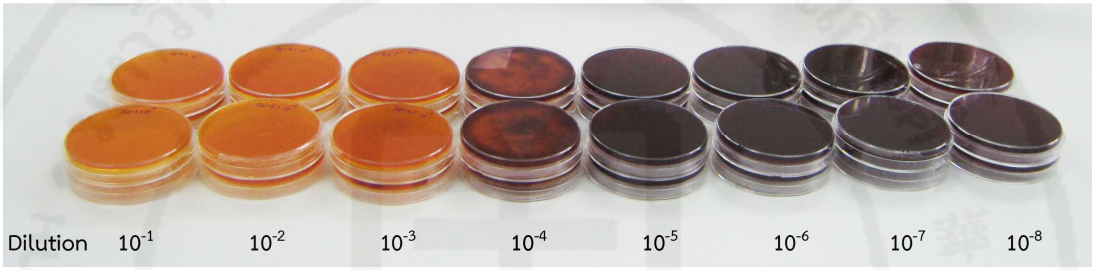
4.2 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน

การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันจากตัวอย่างน้ำเสียที่มีไขมันสูง ซึ่งเก็บจากถังดักไขมันของร้านจำหน่ายอาหาร ผลการวิจัยมีดังนี้

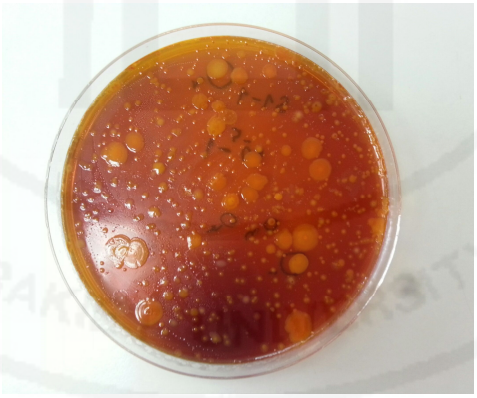
4.2.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันเบื้องต้น

งานวิจัยนี้คัดแยกแบคทีเรียเป้าหมายได้จากตัวอย่างน้ำเสียที่ระดับการเจือจาง 10^{-5} - 10^{-7} (ภาพที่ 7) โดยแบคทีเรียเป้าหมายที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันจะให้ลักษณะโคโลนีบนอาหาร SMP1B agar ดังนี้ โคโลนีสีเหลืองแผ่วงสีเหลืองรอบโคโลนี ขนาดอยู่ประมาณ 1-6 มิลลิเมตร และมีลักษณะมันเยิ้ม (ภาพที่ 8) และได้นำมาทดสอบซ้ำอีกครั้งโดยนำเชื้อบริสุทธิ์มาเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร SMP1B agar (ภาพที่ 9)

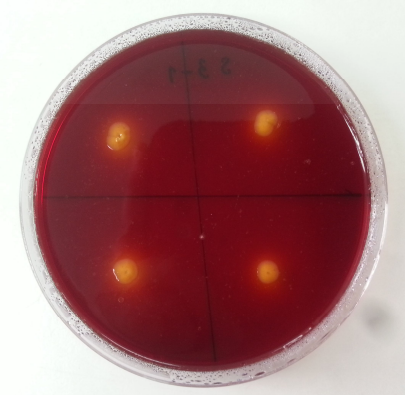
ภาพที่ 7 แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันบนจานอาหาร SMP1B agar ที่ระดับการเจือจาง 10^{-1} - 10^{-8}



ภาพที่ 8 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียเป้าหมายบนอาหาร SMP1B agar



ภาพที่ 9 ลักษณะโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ (แบคทีเรียเป้าหมาย) บนอาหาร SMP1B agar



งานวิจัยนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียเป้าหมายได้ทั้งหมด 41 ไอโซเลท โดยส่วนใหญ่คิดเป็นร้อยละ 31.71 ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้นี้มาจากตัวอย่างน้ำเสียร้านก๋วยเตี๋ยวที่มีค่าเฉลี่ยของค่าน้ำมันและไขมัน 28,279 มิลลิกรัมต่อลิตร แบคทีเรียที่คัดแยกได้หมดถูกตั้งชื่อเป็น NJS11 ถึง NJS105 (รายละเอียดตามภาคผนวก ค) ผลการคัดแยกแบคทีเรียเป้าหมายดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 จำนวนแบคทีเรียเป้าหมายที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำเสีย

ตัวอย่างน้ำเสีย	ค่าสูงสุด-ค่าต่ำสุดของค่าน้ำมันและไขมัน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวนไอโซเลท	ร้อยละ
ร้านข้าวแกง	28,042 - 215,200	12	29.27
ร้านก๋วยเตี๋ยว	2,441 - 74,543	13	31.71
ร้านอาหารจานเดียว	24,480 - 25,020	8	19.51
ร้านอาหารตามสั่ง	8,807 - 9,670	8	18.51
รวม		41	100.00

4.2.2 การยืนยันแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน

แบคทีเรียเป้าหมายทั้ง 41 ไอโซเลท ถูกนำไปยืนยันความสามารถในการย่อยสลายไขมัน โดยนำเชื้อบริสุทธิ์ไปเพาะเลี้ยงบนจานอาหาร Tributyrin agar 1% ผลการวิจัยดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9จำนวนแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันคัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำเสีย

ตัวอย่างน้ำเสีย	จำนวนแบคทีเรียเป้าหมายบนอาหาร SMP1B agar	แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันบนอาหาร Tributyrin agar1%	
		จำนวนไอโซเลท	ร้อยละของไอโซเลทที่ทดสอบทั้งหมด
ร้านข้าวแกง	12	1	2.44
ร้านก๋วยเตี๋ยว	13	1	2.44
ร้านอาหารจานเดียว	8	0	0.00
ร้านอาหารตามสั่ง	8	0	0.00
รวมทั้งหมด	41	2	4.88

พบว่ามี 2 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 4.88 ของไอโซเลททดสอบทั้งหมด แสดงความสามารถในการย่อยสลายไขมันเกิดวงใสรอบโคโลนีบนอาหารทดสอบ Tributyrin agar 1% ทั้งสองไอโซเลทนี้ถูกคัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียของร้านข้าวแกงซึ่งมีค่าน้ำมันและไขมันสูงที่สุดมากกว่าตัวอย่างน้ำเสียจากร้านอาหารประเภทอื่นๆ ไอโซเลทดังกล่าว ได้แก่ ไอโซเลท NJS54 คัดแยกได้จากจากตัวอย่าง S5 และไอโซเลท NJS72 คัดแยกได้จากจากตัวอย่าง S7 (ภาพที่ 10)

ภาพที่ 10 ลักษณะโคโลนีของไอโซเลท NJS54 และ NJS72 บนอาหาร Tributyrin agar 1%

NJS54 NJS72

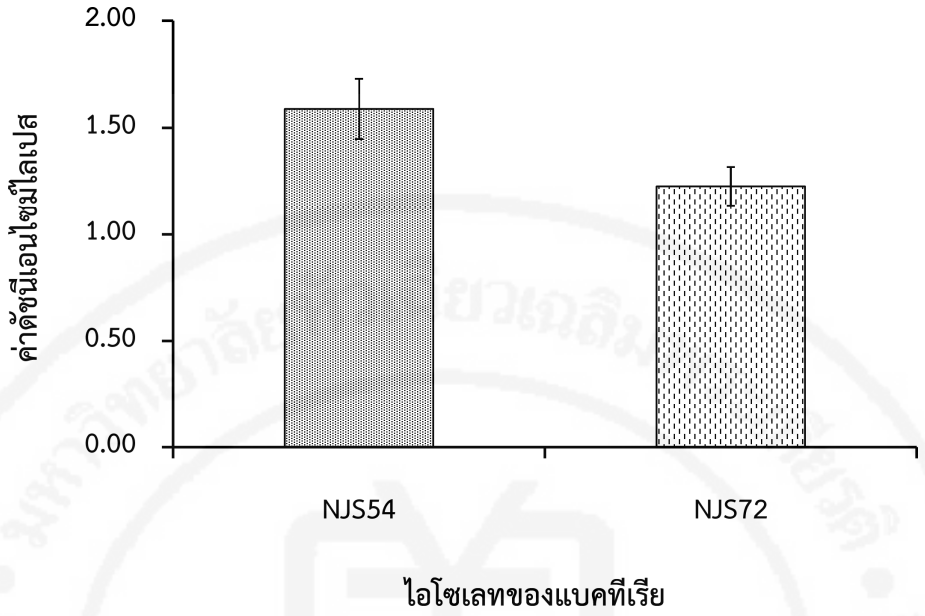
4.2.3 ค่าดัชนีเอนไซม์และค่ากิจกรรมเอนไซม์ของไอโซเลท NJS54 และไอโซเลท NJS72

ไอโซเลท NJS54 และไอโซเลท NJS72 ถูกนำมาศึกษาค่าดัชนีเอนไซม์ (Enzyme index) และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (Enzyme activities) ผลการวิจัยมีดังนี้

4.2.3.1 ค่าดัชนีเอนไซม์ (Enzyme index)

ค่าดัชนีเอนไซม์ของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากไอโซเลท NJS54 และไอโซเลท NJS72 วัดจากการทดสอบบนอาหาร Tributyrin agar1% ใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 3 วัน พบว่าไอโซเลท NJS54 มีค่าเฉลี่ยของค่าดัชนีเอนไซม์ไลเปส 1.59 $\pm$ 0.14 ซึ่งสูงกว่าไอโซเลท NJS72 ที่มีค่าเฉลี่ย 1.23 $\pm$ 0.09 (แผนภูมิที่ 1)

