รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีททะเลในการผลิตเอนไซม์เพื่อบำบัดน้ำเสีย

The efficiency of enzyme from marine Actinomycetes in waste water treatment

ณิษา สิรนนท์ธนา
จันทร์จรัส วัฒนะโชติ
มะลิวัลย์ คุตะโค

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 256107A1080039
สัญญาเลขที่ 124/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีททะเลในการผลิตเอนไซม์เพื่อบำบัดน้ำเสีย
The efficiency of enzyme from marine Actinomycetes in waste water treatment

ณิษา สิรนนท์ธนา
จันทร์จรัส วัฒนะโชติ
มะลิวัลย์ คุตะโค

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

ตุลาคม พ.ศ. 2561

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 124/2561

บทคัดย่อ

จากการทดสอบค่ากิจกรรมเอมไซม์ ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสับสเตรทของเชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต ที่เลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 ความเค็ม 17 ppt. ค่าความเป็นกรดด่าง 6.2 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน พบเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6, CP58-4-20 และ CP58-9-16 แสดงค่าการทำงานเอนไซม์อะไมเลสดีที่สุด เชื้อแอคติโนมัยซีท CP58-9-20, NS56-4-6 และ PL1-4 แสดงค่าการทำงานเอนไซม์เซลลูเลสดีที่สุด และเชื้อแอคติโนมัยซีท CP15-9-2, CP58-9-18 และ CP15-6-9 แสดงค่าการทำงานเอนไซม์โปรติเอสดีที่สุด เชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6, CP58-4-20, CP58-9-16, CP58-9-20 และ PL1-4 มีศักยภาพในการพัฒนาไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานแป้งมันหรือโรงงานที่มีวัสดุเหลือทิ้งเป็นแป้งหรือเซลลูโลส เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส และเอนไซม์เซลลูเลสที่ดี ส่วนเชื้อแอคติโนมัยซีท CP15-9-2, CP58-9-18 และ CP15-6-9 เหมาะสำหรับนำมาประยุกต์ใช้อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์นม เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสดีที่สุด เชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร ISP2 มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นองค์ประกอบได้ โดยสามารถลดค่า COD ลงได้ร้อยละ 69.40 แต่ไม่มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานน้ำปลา

Abstract

Based on the activity of the enzyme. The actinomycetes were cultured in ISP2, salinity 17 ppt, pH 6.2, temperature 30°C for 4 days. The actinomycetes NS56-4-6, CP58-4-20 and CP58-9-16 show the best amylase activity. CP58-9-20, NS56-4-6 and PL1-4 show the best cellulase activity. CP15-9-2, CP58-9-18 and CP15-6-9 showed the highest protease activity. NS56-4-6, CP58-4-20, CP58-9-16, CP58-9-20 and PL1-4 have the potential to be used in the treatment of wastewater from starch industry or a industry with waste materials as a starch or cellulose. Because it can produce enzymes amylase and cellulase. Actinomycetes CP15-9-2, CP58-9-18 and CP15-6-9 are suitable for use in the dairy industry. Because the enzyme can produce the best protease. The ISP2 as culture medium of actinomycete is effective in treating synthetic wastewater with cassava starch COD reduction was 69.40%, but no efficiency in wastewater treatment from fish sauce factory.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญภาพ ..... ฌ
บทที่ 1 บทนำ 1
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 1
เอนไซม์ (Enzyme) 2
การประยุกต์ใช้เอนไซม์ 2
การย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย 6
วิธีการบำบัดน้ำเสีย 10
การบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ 11
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 11
ความสำคัญและที่มาของปัญหา 13
วัตถุประสงค์ของการวิจัย 14
ขอบเขตการวิจัย 14
วิธีดำเนินการวิจัยและแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย 15
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 16
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย 17
สถานที่ทำการทดลอง 17
ระยะเวลาทำการทดลอง 17
วัสดุและอุปกรณ์ 17
สารเคมี 17
การเตรียมหัวเชื้อแอคติโนมัยซีท 19
วิธีการทดลอง 19
ผลการวิจัย 26
การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติในผลิตเอนไซม์ 26
การศึกษาอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์
ของเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 32
ผลของความเป็นกรด – ด่าง และความเค็มต่อกิจกรรมของเอนไซม์ 35
การศึกษากิจกรรมเอนไซม์จากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 รายวัน 38
การบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์แป้งมันสำปะหลังโดยวัดอัตราการลดลงของ COD 42
ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท
NS56-4-6 43