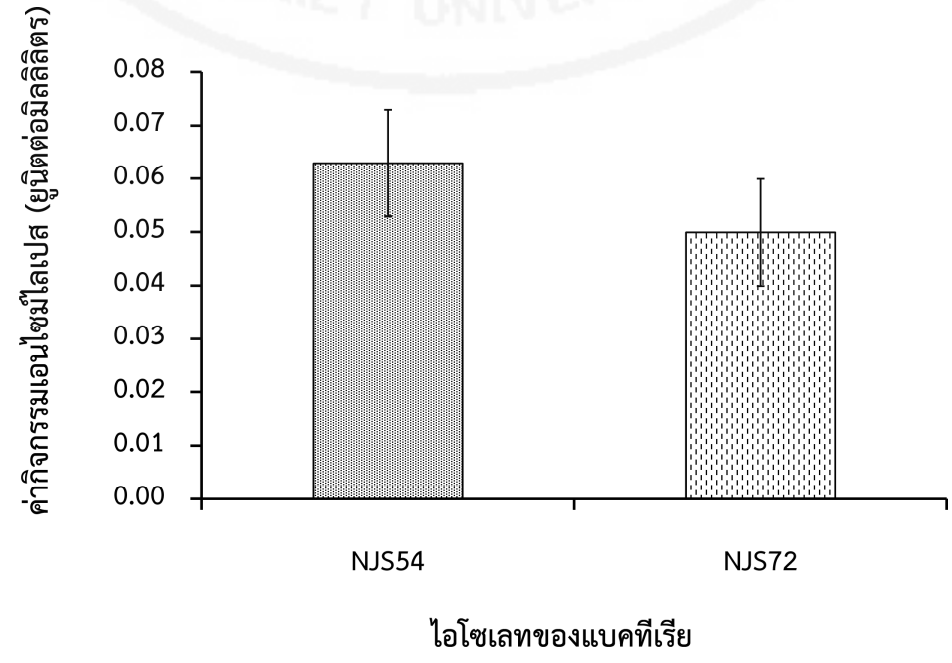
แผนภูมิที่ 1 ค่าดัชนีเอนไซม์ไลเปสของไอโซเลท NJS54 และ ไอโซเลท NJS72



4.2.3.2 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (Enzyme activities)

ค่ากิจกรรมเอนไซม์ของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากไอโซเลท NJS54 และไอโซเลท NJS72 วัดด้วยวิธี Colorimetric method โดยใช้ p-nitrophenyl palmitate (pNPP) เป็นสับสเตรท ใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 3 วัน พบว่าไอโซเลท NJS54 มีค่าเฉลี่ยของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 0.06 $\pm$ 0.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และไอโซเลท NJS72 ที่มีค่าเฉลี่ย 0.05 $\pm$ 0.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (แผนภูมิที่ 2)

แผนภูมิที่ 2 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของไอโซเลท NJS54 และไอโซเลท NJS72



เมื่อเปรียบเทียบค่าดัชนีเอนไซม์ไลเปสและค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ไอโซเลท NJS54 มีค่าสูงกว่า NJS72 ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเลือกไอโซเลท NJSN54 ไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

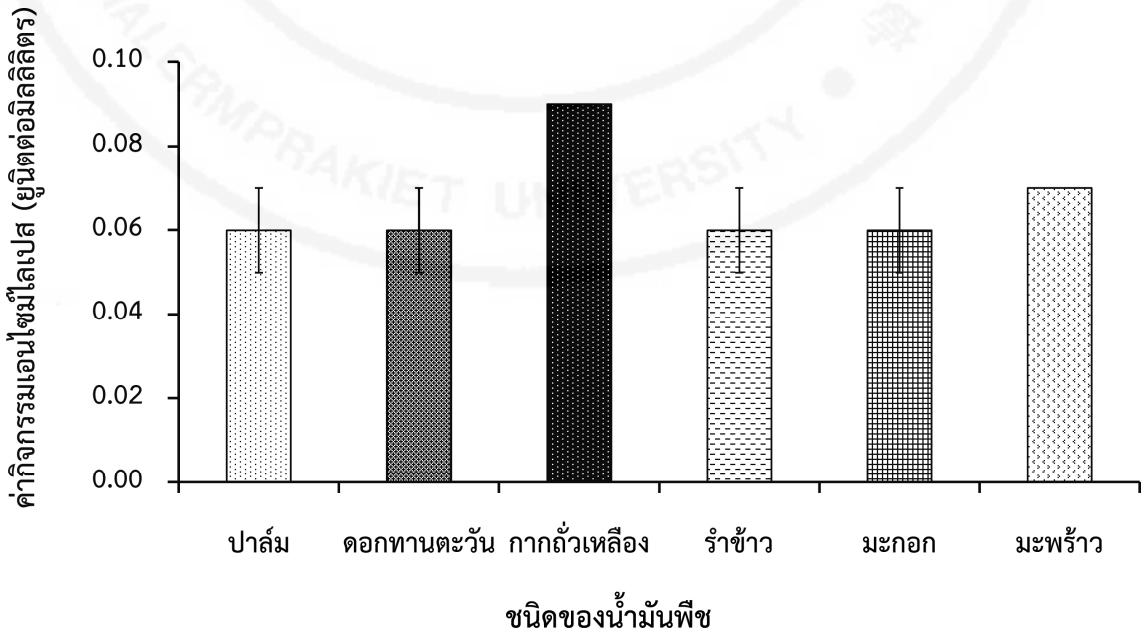
4.3 สภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของไอโซเลท NJS54

ผลการศึกษาสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ แหล่งคาร์บอน พีเอชที่ของอาหาร และระยะเวลาเพาะเลี้ยง ของไอโซเลท NJS54 มีดังนี้

4.3.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

การศึกษาหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของไอโซเลท NJS54 ในการผลิตเอนไซม์ไลเปส งานวิจัยนี้ได้เปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนโดยใช้น้ำมันพืชชนิดต่างๆ จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ น้ำมันปาล์ม น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันกากถั่วเหลือง น้ำมันรำข้าว น้ำมันมะกอก และน้ำมันมะพร้าว จากผลการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของแต่ละแหล่งคาร์บอน น้ำมันกากถั่วเหลืองมีค่าเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด คือ 0.09 $\pm$ 0.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ น้ำมันมะพร้าว มีค่าเท่ากับ 0.07 $\pm$ 0.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยน้ำมันปาล์ม น้ำมันรำข้าว น้ำมันมะกอก และน้ำมันดอกทานตะวัน ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเท่ากัน คือ 0.06 $\pm$ 0.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (แผนภูมิที่ 3) ดังนั้น แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของไอโซเลท NJS54 ของงานวิจัยนี้ คือ น้ำมันกากถั่วเหลือง

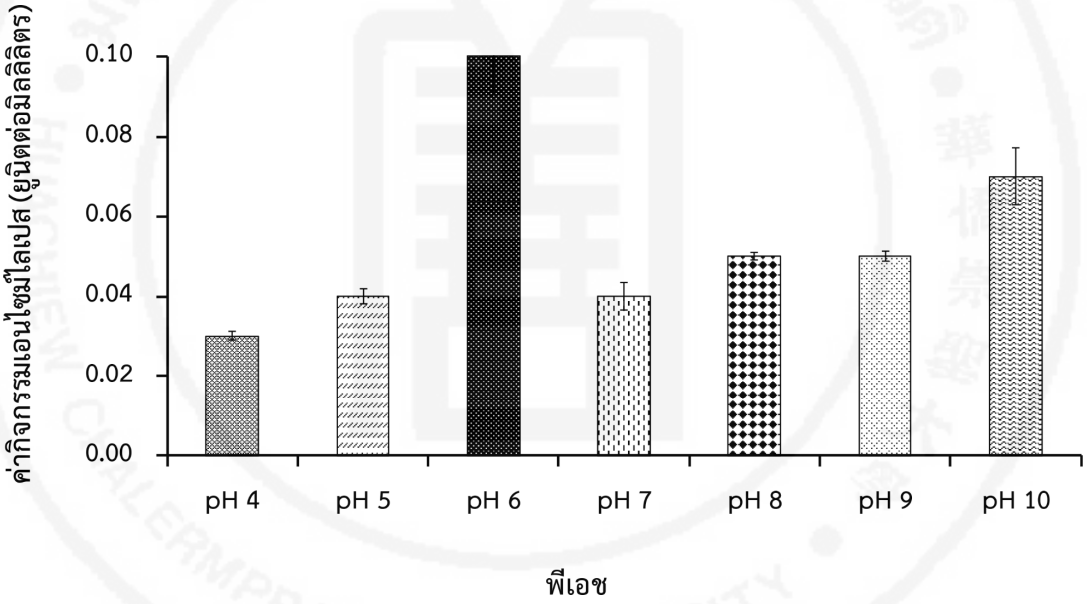
แผนภูมิที่ 3 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของไอโซเลท NJS54 ที่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างกัน



4.3.2 พีเอชของอาหารที่เหมาะสม

การศึกษาหาพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของไอโซเลท NJS54 ในการผลิตเอนไซม์ไลเปส งานวิจัยนี้ได้เปรียบเทียบพีเอช จำนวน 7 ค่า ตั้งแต่พีเอช 4 ถึง พีเอช 10 จากผลการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของแต่ละพีเอช พีเอช 6 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด รองลงมาคือ พีเอช 10, พีเอช 9, พีเอช 8, พีเอช 5, พีเอช 7 และพีเอช 4 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสมีดังนี้ 0.10 $\pm$ 0.01, 0.07 $\pm$ 0.01, 0.05 $\pm$ 0.00, 0.05 $\pm$ 0.00, 0.04$\pm$ 0.00, 0.04$\pm$ 0.00 และ 0.03 $\pm$ 0.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (แผนภูมิที่ 4) ดังนั้น พีเอชของอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของไอโซเลท NJS54 ของงานวิจัยนี้ คือ พีเอช 6

แผนภูมิที่ 4 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของไอโซเลท NJS54 ที่พีเอชต่างกัน