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 อภิปรายผลการวิจัย	58
การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์	58
สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6	60
การบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6	62
การบำบัดน้ำเสียโรงงานน้ำปลา	64
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	66
สรุปผลการวิจัย	66
ข้อเสนอแนะ	66
ผลผลิต	68
เอกสารอ้างอิง	74
ภาคผนวก	79
ภาคผนวก ก สูตรอาหาร	80
ภาคผนวก ข น้ำเสีย	82
ภาคผนวก ค Standard Protein	84
ประวัติคณะผู้วิจัย	87

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 22
2 ปริมาณตัวอย่างและรีเอเจนต์ที่ใช้สำหรับขนาดต่างๆ ของภาชนะที่ใช้ในการย่อยสลาย สำหรับการวิเคราะห์ COD โดยวิธีฟลักซ์แบบปิด..... 25
3 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต..... 27
4 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต..... 28
5 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต..... 29
6 กิจกรรมเอนไซม์เอสเทอเรสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต 30
7 กิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์จากเชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต 31
8 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ISP2, ISP2+CMC, ISP2+SS และ OYC..... 32
9 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ISP2, ISP2+CMC, ISP2+SS และ OYC..... 33
10 กิจกรรมเอนไซม์โปติเอสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ISP2, ISP2+CMC, ISP2+SS และ OYC..... 33
11 กิจกรรมเอนไซม์เอสเทอเรสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ISP2, ISP2+CMC, ISP2+SS และ OYC..... 34
12 กิจกรรมเอนไซม์เอสเทอเรสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ISP2, ISP2+CMC, ISP2+SS และ OYC..... 35
13 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส จากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเค็มที่แตกต่างกัน 36
14 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเค็มที่แตกต่างกัน 36
15 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส จากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเค็มที่แตกต่างกัน 37
16 กิจกรรมเอนไซม์เอสเทอเรส จากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเค็มที่แตกต่างกัน 37
17 กิจกรรมไลโซไซม์ จากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเค็มที่แตกต่างกัน 37
18 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 รายวัน..... 38
19 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 รายวัน..... 39
20 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 รายวัน..... 40
21 กิจกรรมเอนไซม์เอสเทอเรสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 รายวัน 41
22 กิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์จากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 รายวัน 42
23 อัตราการลดลงของ COD ในน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 43

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

24 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดของเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 44

25 ปริมาณตะกอนในน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 46

26 ค่าความเค็ม ในน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6..... 47

27 อุณหภูมิ ในน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6..... 48

28 ค่าออกซิเจนละลายน้ำในน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 49

29 อัตราการลดลงของ COD ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 50

30 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 51

31 ปริมาณตะกอนในน้ำเสียโรงงานน้ำปลา จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 52

32 ค่าความเค็มในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6. 53

33 อุณหภูมิ ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 .. 54

34 ค่าออกซิเจนละลายน้ำ ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 55

35 ปริมาณแอมโมเนีย (mg-N/L) ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 56

36 ปริมาณไนไตร์ท (mg-N/L) ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 57

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ปฏิกิริยาของ 3,5 –dinitrosalicylic acid (DNS) ที่หมู่ไนโตร 1 หมู่ถูกรีดิวซ์ โดยหมู่แอลดีไฮด์ของน้ำตาลกลายเป็น 3–amino–5 –nitrosalicylate ที่มีสีส้ม-แดง	6
2	กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต	26
3	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต	27
4	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต	28
5	กิจกรรมเอนไซม์เอสเทอเรสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต	30
6	กิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์จากเชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต	31
7	กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่แตกต่างกัน 4 ชนิด	32
8	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่แตกต่างกัน 4 ชนิด	33
9	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่แตกต่างกัน 4 ชนิด	34
10	กิจกรรมเอนไซม์เอสเทอเรสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่แตกต่างกัน 4 ชนิด	34
11	กิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์จากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่แตกต่างกัน 4 ชนิด	35
12	กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 รายวัน	38
13	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 รายวัน	39
14	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 รายวัน	40
15	กิจกรรมเอนไซม์เอสเทอเรสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 รายวัน	41
16	กิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์จากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 รายวัน	42
17	อัตราการลดลงของ COD ของน้ำเสียสังเคราะห์แป้งมันสำปะหลัง จากการบำบัด ด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6	43
18	ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำเสียสังเคราะห์แป้งมันสำปะหลังจากการบำบัด ด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6	44
19	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6	45
20	ปริมาณตะกอนในน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6	45
21	ค่าความเค็มในน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6	46
22	อุณหภูมิทั้ง ในน้ำเสียสังเคราะห์จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6	47
23	ค่าออกซิเจนละลายน้ำ ในน้ำเสียสังเคราะห์จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6	48
24	อัตราการลดลงของ COD ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6	49