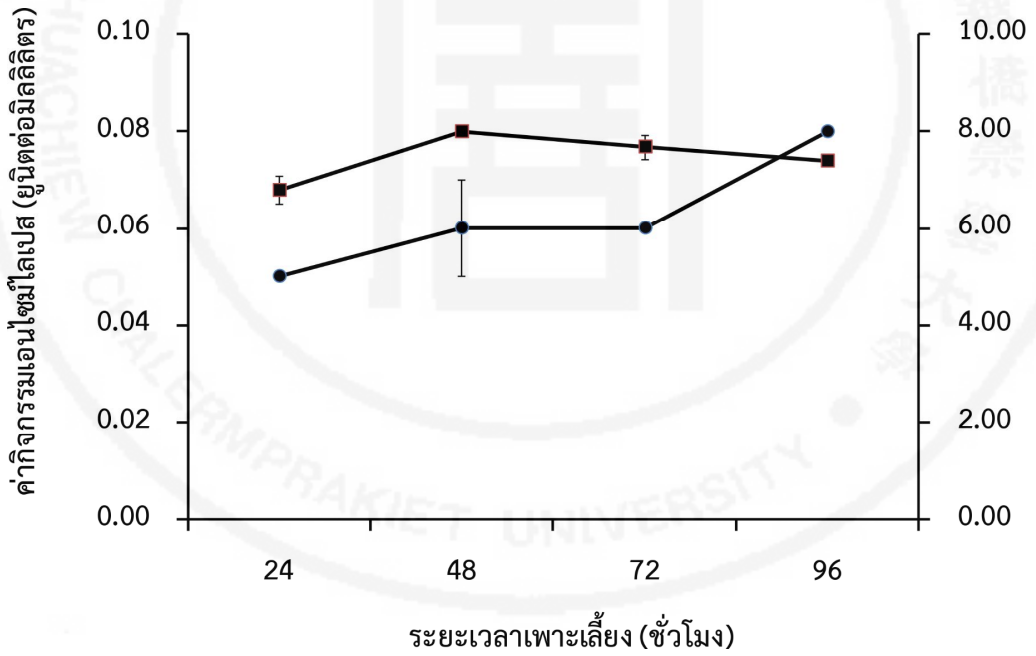


4.3.3 ระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม

การศึกษาหาระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของไอโซเลท NJS54 ในการผลิตเอนไซม์ไลเปส งานวิจัยนี้ได้เปรียบเทียบเวลาเพาะเลี้ยง จำนวน 4 ระยะเวลา ได้แก่ 24 ชั่วโมง 48 ชั่วโมง 72 ชั่วโมง และ 96 ชั่วโมง จากผลการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและปริมาณเชื้อของแต่ละระยะเวลาเพาะเลี้ยง ผลการวิจัยมีดังนี้ ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 0.05 $\pm$ 0.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณเชื้อ 7$\times$ 10^6 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (LOG10 = 6.79 $\pm$ 0.28) ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสใกล้เคียงกัน โดยที่ 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.06 $\pm$ 0.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณเชื้อ 9.8 $\times$ 10^7 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (LOG10 = 7.99$\pm$ 0.04) และที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 0.06 $\pm$ 0.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณเชื้อ 5.1 $\times$ 10^7 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (LOG10 = 7.67 $\pm$

0.24) และเมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลท NJS54 จนถึงเวลา 96 ชั่วโมง จะมีค่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 0.08 ± 0.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณเชื้อ 9.8 × 10^7 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร (LOG10 = 7.38 ± 0.04) จากแผนภูมิที่ 5 ปริมาณเซลล์ของไอโซเลท NJS54 มีปริมาณเพิ่มอย่างรวดเร็วที่เวลาเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง และเมื่อถึงเวลา 48 ชั่วโมง มีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นสูงสุด หลังจากนั้นเมื่อเวลาผ่านไปจำนวนเซลล์เริ่มลดลง ในขณะที่ปริมาณผลผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นผลผลิตสะสมในลักษณะของเอนไซม์ที่ปล่อยออกภายนอกเซลล์จึงมีลักษณะเส้นกราฟเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น แม้ว่าที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 72 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์จะเริ่มลดลงเนื่องจากมีเซลล์ตายก็ตาม ดังนั้นระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของไอโซเลท NJS54 ของงานวิจัยนี้ คือ ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

แผนภูมิที่ 5 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของไอโซเลท NJS54 ที่เวลาเพาะเลี้ยงต่างกัน (วงกลมคือค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส; สี่เหลี่ยม คือปริมาณเซลล์)



4.4 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์

การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ของไอโซเลท NJS54 เตรียมตัวอย่างน้ำเสียที่มีค่าน้ำมันและไขมันร้อยละ 1 (v/v) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของค่าน้ำมันและไขมันเริ่มต้นเท่ากับ 12,309.33 มิลลิกรัมต่อลิตร และศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายไขมันที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงต่อเนื่องกัน ตั้งแต่เวลา 0 - 96 ชั่วโมง และใช้สภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมจากขั้นตอนการศึกษาก่อนหน้านี้ ได้แก่ น้ำมันกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน ปรับพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงที่

พีเอช 6 หลังจากนั้นได้วิเคราะห์ประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันของไอโซเลท NJS54 ด้วยค่าน้ำมันและไขมันก่อนและหลังทดลอง

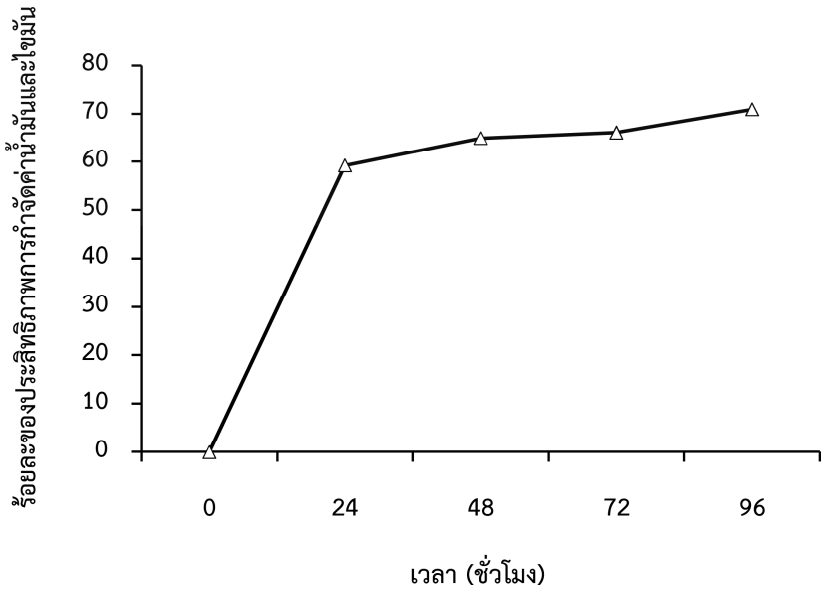
ผลการวิจัยพบว่าในช่วงระยะเริ่มต้นของการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ด้วยไอโซเลท NJS54 ที่เวลา 0 จนถึง 24 ชั่วโมง ไอโซเลท NJS54 สามารถกำจัดค่าน้ำมันและไขมันได้อย่างรวดเร็วสำหรับผลการศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดค่าน้ำมันและไขมันแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ค่าน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ที่ผ่านการบำบัดด้วยไอโซเลท NJS54

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าน้ำมันและไขมัน (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ร้อยละของประสิทธิภาพการกำจัดค่าน้ำมันและไขมัน
0 (เริ่มต้นการทดลอง)	11,613± 456.79	0
24	4,126±616.60	64.47
48	4,096±107.48	64.73
72	3,710±28.28	68.05
96	2,781±128.69	76.05

ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการกำจัดค่าน้ำมันและไขมัน คิดเป็นร้อยละ 64.47 และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อเนื่องตั้งแต่เวลา 48 ชั่วโมงเป็นต้นไป ไอโซเลท NJS54 เริ่มเข้าสู่ระยะคงตัว ทำให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดค่าน้ำมันและไขมันไม่เพิ่มสูงขึ้นมากนัก โดยที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 48, 72 และ 96 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการกำจัดค่าน้ำมันและไขมัน คิดเป็นร้อยละ 64.73, 68.05 และ 76.05 ตามลำดับ (แผนภูมิที่ 6) อย่างไรก็ตามจากผลการวิจัย ไอโซเลท NJS54 มีประสิทธิภาพการกำจัดค่าน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์สูงสุดที่เวลา 96 ชั่วโมง

แผนภูมิที่ 6 ร้อยละของประสิทธิภาพการกำจัดค่าน้ำมันและไขมันของไอโซเลท NJS54



บทที่ 5
สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 ตัวอย่างน้ำเสียจากถังดักไขมันของร้านจำหน่ายอาหาร โรงอาหาร1 มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ มีค่าน้ำมันและไขมันอยู่ในช่วงอยู่ระหว่าง 2,441– 215,200 มิลลิกรัมต่อลิตร

5.1.2 แบคทีเรียที่คัดแยกได้เบื้องต้นจากตัวอย่างน้ำเสีย มีจำนวน 41 ไอโซเลท โดยส่วนใหญ่คิดเป็นร้อยละ 31.71 ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้นี้มาจากตัวอย่างน้ำเสียร้านก๋วยเตี๋ยวที่มีค่าเฉลี่ยของค่าน้ำมันและไขมัน 28,279 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยมี 2 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 4.88 ที่แสดงความสามารถในการย่อยสลายไขมัน ได้แก่ ไอโซเลท NJS54 และไอโซเลท NJS72 มีค่าดัชนีเอนไซม์ไลเปส 1.59 $\pm$ 0.14 และ 1.23 $\pm$ 0.09 ตามลำดับ และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 0.06 $\pm$ 0.01 และ 0.05 $\pm$ 0.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

5.1.3 สภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียไอโซเลท NJS54 คือ ใช้น้ำมันกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน อาหารเพาะเลี้ยงที่พีเอช 6 และระยะเวลาเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดเท่ากับ 0.10 $\pm$ 0.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

5.1.4 แบคทีเรียไอโซเลท NJS54 มีประสิทธิภาพการกำจัดค่าน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีน้ำมันกากถั่วเหลืองเข้มข้นร้อยละ 1 (v/v) ได้สูงสุด คิดเป็นร้อยละ 76.05

5.2 การอภิปรายผลการวิจัย

น้ำเสียจากร้านอาหารเป็นน้ำเสียที่มีความสกปรกสูง มีปริมาณน้ำมันและไขมันปนเปื้อนมาก และยังประกอบด้วยสารอินทรีย์หลายชนิดทั้งโปรตีน คาร์โบไฮเดรต แร่ธาตุ และสารอินทรีย์อื่นๆ โดยทั่วไปการบำบัดน้ำเสียนิยมใช้ถังดักไขมันเพื่อกำจัดน้ำมันและไขมันออกก่อนที่จะนำน้ำเสียเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสียต่อไป ปัจจุบันเทคโนโลยีการบำบัดน้ำมันและไขมันด้วยวิธีทางชีวภาพกำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันเป็นจุลินทรีย์ตามธรรมชาติหรือจุลินทรีย์ท้องถิ่น (Indigenous microorganisms) ที่พบได้ในแหล่งที่ปนเปื้อนน้ำมันและไขมันสูง ตัวอย่างเช่น ของเสียจากอุตสาหกรรมน้ำมัน โรงงานผลิตน้ำมันพืช น้ำเสียชุมชน น้ำเสียหรือน้ำทิ้งรวมถึงดินจากแหล่งที่เกี่ยวข้องกับน้ำมันต่างๆ เป็นต้น (Gunstone, 1999; Saxena, Sheoran, Giri, & Davidson, 2003) งานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะคัดแยกจุลินทรีย์ท้องถิ่นจากถังดักไขมัน จุลินทรีย์เหล่านี้ได้ปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่มีน้ำมันและไขสูงได้ดี สามารถย่อยสลายน้ำมันและไขมันเพื่อนำไปใช้เป็นสารอาหารให้กับเซลล์จุลินทรีย์เองทำให้เจริญอย่างรวดเร็ว ดังนั้น เป็นไปได้ว่าในสภาพแวดล้อมของถังดักไขมันอาจจะมีจุลินทรีย์ที่มีความโดดเด่นในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการบำบัดน้ำเสียจากร้านอาหารได้