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

25 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 50

26 ปริมาณโปรตีนในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 51

27 ปริมาณตะกอนในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 52

28 ค่าความเค็ม ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6... 53

29 อุณหภูมิในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6..... 54

30 ค่าออกซิเจนละลายน้ำ ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 55

31 ปริมาณแอมโมเนีย (mg-N/L) ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6..... 56

32 ปริมาณไนไตร์ท (mg-N/L) ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 57

บทที่ 1
บทนำ

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แอคติโนมัยซีทเป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณเบสกัวนีน (Guanine) และไซโตซีน (Cytosine) ในสารพันธุกรรมสูงกว่า 55 % พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ ทั้งในดิน บนบก ทะเลลึกบริเวณพื้นดินใกล้ชายฝั่ง และบริเวณป่าชายเลน (Jensen et al., 1991 and Takizawa et al., 1993) ส่วนใหญ่พบในดิน ซึ่งในดินที่อุดมสมบูรณ์ 1 กรัม สามารถพบแอคติโนมัยซีทได้มากกว่า 1 ล้านเซลล์ โดยมันสามารถมีชีวิตอยู่ได้ด้วยการใช้สารอินทรีย์เพียงเล็กน้อยที่มีอยู่ในดินนั้น อย่างไรก็ตาม แอคติโนมัยซีทในดินมักพบอยู่ในระยะพักตัวในลักษณะของสปอร์ ต่อเมื่อปัจจัยสิ่งแวดล้อมเหมาะสมเช่น มีสารอาหารเพียงพอ มีอุณหภูมิและความชื้นเหมาะสมก็จะมีการงอกของสปอร์และสร้างเป็นเส้นใยขึ้น (รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์, 2549; Goodfellow & Simpson, 1987) โคโลนีของแอคติโนมัยซีทมีลักษณะที่แตกต่างจากโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ คือมีลักษณะทึบแสง เส้นใยเหนือผิวออาหารแห้ง หรือผิวโคโลนีอาจเรียบคล้ายหนังสัตว์หรือเป็นรอยย่นเป็นเส้นใยสั้น ๆ สังเกตด้วยตาเปล่าคล้ายกำมะหยี สามารถสร้างรงควัตถุสีต่าง ๆ ได้เช่น สีขาว เทา เขียว เหลือง ส้ม แดง น้ำตาล ชมพู ม่วง และดำ เป็นต้น รูปร่างแบบฟิลาเมนท์ที่ต่อกันเป็นเส้นยาว ซึ่งมีลักษณะคล้ายเชื้อรา แต่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่าเชื้อรา คือ ประมาณ 0.5-1.2 ส่วนความคล้ายคลึงกับฟังไจ คือ มีการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual spore) แอคติโนมัยซีทจะมีปริมาณเท่ากับชีวมวลของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในดิน ทำให้ส่งผลดีต่อการเจริญของแอคติโนมัยซีทในดิน จึงพบในดินประมาณ 10 -33 เปอร์เซ็นต์ (Waksman et al., 1967) แบคทีเรียกลุ่มนี้มีส่วนช่วยในการย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ ทำให้เกิดการหมุนเวียนของแร่ธาตุในสิ่งแวดล้อมที่สำคัญ คือ มีความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีมาก โดยเฉพาะยาปฏิชีวนะ (Berdy, 2005) ซึ่งประมาณสองในสามของยาปฏิชีวนะที่มีใช้ในปัจจุบันมีที่มาจากเชื้อแอคติโนมัยซีท (Takizawa et al., 1993)

การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทใหม่ ๆ ส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปที่เชื้อแอคติโนมัยซีทหายากเพื่อค้นหาสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ ๆ (Lazzarini et al., 2000) และการแยกเชื้อที่สร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลไซโลสจากซังข้าวโพด (Czoch & Mordarski, 1988) และเชื้อแอคติโนมัยซีททนร้อนที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยเซลลูโลสและไซแลนได้ในสภาวะที่เป็นกรด (Mac Kenzie et al., 1984) นอกจากนี้เชื้อแอคติโนมัยซีทในสกุล Nocardia และ Rhodococcus สามารถย่อยสลายลิกนินและสารประกอบโมโนเมอร์ที่เป็นสารอะโรมาติกซึ่งเกียวข้องกับการเกิดโครงสร้างทีเป็นหน่วยของสารประกอบฟีนอลสำหรับการรวมตัวเป็นฮิวมัส (Humification) จะเห็นได้ว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทมีบทบาทเป็นผู้ย่อยสลายปฐมภูมิในการย่อยสลายและการทำให้เกิดกระบวนการเกิดฮิวมัส

ในปัจจุบันแอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียที่กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากจากนักวิจัยในหลาก หลายด้าน ทั้งงานทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ งานทางด้านพันธุศาสตร์ รวมถึงงานทางด้านนิเวศวิทยา เนื่องจากแอคติโนมัยซีทมีความหลากหลายและสามารถทนอุณหภูมิได้สูงกว่าแบคทีเรียทั่วไป นอกจากนี้ยังค้นพบสารเมตาโบไลท์ที่สำคัญหลายชนิด และมีโครงสร้างพันธุกรรมที่หลากหลาย แอคติโนมัยซีทสามารถสร้างเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ (Extracellular enzymes) ซึ่งสามารถ

นำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ได้ โดยที่ในธรรมชาตินั้น พบว่าแอคติโนมัยซีทสามารถสร้างเอนไซม์ออกมาหลายชนิด เพื่อใช้ในการย่อยสายโพลิเมอร์ของซากพืช ซากสัตว์ หรือ เชื้อราที่ตายแล้ว อาทิ เช่น เซลลูเลส (Cellulase) ไคติเนส (Chitinase) เอสเทอร์เรส (Esterase) จึงกล่าวได้ว่าแอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีความสำคัญทางการแพทย์ เภสัชกรรมในการใช้บำบัดรักษาโรค ด้านการเกษตร แอคติโนมัยซีทมีบทบาทสำคัญในการกำจัดเชื้อราที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคในพืช (ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล, 2555) และในด้านสิ่งแวดล้อมใช้เป็นตัวย่อยสลายทางชีวภาพเพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีเพื่อเป็นการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม เช่น เอนไซม์เอสเทอร์เรส (Esterase) เป็นเอนไซม์ทำหน้าที่หลักในการตัดพันธะเอสเทอร์ สามารถแบ่งออกได้สองกลุ่ม คือ กลุ่มไฮโดรเลส (Hydrolase) และ กลุ่มของแคทตาเลส (Catalyze) สามารถพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ มีความสามารถในการกำจัดสารพิษ โลหะหนัก และสารกำจัดแมลงและวัชพืช โดยที่เอนไซม์จะทำการตัดพันธะเอสเทอร์หรือเร่งปฏิกิริยาทำให้ความเป็นพิษลดน้อยลง สามารถย่อยสลายสารทางชีวภาพต่อได้ นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียโดยการใช้เอนไซม์ในกลุ่มของไกลโคซิเดสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายโมเลกุลพอลิเมอร์ของน้ำตาลด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) โดยการทำลายพันธะไกลโคซิดิคของน้ำตาลสองหน่วยโมเลกุลให้หลุดออกจากกัน ส่วนใหญ่จะพบในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การย่อยแป้งเพื่อให้เกิดน้ำตาล โดยเอนไซม์ที่จะมีช่วงการทำงานที่ช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิที่เหมาะสม การใช้เอนไซม์จะไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างเหมือนการใช้สารเคมี เนื่องจากเอนไซม์จะถูกทำลายโดยจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม แต่เราสามารถศึกษาสภาวะที่คงตัวของเอนไซม์ได้ เพื่อผลิตและพัฒนาให้เอนไซม์สามารถทำงานได้ในช่วงสภาวะที่กว้าง รวมถึงสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ หากมีการตรึงเอนไซม์ไว้บนตัวพยุงที่เหมาะสม การใช้เอนไซม์จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ดีต่อสิ่งแวดล้อม (รัชดาภรณ์ ศรีปรางค์ โคบายาชิ, 2556)

เอนไซม์ (Enzyme)

เอนไซม์ คือ โปรตีนที่มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพได้ มีบทบาทในการเร่งและควบคุม กระบวนการทางชีวเคมีทั้งในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กเช่นจุลินทรีย์จนกระทั่งสิ่งมีชีวิตชั้นสูงคือสัตว์และมนุษย์ ซึ่ง จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่าง ๆ ในร่างกาย อาทิเช่น กระบวนการย่อยอาหาร การสังเคราะห์ชีวโมเลกุล ที่ มีส่วนสำคัญในการเจริญเติบโตและช่วยซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอของร่างกาย เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ทั้งในเซลล์และการศึกษาในหลอดทดลอง โดยที่การศึกษาสภาวะในหลอดทดลองต้องใกล้เคียงกับสภาวะในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง การทำงานของเอนไซม์จะคล้ายกับปฏิกิริยาเคมีทั่วไป คือ การเร่งปฏิกิริยาโดยการลดพลังงานการกระตุ้นของปฏิกิริยาโดยที่เอนไซม์ไม่ถูกทำลายหรือเปลี่ยนไปเป็นสารโมเลกุลอื่น แต่มีความแตกต่างจากการเร่งปฏิกิริยาทางเคมี คือ เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นหรือที่เรียกว่าซับสเตรต (Substrate) เอนไซม์ส่วนใหญ่จะมีขนาดของโมเลกุลใหญ่กว่าซับสเตรท เอนไซม์จะมีบริเวณเร่งปฏิกิริยาซึ่งจะต้องเข้าจับกับซับเสตรทแล้วทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาที่บริเวณเร่งประกอบไปด้วยบริเวณจับ และบริเวณเร่งปฏิกิริยา