งานวิจัยนี้สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากถังดักไขมันของร้านจำหน่ายอาหารประเภทต่างๆ ได้แก่ ข้าวแกง อาหารจานเดียว อาหารตามสั่ง และก๋วยเตี๋ยว ที่จำหน่ายในโรงอาหาร 1 มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ผลการวิจัยพบว่าน้ำเสียเหล่านี้มีค่าน้ำมันและไขมันอยู่ในระดับสูง มีค่าอยู่ระหว่าง 2,441– 215,200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทุกตัวอย่างมีค่าน้ำมันและไขมันสูงกว่ามาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากอาคารบางประเภทและบางขนาด ตามประกาศกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ซึ่งกำหนดให้ค่าน้ำมันและไขมันในน้ำเสียจากร้านจำหน่ายอาหารต้องไม่เกิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2548) อย่างไรก็ดี ผลการวิเคราะห์ค่าน้ำมันและไขมันในตัวอย่างน้ำเสียบางตัวอย่างมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสูง เช่น ตัวอย่าง S1 S2 และ S7 นั้น อาจเนื่องมาจากสาเหตุหลายประการ เช่น ช่วงเวลาการเก็บตัวอย่างน้ำเสีย ชนิดอาหารที่ร้านปรุง/ประกอบ ปริมาณการผลิตอาหารเพื่อจำหน่าย โดยการจำหน่ายอาหารของร้านอาหารแต่ละประเภทในแต่ละวันจะมีความแตกต่างกันไปขึ้นกับปริมาณนักศึกษาที่มาทำกิจกรรมต่างๆ ในมหาวิทยาลัย ซึ่งส่งผลคุณลักษณะของน้ำเสียที่เกิดขึ้นด้วยเช่นกัน ทำให้ค่าน้ำมันและไขมันในน้ำเสียที่เก็บแต่ละครั้งมีความแตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบค่าตัวเลขดังกล่าวของแต่ละตัวอย่างมีความแตกต่างกันไม่เกินร้อยละ 20 จึงนำเสนอในรายงานวิจัยนี้ ทั้งนี้ ในงานวิจัยนี้สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันได้ จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท NJS54 คัดแยกได้จากตัวอย่างที่มีค่าน้ำมันและไขมัน 28,042 มิลลิกรัมต่อลิตร และไอโซเลท NJS72 คัดแยกได้จากตัวอย่างที่มีค่าน้ำมันและไขมัน 215,200 มิลลิกรัมต่อลิตร จุลินทรีย์ที่มีสามารถอาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีปริมาณน้ำมันและไขมันสูงนี้เรียกว่าจุลินทรีย์กลุ่ม Lipolytic microorganisms เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยย่อยสลายไขมันจากพืชและสัตว์ได้และปลดปล่อยพลังงานออกมา มีทั้งกลุ่มที่ใช้ออกซิเจนและกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจน ตัวอย่างเช่น แบคทีเรีย *Pseudomonas* sp., *Clostridium* sp. และรา *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp. และ *Aspergillus* sp. สำหรับการย่อยสลายน้ำมันและไขมันของจุลินทรีย์กลุ่มที่ใช้ออกซิเจนจะเกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์ปล่อยเอนไซม์ออกสู่ภายนอกเซลล์ (Extracellular enzymes) ไปทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับน้ำมันและไขมันได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล (Prokhorov, 1979) มีงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้คัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันซึ่งเป็นจุลินทรีย์ท้องถิ่นจากน้ำเสียที่มีค่าน้ำมันและไขมันสูงดังเช่น Rodriguez-Mateus, Agualimpia, and Zafara (2016) คัดแยก *Candida palmioleophila* และ *Bacillus* sp. ได้จากน้ำทิ้งจากการผลิตน้ำมันปาล์ม (Palm oil mill: POME) ที่มีค่าน้ำมันและไขมันสูงถึง 4,907 $\pm$ 0.67 มิลลิกรัมต่อลิตร

ความชุกของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันในงานวิจัยนี้มีค่าน้อย คิดเป็นร้อยละ 4.88 (2/41 ไอโซเลท) แสดงให้เห็นว่าสัดส่วนของจุลินทรีย์กลุ่ม Lipolytic microorganisms ในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติมีน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับประชากรจุลินทรีย์ที่อาศัยในสภาพแวดล้อมนี้ทั้งหมด เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Savitha et al. (2007) คัดแยกราที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันจากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันและไขมัน จำนวน 4 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 12.50

ได้แก่ *Aspergillus* sp. และ *Mucor* sp. นอกจากนี้ Čipinytė et al. (2009) รายงานความชุกของจุลินทรีย์จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่ผ่านการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายไขมัน มีจำนวน 5 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 4.03 ของจุลินทรีย์ที่ทดสอบทั้งหมด และ Phong et al. (2014) คัดแยกแบคทีเรียจากน้ำเสียจากโรงงานผลิตอาหารและร้านอาหาร ซึ่งมีเพียง 6 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 5.88 แสดงความสามารถในการย่อยสลายไขมัน แบ่งเป็น 5 จีนัส ได้แก่ *Acenitobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Stenotrophomoas* sp. และ *Bacillus* sp. ทั้งนี้ เป็นได้ว่าอาจมีสาเหตุมาจากตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมไม่ว่าจะเป็นน้ำเสียหรือดินมีสารต่างๆ ปนเปื้อนอยู่มากมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทำให้จุลินทรีย์ท้องถิ่นมีน้อย รวมทั้งขั้นตอนการคัดแยกในห้องปฏิบัติในส่วนของอาหารเพาะเลี้ยงและอาหารคัดเลือกจุลินทรีย์อาจไม่เหมาะสมมีสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์เป้าหมายเจริญได้น้อย ทั้งนี้ สารยับยั้งที่อาจมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มเป้าหมาย ได้แก่ โลหะหนัก เช่น Zn^{2+}, Hg^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Ni^{2+}, Ca^{2+} หรือสารเคมี เช่น EDTA, SDS, PMSF, Triton X-100 เป็นต้น (Hasan et al., 2009)รวมทั้งกรดไขมันสายยาว (LCFA) ก็เป็นสารยับยั้งการเจริญได้เช่นกัน (Hanaki et al., 1981; Angelidaki & Ahring, 1992; Perle et al., 1995) ตัวอย่างน้ำเสียจากถังดักไขมันที่ใช้ในงานวิจัยนี้นอกจากจะประกอบด้วยสารอินทรีย์หลายชนิดที่มาจากการประกอบอาหารแล้วยังมีน้ำใช้แล้วที่มีสารทำความสะอาด (Detergents) ปนเปื้อนจากการล้างทำความสะอาดภาชนะต่างๆ ด้วย สารทำความสะอาดประกอบด้วยสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ เช่น กรดซัลฟุริก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมคาร์บอเนต ไตรโซเดียมฟอสเฟต สารประเภท Quat และโซเดียมไฮโปคลอไรต์ เป็นต้น (Gilbert, 1970; Katsuyama, 1993) นอกจากนี้สารอนินทรีย์ที่เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยง เช่น แอมโมเนียมคลอไรด์ (Ammunium chloride: NH_4Cl) และแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Ammonium dihydrogen phosphate: $NH_4(H_2PO_4)$) ก็ส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ (Dong, Gao, Han, & Cao, 1999; Rathi, Saxena, & Gupta, 2001) แอมโมเนียมเป็นสารอาหารที่ไม่เหมือนสารชนิดอื่น นอกจากเป็นสารอาหารจำเป็นแล้วยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ การขนส่งแอมโมเนียมจำนวนมากเข้าสู่ภายในไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) ของเซลล์จะทำให้เกิดวัฏจักรที่สูญเปล่าของพลังงานเกิดการสูญเสียพลังงานเกิดขึ้น แอมโมเนียมจะถูกขนส่งออกสู่ภายนอกเซลล์กลับคืนสู่อาหารเพาะเลี้ยง (von Wirén & Merric, 2004) Mobarak-Qamsari, Kasra-Kermanshahi, and Moosavi-Nejas (2011) ได้ทดสอบผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ *Pseudomonas aeruginosa* KM110 เปรียบเทียบระหว่างแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ที่ปริมาณ 2 กรัมต่อลิตร ได้แก่ แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เปบโตน (Peptone) และสารสกัดยีสต์ (Yeast extract) ใช้สภาวะเพาะเลี้ยง ดังนี้ อุณหภูมิ 30 °C พีเอช 7.0 และอัตราเขย่า 150 รอบต่อนาที พบว่าแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนจะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 0.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่สารสกัดยีสต์และเปบโตนมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงเท่ากับ 0.07 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.17 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์

ไลเปสที่แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตปริมาณต่างๆ ตั้งแต่ 1 – 10 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร จะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสต่ำสุด น้อยกว่า 0.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ SMP1B agar นั้น สูตรของอาหารมีส่วนผสมของ Ammonium sulphate ($(NH_4)_2SO_4$) ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร เช่นกัน ซึ่งอาจเป็นสารยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ได้ ดังนั้น ความไวต่อแอมโมเนียมของจุลินทรีย์จึงเป็นอีกหนึ่งประเด็นที่ควรพิจารณาในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยอาจเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนอื่นที่เหมาะสมและไม่มีความเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ทดแทน เช่น เปบโตน และสารสกัดยีสต์