การผลิตเอนไซม์

ในปัจจุบันเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ รา และมีเอนไซม์บางชนิดที่ได้จากเนื้อเยื่อพืช หรือ สัตว์ ในขั้นตอนของการผลิตเอนไซม์จึงจำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ ไม่ว่าจะเป็น การเลือกสายพันธุ์

ของจุลินทรีย์ที่จะใช้ในการผลิตเอนไซม์ โดยที่คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตจะต้องมีความสามารถในการผลิตและ หลั่งเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ได้ นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่ใช้ต้องเป็นสายพันธุ์ที่ดีและไม่ก่อโรค ปลอดภัย ไม่เป็นอันตรายทั้งในกระบวนการผลิตและในสิ่งแวดล้อม ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงไม่นานเพื่อให้ได้เอนไซม์ที่ต้องการ (http://nstda.or.th/: สืบค้นเมื่อวันที่ 5 พฤศจิกายน 2559)

การประยุกต์ใช้เอนไซม์

ปัจจุบันมีการใช้เอนไซม์เพื่อเร่งปฏิกิริยาในทางอุตสาหกรรม เนื่องจากข้อดีของการใช้เอนไซม์คือเอนไซม์มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาเพื่อให้ได้สารผลิตภัณฑ์แล้วเอนไซม์เองไม่สลายไปเป็นสารโมเลกุลอื่นแต่สามารถย้อนกลับมาเร่งปฏิกิริยาอีกครั้งได้ มีความจำเพาะต่อซับสเตรท มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาสูง เร่งปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และต่อเนื่องในสภาวะที่เหมาะสม ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณของเอนไซม์เพียงเล็กน้อยก็ตาม นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีความสามารถในการทำงานร่วมกับสารตั้งต้นได้ในปริมาณมากโดยที่ไม่เสียสภาพการทำงาน หากไม่มีปัจจัยรบกวน เช่น อุณหภูมิที่สูงเกินไป หรือค่าความเป็นกรด-ด่างมากเกินไป ในยุคแรก ๆ ของการนำเอนไซม์มาใช้ประโยชน์นั้นเห็นได้ชัดเจนคือการนำเอนไซม์โปรติเอสจากจุลินทรีย์ผสมลงไปในสารซักล้างเพื่อใช้ในการย่อยโปรตีน การนำเอาเอนไซม์อะไมเลสมาใช้ในการแปรรูปแป้งโดยสามารถเปลี่ยนแป้งไปเป็นน้ำตาลได้ ต่อมาในอุตสาหกรรมหลาย ๆ ประเภทก็มีการนำเอนไซม์มาใช้อย่างแพร่หลายมากขึ้น ไม่ว่าจะ เป็นอุตสาหกรรมขนมอบ อุตสาหกรรมนมและผลิตภัณฑ์จากนม รวมถึงอุตสาหกรรมเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (Ailton et al., 2016)

เอนไซม์ที่ใช้ในการแพทย์ เริ่มมีการใช้เอนไซม์โปรติเอสเข้ามาประยุกต์ใช้รักษาโรคมะเร็งตั้งแต่ปี ค.ศ. 1996 และมีการใช้เอนไซม์อื่น ๆ เพิ่มขึ้นโดยเริ่มตั้งแต่กรใช้เอนไซม์ไลเปส โปรติเอสเป็นส่วนประกอบของยาที่ช่วยในการย่อยอาหารของผู้ป่วยที่มีความผิดปกติในเรื่องการย่อยอาหาร ซึ่งเอนไซม์ที่จะสามารถนำมาใช้ในทางการแพทย์ได้จะต้องมีความบริสุทธิ์สูง มีคุณภาพในการบำบัดรักษาสูงสุดและมีผลข้างเคียงน้อยที่สุด ดังนั้นขั้นตอนในการคัดเลือกเอนไซม์จึงต้องมีความพิถีพิถันเพื่อหลีกเลี่ยงสิ่งปนเปื้อนให้มากที่สุด (Kyungmin, 2016)