งานวิจัยนี้คัดแยกแบคทีเรีย ไอโซเลท NJS54 และเมื่อผ่านการศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยทำการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยใช้ p-nitrophenyl palmitate (pNPP) เป็นสับสเตรท (Hoshino et al., 1992) และสกัดเอนไซม์แบบหยาบ (Crude enzymes) แบคทีเรีย ไอโซเลท NJS54 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุด0.10$\pm$ 0.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร งานวิจัยส่วนใหญ่ต้องการคัดแยกจุลินทรีย์เป้าหมายที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันและมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆดังเช่น Soares et al. (2015) ซึ่งได้คัดแยกแบคทีเรีย ไอโซเลท AP5 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุด 0.07 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและยีสต์ ไอโซเลท AS16 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุด 0.07 ยูนิตต่อมิลลิลิตร Patcha and Wiyada (2013) คัดแยกได้ *Pseudomonas aeruginosa* ไอโซเลท NA37 ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดถึง 481 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตรหรือ 0.481 ยูนิตต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของงานวิจัยต่างๆ ที่แตกต่างกันนั้นส่วนหนึ่งมีสาเหตุมาจากวิธีการวิเคราะห์เอนไซม์และวิธีการสกัดเอนไซม์ด้วย เป็นที่ทราบกันดีว่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์จะให้ผลผลิตจำนวนมากหรือน้อยนั้นมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการทั้งปัจจัยส่งเสริมและปัจจัยยับยั้ง ตัวอย่างเช่น ระยะเวลาเพาะเลี้ยง การเติมอากาศ สารตั้งต้น สารเหนี่ยวนำ สารอินทรีย์ แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ไลเปสหรือกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตออกมาได้จะมากหรือน้อยเพียงใด ได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ สารกระตุ้น และสารยับยั้ง เป็นต้น ดังนั้น การศึกษาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันจึงจำเป็นต้องพิจารณาปัจจัยเหล่านี้เป็นสำคัญ

นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาหาสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ได้แก่ แหล่งคาร์บอนพีเอชของอาหาร และระยะเวลาเพาะเลี้ยง เพื่อส่งเสริมให้แบคทีเรียมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงและเพียงพอตามต้องการ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการบำบัดน้ำเสียต่อไป ทั้งนี้ผลการวิจัยพบว่าสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของแบคทีเรีย ไอโซเลท NJS54 มีดังนี้ แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ น้ำมันกากถั่วเหลือง องค์ประกอบส่วนใหญ่ของน้ำมันกากถั่วเหลือง มีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวแบบ Polyunsaturated Fats คิดเป็นร้อยละ 61.00 ประกอบไปด้วยกรดไขมัน Linoleic ร้อยละ 53.20, Oleic ร้อยละ 23.40, Palmitic ร้อยละ 11.00, Linolenic ร้อยละ 7.80, Stearic ร้อยละ 4.00 และ Arachidic ร้อยละ 0.30 (Chow, 2008) อย่างไรก็ตาม ถึงแม้จะมีรายงานวิจัย

ระบุว่า กรดไขมันสายยาว เช่น กรดไขมัน Oleic มีผลต่อการยับยั้งผลผลิตเอนไซม์ไลเปส (Chander et al., 1979) แต่ก็มีรายงานอื่นได้ระบุว่าน้ำมันกากถั่วเหลือง มีผลต่อการส่งเสริมผลผลิตเอนไซม์ไลเปสให้เพิ่มสูงขึ้นได้ (Kamini, Fujii, & Iefuji, 2000) Pogori, Cheikhyoussef, Xu, and Wang (2008) ศึกษาเปรียบเทียบการใช้น้ำมันพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำมันกากถั่วเหลือง น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันงา น้ำมันรำข้าว และน้ำมันมะกอก เป็นแหล่งคาร์บอนของ *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 พบว่าน้ำมันกากถั่วเหลือง มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุด 12.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

พีเอชก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญต่อผลผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ งานวิจัยนี้พบว่าพีเอช 6 เป็นพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียให้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูง ทั้งนี้ ตามปกติแล้วเอนไซม์ไลเปสจะทำงานได้ดีและคงตัวที่สภาวะเป็นด่าง (Alkaline conditions) (Hasan et al., 2009) แต่ก็มีเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถคงตัวได้ดีที่สภาวะเป็นกรด (พีเอช น้อยกว่า 7.0) ดังเช่น *Fusarium heteosporum* มีพีเอชเหมาะสมที่พีเอช 5.5-6.0 อุณหภูมิ 45-50 °C (Shimadaet al., 1993) หรือ *Aeromonas* sp. C14 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงถึง 0.7 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่พีเอช 6.0 (Liu, Chen, & Chang, 2007)

แบคทีเรีย ไอโซเลท NJS54 เริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ที่เวลาเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง (หรือ 2 วัน) ซึ่งถือเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงของงานวิจัยนี้ หลังจากนั้นที่เวลา 96 ชั่วโมง (หรือ 4 วัน) จะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุด ทั้งนี้ ระยะเวลาเพาะเลี้ยงของจุลินทรีย์แต่ละชนิดเพื่อเข้าสู่ระยะคงที่และผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดนั้นมีความแตกต่างกัน (Hasan et al., 2009) ดังเช่น *Bacillus* sp. เริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ที่เวลาเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง และที่เวลา 36 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุด (Handelsman & Shoham, 1994) *Bacillus cereus* และ *Bacillus coagulans* ให้ผลผลิตไลเปสสูงสุดที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง (หรือ 2 วัน) (El-Shafei & Rezkallah, 1997) หรือ *Bukholderia* sp. DW2-1 ที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 36 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุด (Matsumiya et al., 2007) ซึ่งระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมจะช้าหรือเร็วมักจะเกี่ยวข้องกับมีปัจจัยส่งเสริมต่างๆ เช่น แหล่งคาร์บอน พีเอช สารตั้งต้น และอุณหภูมิ เป็นต้น

เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลท NJS54 มาศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดค่าน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ที่เติมน้ำมันกากถั่วเหลืองร้อยละ 1 (v/v) เป็นแหล่งคาร์บอนและปรับสภาวะเพาะเลี้ยงตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาข้างต้น ไอโซเลท NJS54 แสดงประสิทธิภาพในการกำจัดค่าน้ำมันและไขมันได้ร้อยละ 76.05 ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 96 ชั่วโมง สำหรับจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันซึ่งผลิตเอนไซม์ไลเปสนี้นิยมนำมาใช้ในการศึกษาบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันและไขมัน Matsumiya et al. (2007) ใช้แบคทีเรีย *Bukholderia* spp. DW2-1 ย่อยสลายน้ำมันและไขมันประเภทต่างๆ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 (v/v) ดังนี้ น้ำมันสลัดน้ำมันมะกอก น้ำมันงา และไขมันวัว พบว่าที่เวลาเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง มีอัตราการย่อยสลายน้ำมันมากกว่าร้อยละ77.4 ขึ้นไป นอกจากนี้ Affandi et al. (2014) ระบุว่า *Serratia marcescens* เหมาะสมกับการกำจัดน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว ส่วน *Bacillus cereus* เหมาะสมกับการกำจัดน้ำเสียจาก

อุตสาหกรรมทุกประเภท (POME) และ *Aeromonas hydrophila* เหมาะสมกับการกำจัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิกส์ โดย *S. marcescens* สามารถย่อยสลายน้ำมันและไขมันได้ถึงร้อยละ 91.0 ใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน

แบคทีเรียไอโซเลท NJS54 แสดงความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันได้ดีถูกนำมาศึกษาสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อส่งเสริมให้ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงมากขึ้น และนำทดลองไปบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมันและไขมันปนเปื้อน แบคทีเรียไอโซเลท NJS54 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีและสามารถบำบัดน้ำเสียได้ หากแต่ยังคงต้องมีการศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องเพิ่มเติม เช่น การเติมอากาศ แหล่งไนโตรเจน สารเหนี่ยวนำ และโลหะหนัก ที่อาจจะส่งผลต่อผลผลิตของเอนไซม์ไลเปสเพื่อให้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงมากขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดค่าน้ำมันและไขมันเพิ่มขึ้นตามไปด้วยเพื่อใช้ประโยชน์ในการบำบัดน้ำเสียและของเสียด้วยวิธีทางชีวภาพ นอกจากนี้ ในอนาคตยังสามารถศึกษาการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียนี้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น อุตสาหกรรมโอลิโอเคมีพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพไบโอดีเซล อุตสาหกรรมสารทำความสะอาด และอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น

5.3 ข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยครั้งต่อไป

5.3.1 ควรมีการศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ไลเปสของไอโซเลท NJS54 ทั้งปัจจัยส่งเสริมและสารยับยั้ง เช่น อุณหภูมิ การเติมอากาศ แหล่งไนโตรเจน สารเหนี่ยวนำ และโลหะหนัก เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียนี้ และมีผลผลิตเอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงมากขึ้น

5.3.2 ควรมีการศึกษาถึงการนำแบคทีเรีย ไอโซเลท NHS54 ไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ เช่น การย่อยสลายของเสียทางชีวภาพ เช่น กากน้ำมันและไขมันในอุตสาหกรรมต่างๆ หรือการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง

5.3.3 ควรมีการศึกษาถึงแหล่งของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันแหล่งอื่นๆ เช่น น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม หรือดิน หรือน้ำทะเล หรือกากตะกอนที่มีปนเปื้อนน้ำมันและไขมันเพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันมันที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงและมีคุณสมบัติของเอนไซม์อื่นๆ ตามต้องการ เช่น ทนที่สภาวะกรด-ด่างสูง ทนอุณหภูมิสูง หรือทนเกลือสูงได้

5.3.4 ควรนำแบคทีเรีย ไอโซเลท NJS72 ที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้ซึ่งแสดงความสามารถในการย่อยสลายไขมันได้ไปศึกษาสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส เพื่อเป็นอีกทางเลือกในการนำเชื้อจุลินทรีย์ไปใช้ประโยชน์ในอนาคต

5.3.5 ควรนำแบคทีเรีย ไอโซเลท NJS54 และไอโซเลท NJS72 ไปจัดจำแนกสายพันธ์ เช่น ด้วยเทคนิคทางอณุชีววิทยา ซึ่งเป็นวิธีที่มีความถูกต้อง แม่นยำ น่าเชื่อถือและได้ผลรวดเร็ว เพื่อจะได้ศึกษารายละเอียดเพิ่มเติมและนำแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทไปใช้ประโยชน์ได้อย่างเหมาะสมต่อไป

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

บรรณานุกรม

กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. (2548). ประกาศกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เรื่อง กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากอาคารบางประเภทและบางขนาด. สืบค้นจาก http://www.pcd.go.th/count/lawdl.cfm? FileName=3_41_water.pdf.

กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมกรมควบคุมมลพิษ. (2551). *แนวทางการจัดการน้ำมันและไขมันจากบ่อดักไขมันและการนำไปใช้ประโยชน์สำหรับร้านอาหาร*. กรุงเทพมหานคร: ทีคิวพี.