เอนไซม์แอสพาราจีเนส ใช้สำหรับรักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน โดยมีหลักการ คือ เซลล์ที่ผิดปกติจะไม่สามารถสร้างกรดอะมิโนแอสพาราจีนได้ ดังนั้นเซลล์ที่ผิดปกติก็จะสกัดแอสพาราจีนจากระบบไหลเวียนเลือดในร่างกาย เอนไซม์แอนพาราจิเนสจะย่อยแอสพาราจีนให้ไปเป็น กรดแอสพาร์ติกและแอมโมเนีย เพื่อขัดขวางเซลล์ที่ผิดปกติโดยการดึงเอากรดอะมิโนแอสพาราจีนจาก ของเหลวในระบบไหลเวียนโลหิตของร่างกายไปใช้ ส่งผลให้เซลล์ที่ผิดปกติฝ่อและจะถูกทำลายไปในที่สุด (Jitesh D. Kawedia, 2014)

เอนไซม์กลูตามิเนส ใช้สำหรับรักษาผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวร่วมกับการใช้เอนไซม์แอสพาราจิเนส เนื่องจากกลูตามีนเป็นกรดอะมิโนที่ส่งเสริมการเจริญของเซลล์มะเร็ง จึงมีการใช้เอนไซมม์กลูตามิเนสใน การย่อยกลูตามีนให้เป็นกลูตาเมตและแอมโมเนีย เป็นการขัดขวางเซลล์ที่ผิดปกติ โดยการดึงเอากรดอะมิโน กลูตามีนจากระบบไหลเวียนโลหิตในร่างกายไปใช้ เมื่อเซลล์มะเร็งไม่สามารถใช้กลูตามีนได้ก็จะถูกทำลายไป (William, 2014)

เอนไซม์ปาเปน เป็นเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากยางมะละกอและในต้นมะละกอ ใช้ในการกำจัด เนื้อเยื่อที่ตายแล้วรอบ ๆ บาดแผล ทั้งแผลธรรมดาและแผลไฟไหม้ ซึ่งมีข้อดีคือช่วยให้แผลหาย

เร็วขึ้น เอนไซม์ธรอมบิน ที่สกัดได้จากพลาสมาของวัว ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์โดยใช้ในการห้ามเลือดระหว่างการผ่าตัดหรือทาง ทันตกรรม เช่น การถอนฟัน โดยการเปลี่ยนไฟบริโนเจนไปเป็นไฟบริน และเปปไทด์สายสั้น ๆ ซึ่งมีส่วนช่วยในการแข็งตัวของเลือด ลดการเสียเลือดมากขณะรับการรักษาดังกล่าว (Alpay, 2015)

เอนไซม์ที่ใช้การตรวจวัดทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่นใช้เพื่อตรวจหาโมเลกุลที่ต้องการโดยวิธีการทางอิมมูโน อาศัยหลักการของการจับกันระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี โดยใช้เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส มาเชื่อมกับแอนติบอดีเพื่อตรวจจับโมเลกุลที่ต้องการจะศึกษา โดยการย่อย p-nitrophenyl phosphate ซึ่งเป็นซับสเตรทแล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็น p-nitrophenol ที่มีสีเหลือง ตรวจสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง หรือเอนไซม์ที่ใช้เป็นไบโอเซนเซอร์ ซึ่งเป็นเครื่องมือตรวจวิเคราะห์โมเลกุลที่ใช้ในทางการแพทย์ สิ่งแวดล้อม โดยประกอบไปด้วยสองส่วนหลักคือ ตัวแปลงสัญญาณ และ สารชีวภาพ โดยที่ตัวแปลงจะทำหน้าที่ในการ แปลงแสงให้เป็นสัญญาณไฟฟ้า เพื่อระบุถึงปริมาณสารที่ต้องการวิเคราะห์ เช่นการวัดน้ำตาลในลือดของ ผู้ป่วยเบาหวาน โดยใช้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสเป็นตัวจับกลูโคส ตัวอย่างนี้เรียกว่า กลูโคไบโอเซนเซอร์ (Aihua Liu, 2017)

เอนไซม์ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในอุตสาหกรรมใหม่ที่มีการคาดการณ์ว่าจะมีการเพิ่มปริมาณการใช้มากขึ้นอย่างแพร่หลายในอนาคต โดยผลิตภัณฑ์ทางความงามสามารถแบ่งออก ได้หลายประเภท ทั้งในส่วนของการบำรุงเส้นผม คือ การเติมเอนไซม์ไลเปสลงไปในแชมพู หรือครีมนวดผม เพื่อใช้กำจัดน้ำมันส่วนเกิน การเติมโปรติเอสเพื่อกำจัดโปรตีนที่เสียสภาพแล้วให้ออกจากเส้นผม ทำให้ผม สะอาด เครื่องประทินผิว เช่นการเติมเอนไซม์ไลเปสลงในครีมทำความสะอาดผิวหน้าและผลิตภัณฑ์ลบ เครื่องสำอาง ซึ่งเอนไซม์ไลเปสจะมีส่วนช่วยในการกำจัดไขมันที่อยู่บนผิวหน้า ทำให้ผิวหน้าสะอาด ไม่มัน คีราติเนสในครีมบำรุงผิวเช่นโลชั่น หรือครีมขัดผิว มีส่วนช่วยในการกำจัดเซลล์ผิวที่ตายแล้วทำให้ผิวนุ่ม และยังมีการเติมเอนไซม์โปรติเอสลงในยาสีฟัน เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่เกาะอยู่ในช่องปาก เป็นการช่วยขจัดคราบและกลิ่นปากที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย และอาจมีการเติมกลิ่นอื่น ๆ ในผลิตภัณฑ์

การย่อยหรือไฮโดรไลซิส (Hydrolysis)

การย่อยหรือไฮโดรไลซิสเป็นกระบวนการเปลี่ยนโพลีแซคคาไรด์ (แป้งและเซลลูโลส) เป็นน้ำตาล โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยอย่างสมบูรณ์คือ กลูโคส (สิริวรรณ แก้วชิงดวง, 2554) สามารถทำได้ 2 วิธีหลัก ๆ คือ

3.1 การย่อยด้วยสารเคมี (Chemical hydrolysis) แบ่งเป็น

1) การย่อยด้วยกรด (Acid hydrolysis) อาจแบ่งได้เป็น 2 กระบวนการ คือ

1.1 กระบวนการที่ใช้กรดแก่ เช่น กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid) หรือ กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Sulfuric acid) ผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลกลูโคส แต่ข้อเสียคือ สารละลายที่ได้ มีความเป็นกรดสูง ต้องปรับสภาพก่อนนำไปใช้ และเกิดการผุกร่อนของเครื่องมือจากการใช้กรดแก่

2.2 กระบวนการที่ใช้กรดอ่อน เป็นการใช้กรดอ่อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 180 องศาเซลเซียส วิธีการนี้จะไม่สามารถนำกรดกลับมาใช้ใหม่ได้ แต่จะถูกทำให้เป็นกลางด้วยปูนขาว หรือแคลเซียม คาร์บอเนต

2. การย่อยด้วยด่าง (Alkaline hydrolysis) สารเคมีที่นิยมใช้ในการย่อย คือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซม์ (Sodium Hydroxide) เจือจาง ซึ่งจะมีผลทำให้สายของโพลีแซคคาไรด์สั้นลง ปฏิกิริยานี้ จะเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 160-180 องศาเซลเซียส

การย่อยด้วยเอนไซม์ (Enzymetic hydrolysis) การย่อยด้วยเอนไซม์ เพื่อเปลี่ยนแป้งและเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส โดยเอนไซม์ที่ ใช้ในการย่อยทั่วไปจะผลิตจากเชื้อราและแบคทีเรีย เอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่สิ่งมีชีวิตสร้างขึ้นเพื่อ ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาภายในเซลล์และมีความจำเพาะต่อสับสเตรท จึงทำให้มีผลข้างเคียงน้อย ทำให้ผลิตภัณฑ์ ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงและไม่ทำให้เกิดการผุกร่อนของเครื่องมือ เอนไซม์ที่มีความสำคัญในการย่อยแป้ง และเส้นใย เพื่อเปลี่ยนแป้งและเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลคือ เอนไซม์อะไมเลส และเอนไซม์เซลลูเลส

1. เอนไซม์อะไมเลส (amylase) (Domingues and Peralta, 1993)

อะไมเลสเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีกิจกรรมการย่อยสลายโมเลกุลของแป้ง ไกลโคเจน และสารอนุพันธ์ของโพลีแซคคาไรด์เป็นหน่วยย่อยของน้ำตาล ซึ่งอาจจะอยู่ในรูปของ เดกซ์ตริน (Dextrin) และกลูโคส