บุญส่ง ไข่เกษ, สุธาสินี อั้งสูงเนิน, จิรา แก้วดำ และปัญจ์ปพัชรภร บุญพร้อม. (2554). ประสิทธิภาพของถังดักไขมันที่ทำจากวัสดุเหลือใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากบ้านเรือน และแผงลอยจำหน่ายอาหารในชุมชนซอยโชดา เขตดุสิต กรุงเทพมหานคร. *วารสารการจัดการสิ่งแวดล้อม*, 7(1), 30-42.

มนตรี จุฬาวัฒนฑล, ยงยุทธ ยุทธวงศ์, ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์, สกล พันธ์ยิ้ม และภิญโญ พานิชพันธ์. (2543). *ชีวเคมี*. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

มารุจ ลิมปะวัฒนะ และวรรณวิมล คล้ายประดิษฐ์. (2552). ไขมันทรานส์: ข้อมูลบนฉลากโภชนาการที่ควรรู้. *วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม*, 4(1), 11-15.

ปกรณ์ วินะยานุวัติคุณ. (2554). เทคโนโลยีการเร่งปฏิกิริยาซึ่งเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพื่อการผลิตไบโอดีเซล. *วารสารวิจัยพลังงาน*, 8 (2554/2), 61-75.

สุรอรรถ ศุภจัตรัส, วีระสิทธิ์ กัลป์ยากฤต, วิรัตน์ วาณิย์ศรีรัตนา, และศุภพงษ์ ภูวพัฒนะพันธุ์. (2550). การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสประสิทธิภาพสูงจากตะกอนเร่งของโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร. ในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (บรรณาธิการ), *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45: สาขาส่งเสริมการเกษตรและคหกรรมศาสตร์ สาขาอุตสาหกรรมเกษตร* (หน้า 712-718). กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Abd Rahman, R. N. Z. R. A., Leow, T. C., Salleh, A. B., & Basri, M. (2007). *Geobacillus zalihaea* sp. nov., a novel thermophilic lipolytic bacterium isolated from palm oil mill effluent in Malaysia. *BioMed Central Microbiology*, 7(77), 1-10.

Affandi, I. E., Suratman, N. H., Abdullah, S., Ahmad, W. A., & Zakaria, Z. A. (2014). Degradation of oil and grease from high-strengh industrial effluents using locally isolated aerobic biosurfactant-producing bacteria. *International Bioremediation & Biodegradation*, 95 (Part A), 33-40.

บรรณนานุกรม (ต่อ)

Alipat, S., Perie, F., Zurdo, C., & Martingon, A. (1998). Process for enzyme pretreatment of drill cutting. *United States Patent*, 5, 725-771.

Angelidaki, I., & Ahring, B. K. (1992). Effects of free long-chain fatty acids on thermophilic anaerobic digestion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37(6), 808-812.

Andualema, B., & Gessesse, A. (2012). Microbial lipase and their industrial applications: Review. *Biotechnology*, 11(3), 100-118.

American Public Health Association. (2012). *Standard methods for examination of water and wastewater: 5520 Oil and Grease*. Washington: American Public Health Association.

Becker, P., Koster, d., Popov, M. N., Markossian, S., Anlianileian, G., & Markl, H. (1999). The biodegradation of olive oil and the treatment of lipid-rich wool scouring wastewater under aerobic thermophilic conditions. *Water Research*, 33(3), 653-660.

Beermann, C., Jelinek, J.,Reinecker, T., Hauenschild, A., Boehm, G., & Klör, H. U. (2003). Short term effects of dietary medium-chain fatty acids and n–3 long-chain polyunsaturated fatty acids on the fat metabolism of healthy volunteers. *Lipids in Health and Disease*, 2, 1-10.

Breuil, C., & Kushner, D. J. (1975). Partial purification and characterization of the lipase of a facultatively psycrophilic bacterium (*Acinetobacter* O16). *Canadian Journal Microbiology*, 21(4), 434-441.

Cammarota, M. C., & Freire, D. M. G. (2006). A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Bioresource Technology*, 97(17), 2195-2210.

Chander, H., Ranganathan, B., & Singh, J. (1979). Purification and some properties of lipase from *Streptococcus faecalis*. *Journal of Food Science*, 44(6), 1747-1751.

Chigusa, K., Hasegawa, N., Yamamoto, N., & Watanabe, Y. (1996). Treatment of wastewater from oil manufacturing plant by yeast. *Water Science & Technology*, 34(11), 51-58.

บรรณนานุกรม (ต่อ)

Chow, C.K. (2008). *Fatty acids in foods and their health implications*. United States: Taylor & Francis Group.

Čipinytë, V., Grigiškis, S., & Baškys, E. (2009). Selection of fat-degrading microorganisms for the treatment of lipid-contaminated environment. *Biologia*, 55(3-4), 84-92.

Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1), 47-64.

Dharmsthiti, S., & Kuhasuntisuk, B. (1998). Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602: biochemical properties and application for wastewater treatment. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21(1), 75-80.

Dong, H., Gao, S., Han, S. P., & Cao, S. G. (1999). Purification and characterization of a *Pseudomonas* sp. lipase and its properties in non-aqueous media. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 30(Pt3), 251-256.

El-Shafei, H. A., & Rezkallah, L. A. (1997). Production, purification and characterization of *Bacillus* lipase. *Microbiological Research*, 152(2), 199-208.

Emanuilova, E. M., Kambourova, M., Dekosvka, M., & Manolov, R. (1993). Thermoalkalophilic lipase producing *Bacillus* selected by continuous cultivation. *FEMS Microbiology letters*, 108(2), 247-250.

Environmental Protection Agency. (2013). Industrial used of fat, oil and grease. Retrieved from http://www.epa.gov/foodrecovery/fd-industry.html.

Espinosa, E., Sanchez, S., & Farres, A. (1990). Nutritional factors affecting lipase production by *Rhizopus delemar* CDBB M313. *Biotechnology Letters*, 12(3), 209-214.

Fadiloglu, S., & Erkmen, O. (2002). Effects of carbon and nitrogen sources on lipase production by *Candica rugosa*. *Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences*, 26(3), 249-254.

Gilbert, R. J. (1970). Comparison of materials used for cleaning equipment in retail food premises, and of two methods for the enumeration of bacteria on cleaned equipment and work surfaces. *Journal of Hygiene*, 68(2), 221-232.

บรรณนานุกรม (ต่อ)

Godfrey, T., & Reichelt, J. (1983). *Industrial applications. In: Industrial enzymology—applications of enzymes in industry*. London: The Nature Press.

Gupta, R., Gupta, N., & Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(6), 763-781.

Gunstone, F. D. (1999). Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipid. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(12), 1535-1549.

Gunstone. F. D. (2004). *The chemistry of oils and fats: source, composition, properties and uses*. United Kingdom, Oxford: Blackwell Publishing.

Gunstone, F. D., Harwood, J. L., & Dijkstra, A. J. (2007). *The lipid handbook with CD-ROM*. Boca Raton: CRC Press.

Gunstone, F. D. (2008). Research highlights: Lipid technology 3/2008. *Lipid Technology*, 20(3), 67-69.

Hanaki, K., Nagase, M., & Matsuo, T. (1981). Mechanism of inhibition caused by long-chain fatty acids in anaerobic digestion process. *Biotechnology and Bioengineering*, 23(7), 1591-1610.

Handelsman, T., & Shoham, Y. (1994). Production and characterization of an extracellular thermostable lipase from a thermophillic *Bacillus* sp.. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 40(5), 435-443.

Hasan, F., Shah, A. A., & Hammeed, A. (2009). Method for detection and characterization of lipase: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 27(6), 782-798.

Hasan, F., Shah, A. A., & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 235-251.

Hendricks, C. W., Doyle, J. D., & Hugley, B. (1995). A new solid medium for enumerating cellulose-utilizing bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 16(5),2016-2019.

Hoshino, T., Sasaki, Y., Watanabe, T., Nagasawa, T., & Yamane, T. (1992). Purification and some characteristics of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lini*. *Biotechnology and Biochemistry*, 56(5), 660-664.

บรรณนานุกรม (ต่อ)

Hsu, A. F., Jones, K., Foglia, T. A., & Marmer, W. N. (2002). Immobilized lipase catalyzed production of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 36(3), 181-186.

Husuntree, P., Toomthong, V., Yoschoch, S., & Thawornchaisi, U. (2011). The potential of restaurant trap grease as biodiesel feedstock. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 33(5), 525-530.

Jaeger, K. E., & Eggert, T. (2002). Lipase for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 390-397.

Jaeger, K. E., & Reetz, M. T. (1998). Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 16(9), 396-403.

Kamini, N. R., Fujii, T., & Iefuji, H. (2000). Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. *Process Biochemistry*, 36(4), 317-324.

Katsuyama, A. M. (1993). *Principles of food processing sanitation - Chapter 4: Cleaning and sanitizing*. Washington, DC.: Food Processors Institute.

Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S. S., & Gupta, R. (2005). Production, purification, and characterization of lipase from thermophillic and alkaliphallic *Bacillus coagulants* BTS-3. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 38-44.

Kumar A., Sharma P., & Kanwar S. S. (2012). Lipase catalyzed esters syntheses in organic media: A review. *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences*, 2(2), 91-119.

Lewkowltsch, J. (1922). *Chemical technology and analysis of oils, fats, and waxes*. London: Macmillan.

Liu, C. H., Chen, W. M., & Chang, J. S. (2007). Methods for rapid screening and isolation of bacteria producing acidic lipase: Feasibility studies and novel activity assay protocols. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(5), 633-640.

Madan, R. L. (2013). *Organic chemistry*. New Delhi: Tata MacGraw-Hill.

บรรณนานุกรม (ต่อ)

Matsumiya, Y., Wakita, D., Kimura, A., Sampa, S., & Kubo, M. (2007). Isolation and characterization of a lipid-containing wastewater treatment. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 103(4), 325-330.

Mobarak-Qamsari, E., Kasra-Kermanshahi, R., & Moosavi-Nejas, Z. (2011). Isolation and identification of a novel, lipase-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* KM110. *Iranian Journal of Microbiology*, 3(2),92-98.

Namwong, S., & Tanasupawat, S. (2014). Identification of Staphylococcus strain in CH1-8 and its oil-degradation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(11),024-029.

Nuri, A., & Taner, Y. (2004). Comparative evaluation of a laboratory and full-scale treatment alternatives for the vegetable oil refining industry wastewater (VORW).*Process Biochemistry*, 39(7), 869-875.

Odeyemi, A. T., Aderiye, B. I., & Bamidele, O. S. (2013). Lipolytic activity of some strains of *Klebsiella*, *Pseudomonas*, and *Staphylococcus* spp. from restaurant wastewater and receiving stream. *Journal of Microbiology Research*, 3(1),43-52.

Okhkuro, I., Komatsuzaki, T., Kawashima, M., & kuriyama, S. (1978). Influence of NaCl on colonies and lipase of *Natto bacilli*. *Medicine and Biology*, 97, 171-174.

Parmar, N., Singh, A., & Ward, O. P. (2001). Enzyme treated to reduce solids and improve setting of sewage sludge. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26(6), 383-386.

Patcha, B., & Wiyada, M. (2013). Lipase-producing bacterium and its enzyme characterization. *Journal of Life Science and Technology*, 1(4), 196-200.

Patrick, G. (2012). *Organic chemistry*. United Kingdom: BIOS Scientific Publishers.

Perle, M., Kimchie, S., & Shelef, G. (1995). Some biochemical aspects of the anaerobic degradation of diary wastewater. *Water Resources*, 29(6), 1549-1554.

Phong, N. T., Duyen, N. T., & Diep, C. N. (2014). Isolation and characterization of lipid-degrading bacteria in wastewater of food processing plants and restaurants in can Tho city, Vietnam. *American Journal of Life Sciences*, 2(6), 382-388.

บรรณนานุกรม (ต่อ)

Pinto, A. C., Guarieiro, L. L. N., Rezende, M. J. C., Ribeiro, N. M., Torres, E. A., Lopes, W. A., Pereora, P. A. P., & Andrase, J. B. (2005). Biodiesel: an overview. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(6B), 1313-1330.

Pogori, N., Cheikhyoussef, A., Xu, Y., & Wang, D. (2008). Production and biochemical characterization of an extracellular lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021. *Biotechnology*, 7(4), 710-717.

Prasad, M. P., & Manjunath, K. (2011). Comparative study on biodegradation of lipid-rich wastewater using lipase producing bacterial species. *Indian Journal of Biotechnology*, 10(1), 121-124.

Prokhorov, A. M. (1979). *The great soviet encyclopedia*. New York: Macmillian.

Rathi, P., Saxena, R.K., & Gupta, R. A. (2001). Novel alkaline lipase from *Bulkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochemistry*, 37(2), 187-192.

Rehm, H. J., & Reed, G. (1981). *Biotechnology: Microbial fundamentals (Volume 1)*. United Kingdom: Wiley.

Rodriguez-Mateus, Z., Agualimpia, B., & Zafara, G. (2016). Isolation and molecular characterization of microorganisms with potential for the degradation of oil and grease from palm oil refinery wastes. *Chemical Engineering Transactions*, 49, 517-522.

Ruiz, C., Pastor, F. I. J., & Diaz, P. (2005). Isolation of lipid- and polysaccharide-degrading micro-organisms from subtropical forest soil, and analysis of lipolytic strain *Bacillus* sp. CR-179. *Letters in Applied Microbiology*,40(3),218-227.

Salleh, A. B., Musani, R., Basri, M., Ampon, K., Yunus, W. M. Z., & Razak, C. N. A. (1993). Extra-and intra-cellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* and factors affecting their production. *Canadian Journal of Microbiology*, 39(10), 978-981.

Savitha, J., Sruvudya, S., Jagat, R., Payal, P., Priyanki, S., Rashmi, G. W., Rosgini, K. T., & Shantala, Y. M. (2007). Identification of potential fungal strain (s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase. *Affrican Journal of Biotechnology*, 6(5), 564-568.

บรรณนานุกรม (ต่อ)

Saxena, R. K., Sheoran, A., Giri, B., & Davidson, W. S. (2003). Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods*, 52(1), 1–18.

Sharmaa, R., Chistib, Y., & Banerjeea, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipase. *Biotechnology Advances*, 19(8), 627-662.

Sharon, C., Furugoh, S., Yamakido, T., Ogawa, H., & Kato, Y. (1998). Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20(5), 304-307.

Soares, M. K. G., Facundes, B. C., Junior, A. F. C., & de Silva, E. M. (2015). Assessment of lipolytic activity of isolated microorganisms from the savannah of the Tocantins. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 37(4), 471-475.

Solomon, T. W. G., Fryhle, C. B., & Snyder, S. A. (2013). *Organic chemistry international student version*. United Kingdom: Wiley.

Song, Q. X., Lin, J. P., Rong, Y. P., & Wei, D. Z. (2001). Studies on lipase production from *Candida rugosa*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 17, 101-104.

Thakur S. (2012). Lipases, its sources, properties and applications: A review. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 3(7), 1-29.

Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2003). *Microbiology: an introduction*. United States, California: Pearson Education.

Verma, N., Thakur, S., & Bhatt, A. K. (2012). Microbial lipases: Industrial applications and properties (A Review). *International Research Journal of Biological Sciences*, 1(8), 88-92.

Vidal, G., Carvalho, A., Méndez, R., & Lema, J. M. (2000). Influence of the content in fat and proteins on the anaerobic biodegradability of dairy wastewaters. *Bioresource Technology*, 74, 231-239.

Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2008). *Principle of biochemistry: Life at the molecular level*. United States, New Jersey: John Wiley & Sons.

Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2012). *Principle of biochemistry International student version*. United States, New Jersey: John Wiley & Sons.

บรรณนานุกรม (ต่อ)

von Wiren, N., & Merrick, M. (2004). Regulation and function of ammonium carriers in plants, yeasts and bacteria. In E. Boles & R. Krämer (Eds.) Molecular mechanisms controlling transmembrane transport: Topic in Current Genetics volume 9 (pp. 95-120). Verlag Berlin Heidelberg: Springer.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิธีวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. การวิเคราะห์ค่าไขมันและน้ำมัน (Oil & Grease, O & G) ของตัวอย่างน้ำเสีย

การวิเคราะห์ค่าไขมันและน้ำมันในตัวอย่างน้ำเสียของงานวิจัยนี้ใช้วิธี Soxhlet extraction (APHA, 2012) มีวิธีการดังนี้

(1) เตรียมตัวอย่างน้ำเสียที่มีไขมันสูง ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

(2) เติม 1:1 กรดไนตริกเข้มข้นร้อยละ 70 (HNO_3 70%) ให้พีเอชน้อยกว่า 2 (ประมาณ 5 มิลลิลิตร ต่อน้ำเสีย 1,000 มิลลิลิตร

(3) วางกระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร บนชุดกรองสุญญากาศ (Vacuum pump) ฉีดน้ำกลั่นให้เปียก

(4) ประกอบชุดกรองสุญญากาศ และเปิดให้เครื่องทำงาน เท Celite 545 coarse (Filter aid) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผ่านชุดกรองสุญญากาศ ล้างด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ดูดน้ำจนหมดเทน้ำตัวอย่างลงบนชุดกรองสุญญากาศ ดูดน้ำตัวอย่างจนหมด

(5) ใช้คีมคีบ (Forceps) คีบกระดาษกรองวางบนจานแก้ว ใช้สำลีสะอาดชุบ n-Hexane 99% เช็ดไขมันและน้ำมันที่เกาะอยู่ในกรวยกรอง (Funnels) ให้หมด และนำไปใส่รวมกับกระดาษกรอง

(6) ม้วนกระดาษกรองและสำลีจากข้อ (5) ใส่ในหลอดกระดาษกรองสำหรับสกัด (Cellulose extraction Thimble)

(7) ใส่ลูกแก้ว (Glass bead) ลงในหลอดสกัดให้เต็ม หลังจากนั้นนำหลอดสกัดบรรจุลงในเครื่องสกัดซอกห์เลต (Soxhlet extractor)

(8) ชั่งน้ำหนักขวดก้นกลม (Round bottom Flask) ให้เป็นค่า A (เตรียมขวดก้นกลมก่อนการวิเคราะห์โดยนำขวดก้นกลมไปอบที่อุณหภูมิ 103 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในตู้ดูดความชื้นจนกว่าจะนำมาใช้ในการวิเคราะห์) หลังจากนั้นเติม n-Hexane 99% ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลม

(9) เปิดเครื่องสกัดซอกห์เลต ทำการสกัด 20 รอบต่อชั่วโมง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

(10) ปิดเครื่องสกัดซอกห์เลตนำขวดก้นกลมที่มี n-Hexane 99% ไปอังไอน้ำที่อุณหภูมิ 80 °C จนแห้ง (ขั้นตอนนี้ ต่อชุดกลั่นเข้ากับขวดก้นกลมเพื่อนำ n-Hexane 99% กลับมาใช้ได้อีก) หลังจากนั้นดูดอากาศผ่านขวดอีก 1 นาที ปล่อยให้ขวดก้นกลมเย็นในตู้ดูดความชื้น เป็นเวลา 30 นาที และนำไปชั่งน้ำหนักให้เป็นค่า B คำนวณค่าน้ำมันและไขมันดังนี้

$$\text{มิลลิกรัมของค่าน้ำมันและไขมันต่อลิตร} = \frac{Wr}{Vs}$$

เมื่อ Wr = น้ำหนักของขวดก้นกลมและสารที่เหลือ (B) – น้ำหนักขวดก้นกลมเปล่า (A), มิลลิกรัม

Vs = ปริมาตรตัวอย่างน้ำเสีย, ลิตร

2. การวัดค่าดัชนีเอนไซม์เปส (Lipase enzyme index)

ถ่ายเชื้อจากหลอดเชื้อที่เก็บรักษาด้วยปลายเข็มเขี่ยเชื้อใช้จุด (Spot) เชื้อทดสอบบนจานอาหารแข็ง Tributyrin 1% (Tributyrin agar 1%) บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 2 วัน (ทำการทดลองแบบ 3 ซ้ำ) วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสและขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี หน่วยเป็นมิลลิเมตร เพื่อหาประสิทธิภาพการย่อยสลาย (Index of hydrolysis) หรือค่าดัชนีเอนไซม์ (Enzyme index) (Hendrickset al., 1995) การคำนวณดัชนีเอนไซม์ดังนี้

$$\text{ดัชนีเอนไซม์} = \frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี+วงใส}}{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี}}$$

3. การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Lipase enzyme activity)

(1) นำเชื้อทดสอบมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว SMP1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นเก็บตัวอย่าง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ทำการทดลองแบบ 3 ซ้ำ) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใส (Supernatant) ได้เป็นสารละลายเอนไซม์หยาบ (Crude enzyme)

(2) ทำการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี Colorimetric method (Hoshino et al., 1992) โดยใช้ p-nitrophenyl palmitate (pNPP) เป็นสับสเตรท

(3) นำสารละลายเอนไซม์หยาบ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย D ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ก่อนใช้) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 15 นาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

(4) หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลาย C ปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร

(5) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยใช้ Extinction coefficient เท่ากับ 15 $L.nmol^{-1}.cm^{-1}$ โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้กรดพลามิติกอิสระ 1 ไมโครโมล (µmol) ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 55 °C มีสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลตร)} = 0.222 \times A_{410}$$

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

<u>สารเคมี</u>

1. สารละลาย A

ละลาย 4-nitrophenyl palmitate (pNPP) จำนวน 30 มิลลิกรัม ใน 2-propanol ให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2. สารละลาย B

ละลาย Sodium deoxycholate (NaDOC) จำนวน207 มิลลิกรัม และ Gum Arabic จำนวน 100 มิลลิกรัม ใน 5 mM Phosphate buffer (pH 8.0) ให้ได้ปริมาตรเป็น 90 มิลลิลิตร

3. สารละลาย C(เข้มข้น 2 โมลาร์)

ละลาย Sodium carbonate (Na_2CO_3) จำนวน 211.80 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

4. สารละลาย D

ผสมสารละลาย A ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กับสารละลาย B ปริมาตร 90 มิลลิลิตร

5. 5 mM Phosphate buffer (pH 8.0)

5.1 500 mM Phosphate buffer (pH 8.0)

-	0.05 M Dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.2H_2O$)	47.35	มิลลิลิตร
-	0.05 M Mono sodium phosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$)	2.65	มิลลิลิตร
	ปริมาตรรวม	50	มิลลิลิตร

เตรียม (1) สารละลาย 0.05 M Dibasic sodium phosphate ดังนี้ ละลายสาร Dibasic sodium phosphate จำนวน 7.80 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร และ (2) สารละลาย 0.05 M Mono sodium phosphate ดังนี้ ละลายสาร Mono sodium phosphate จำนวน 8.90 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

เตรียม 500 mM Phosphate buffer (pH 8.0) โดยผสมสารละลาย 0.05 M Dibasic sodium phosphate ปริมาตร 47.35 มิลลิลิตร และ 0.05 M Mono sodium phosphate

ปริมาตร 2.65 มิลลิลิตร ได้ปริมาตรทั้งหมด 50 มิลลิลิตร หลังนั้น ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

5.2 5 mM Phosphate buffer (pH 8.0)

ดูดสารละลาย 500 mM Phosphate buffer (pH 8.0)ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ

6. 0.85% Sodium chloride

ละลาย Sodium chloride (NaCl) จำนวน 0.85 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

<u>อาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

1. Enrichment medium with palm oil 2% (EMP2 medium)

- น้ำมันปาล์ม	20	มิลลิลิตร
- Yeast extract	0.3	กรัม
- Peptone	1.0	มิลลิลิตร
- Amonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$)	5	กรัม
- Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	0.5	กรัม
- Magnesium Sulfate Heptahydrate ($MgSO_4.7H_2O$)	0.3	กรัม
- Tween80	0.5	มิลลิลิตร

นำสารทั้งหมดผสมให้เข้ากัน ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอช 7 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

2. Screening medium with palm oil 1% and Bromocresol purple agar (SMP1B agar)

- น้ำมันปาล์ม	10	มิลลิลิตร
- Yeast extract	0.3	กรัม
- Peptone	1.0	มิลลิลิตร
- Amonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$)	5	กรัม
- Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	0.5	กรัม
- Magnesium Sulfate Heptahydrate ($MgSO_4.7H_2O$)	0.3	กรัม

- Tween80 0.5 มิลลิลิตร
- Bromocresol purple 0.64 กรัม
- Agar powder 15 กรัม

นำสารทั้งหมดผสมให้เข้ากัน ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอช 7 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

3. Screening medium with palm oil 1% medium (SMP1 medium)

- น้ำมันปาล์ม 10 มิลลิลิตร
- Yeast extract 0.3 กรัม
- Peptone 1.0 มิลลิลิตร
- Amonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$) 5 กรัม
- Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) 0.5 กรัม
- Magnesium Sulfate Heptahydrate ($MgSO_4.7H_2O$) 0.3 กรัม
- Tween80 0.5 มิลลิลิตร

นำสารทั้งหมดผสมให้เข้ากัน ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอช 7 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

4. Screening medium with palm oil 1% agar (SMP1 agar)

- น้ำมันปาล์ม 10 มิลลิลิตร
- Yeast extract 0.3 กรัม
- Peptone 1.0 มิลลิลิตร
- Amonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$) 5 กรัม
- Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) 0.5 กรัม
- Magnesium Sulfate Heptahydrate ($MgSO_4.7H_2O$) 0.3 กรัม
- Tween80 0.5 มิลลิลิตร
- Agar powder 15 กรัม

นำสารทั้งหมดผสมให้เข้ากัน ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอช 7 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

5. Tributyrin agar 1%

- Tributyrin	10	มิลลิลิตร
- Nutrient agar	20	กรัม
- Tween80	1	มิลลิลิตร
- Agar powder	15	กรัม

นำสารทั้งหมดผสมให้เข้ากัน ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

6. Nutrient broth with Gycerol 30% and Palm oil 1%

- น้ำมันปาล์ม	1	มิลลิลิตร
- Nutrient broth	2	กรัม
- Tween80	0.1	มิลลิลิตร

นำสารทั้งหมดผสมให้เข้ากัน ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค
ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียจากถังดักไขมัน

ตารางผนวกที่ ค-1 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียจากถังดักไขมัน

ลำดับ	ตัวอย่างน้ำเสีย	ไอโซเลท	ผลทดสอบ SMP1B agar [1]	ผลทดสอบ Tributyrin agar 1% [2]
1	S1 ร้านข้าวแกง	NJS11	บวก	ลบ
2	S1 ร้านข้าวแกง	NJS12	บวก	ลบ
3	S1 ร้านข้าวแกง	NJS15	บวก	ลบ
4	S1 ร้านข้าวแกง	NJS18	บวก	ลบ
5	S2 ร้านอาหารจานเดียว	NJS21	บวก	ลบ
6	S2 ร้านอาหารจานเดียว	NJS22	บวก	ลบ
7	S2 ร้านอาหารจานเดียว	NJS23	บวก	ลบ
8	S3 ร้านอาหารจานเดียว	NJS31	บวก	ลบ
9	S3 ร้านอาหารจานเดียว	NJS32	บวก	ลบ
10	S3 ร้านอาหารจานเดียว	NJS33	บวก	ลบ
11	S3 ร้านอาหารจานเดียว	NJS34	บวก	ลบ
12	S3 ร้านอาหารจานเดียว	NJS36	บวก	ลบ
13	S4 ร้านอาหารตามสั่ง	NJS41	บวก	ลบ
14	S4 ร้านอาหารตามสั่ง	NJS42	บวก	ลบ
15	S4 ร้านอาหารตามสั่ง	NJS43	บวก	ลบ
16	S4 ร้านอาหารตามสั่ง	NJS44	บวก	ลบ
17	S5 ร้านข้าวแกง	NJS51	บวก	ลบ
18	S5 ร้านข้าวแกง	NJS52	บวก	ลบ
19	S5 ร้านข้าวแกง	NJS53	บวก	ลบ
20	S5 ร้านข้าวแกง	NJS54 [3]	บวก	บวก
21	S5 ร้านข้าวแกง	NJS55	บวก	ลบ
22	S6 ร้านก๋วยเตี๋ยว	NJS61	บวก	ลบ
23	S6 ร้านก๋วยเตี๋ยว	NJS62	บวก	ลบ
24	S6 ร้านก๋วยเตี๋ยว	NJS63	บวก	ลบ
25	S6 ร้านก๋วยเตี๋ยว	NJS64	บวก	ลบ

ตารางผนวกที่ ค-1 (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่างน้ำเสีย	ไอโซเลท	ผลทดสอบ SMP1B agar [1]	ผลทดสอบ Tributyrin agar 1% [2]
26	S7 ร้านข้าวแกง	NJS71	บวก	ลบ
27	S7 ร้านข้าวแกง	NJS72[3]	บวก	บวก
28	S7 ร้านข้าวแกง	NJS75	บวก	ลบ
29	S7 ร้านข้าวแกง	NJS76	บวก	ลบ
30	S8 ร้านก๋วยเตี๋ยว	NJS81	บวก	ลบ
31	S8 ร้านก๋วยเตี๋ยว	NJS82	บวก	ลบ
32	S8 ร้านก๋วยเตี๋ยว	NJS83	บวก	ลบ
33	S9 ร้านอาหารตามสั่ง	NJS91	บวก	ลบ
34	S9 ร้านอาหารตามสั่ง	NJS92	บวก	ลบ
35	S9 ร้านอาหารตามสั่ง	NJS93	บวก	ลบ
36	S9 ร้านอาหารตามสั่ง	NJS94	บวก	ลบ
37	S10 ร้านก๋วยเตี๋ยว	NJS101	บวก	ลบ
38	S10 ร้านก๋วยเตี๋ยว	NJS102	บวก	ลบ
39	S10 ร้านก๋วยเตี๋ยว	NJS103	บวก	ลบ
40	S10 ร้านก๋วยเตี๋ยว	NJS104	บวก	ลบ
41	S10 ร้านก๋วยเตี๋ยว	NJS105	บวก	ลบ

หมายเหตุ : 1. ผลการทดสอบ SMP1B agar ซึ่งเป็นอาหารคัดเลือก ถ้า บวกคือ ให้ลักษณะโคโลนีสีเหลืองหรือลบคือ ให้ลักษณะโคโลนีสีอื่น

2. ผลการทดสอบ Tributyrin agar 1% ซึ่งเป็นอาหารทดสอบการย่อยสลายไขมัน ถ้า บวกคือ เกิดวงใสรอบโคโลนีหรือลบคือ ไม่เกิดวงใสรอบโคโลนี

3. ไอโซเลทที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน โดยให้ผลการทดสอบ Tributyrin agar 1% เป็นบวก

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล ดร. ณัฏฐวี ชั่งชัย

ประวัติการศึกษา วท.บ. (สาธารณสุขศาสตร์) มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ส.ม. (อนามัยสิ่งแวดล้อม) มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ปร.ด. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม) มหาวิทยาลัยบูรพา

สถานที่ติดต่อ คณะสาธารณสุขศาสตร์และสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ชื่อ-นามสกุล ดร. จิริสุดา สินธุศิริ

ประวัติการศึกษา วท.บ. (สาธารณสุขศาสตร์) มหาวิทยาลัยมหิดล

วท.ม. สุขาภิบาลสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยมหิดล

ปร.ด. (กีฏวิทยาและสิ่งแวดล้อม)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สถานที่ติดต่อ คณะสาธารณสุขศาสตร์และสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