1.1 แอลฟา-อะไมเลส (**α**-amylase) พบทั่วไปทั้งในสัตว์และพืช ตลอดทั้งจุลินทรีย์หลายชนิด เอนไซม์มีบทบาทสำคัญในการย่อยแป้งให้เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ โดยมีความเจาะจงต่อการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกชนิดแอลฟา -1,4 (**α**-1,4) ในลักษณะตัดภายในสายโพลิเมอร์อย่างอิสระ ได้ผลผลิต เป็นกลูแคน (glucan) และ alpha-limit dextrin ที่มีหน่วยกลูโคสประมาณ 2-6 หน่วย

1.2 กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) เป็นเอนไซม์ที่พบทั่วไปในจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และ รา มีลักษณะสำคัญของปฏิกิริยาการย่อยแป้งคือ สามารถย่อยสลายแป้งได้ทั้ง 2 พันธะ คือ พันธะไกลโคซิดิกชนิดแอลฟา -1,4 (**α**-1,4) และพันธะไกลโคซิดิกชนิดแอลฟา -1,6 (**α**-1,6) ผลผลิต ที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นน้ำตาลกลูโคส ในการย่อยแป้งให้ได้โมเลกุลของกลูโคสจะต้องใช้กลูโคอะไมเลส ร่วมกับแอลฟาอะไมเลส

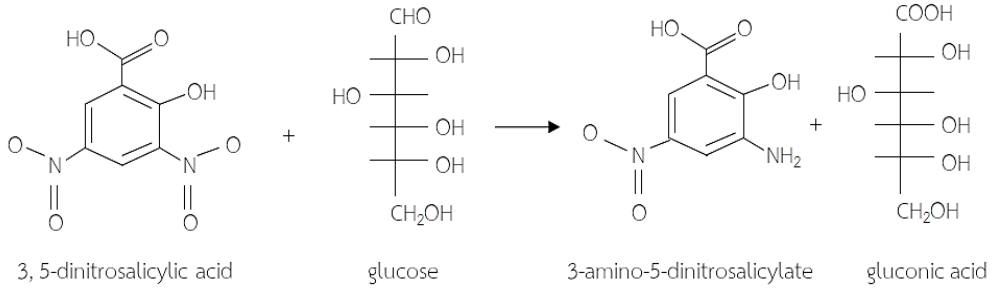
2. เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยเซลลูโลส ทำหน้าที่ตัดพันธะไกลโคซิดิกในเซลลูโลส ทำให้เกิดการสลายเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส ผลิตได้โดยสิ่งมีชีวิตทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เช่น ข้าวมอลต์ ข้าวบาร์เลย์ ใบยาสูบ ไส้เดือนดิน ปลวก หอยทาก แบคทีเรีย และรา เป็นต้น

น้ำตาลรีดิวซ์และการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลสามารถทำได้หลายวิธี ดังเช่น วิธีดีเอนเอส (DNS) วิธีวิเคราะห์โดยสารละลายเบเนดิกต์ และวิธีทางโพลาริเมตริก ซึ่งการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีดีเอนเอสเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กับตัวอย่างที่มีน้ำตาลในปริมาณน้อย โดยน้ำตาลที่เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugars) มีทั้งน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ (Monosaccharide) และน้ำตาลไดแซคคาไรด์ (Disaccharide) ซึ่งส่วนใหญ่จะมีหมู่คาร์บอนิล (Carbonyl group) ที่จะถูกออกซิไดซ์ได้ง่าย ตัวอย่างของน้ำตาลรีดิวซ์ เช่น น้ำตาลกลูโคส (Glucose) น้ำตาลมอลโตส (Maltose) น้ำตาลเซลโลไบโอส (Cellobiose) และน้ำตาลแลคโตส (Lactose)

ตามโครงสร้างของน้ำตาลรีดิวซ์พบว่าในหนึ่งโมเลกุลจะมีปลายรีดิวซ์ (Reducing end) อยู่ 1 หน่วย และปลายที่เป็นนอนรีดิวซ์ (nonreducing end) 1 หน่วย ส่วนโพลีแซคคาไรด์ที่มีโครงสร้างเป็นกิ่งก้าน (Branched) ในหนึ่งโมเลกุลจะมีปลายที่เป็นนอนรีดิวซ์สูงกว่าตามจำนวนกิ่งก้านที่มี แต่ถึงจะมีกิ่งก้านสูงอย่างไร ก็ยังมีปลายรีดิวซ์เพียงตำแหน่งเดียวเท่านั้น

ในการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อาศัยคุณสมบัติที่น้ำตาลสามารถรีดิวซ์โลหะอิออน เช่น Cu^{2+} หรือ Ag^{+} ได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ละลายน้ำ คุณสมบัติในการรีดิวซ์โลหะอิออนนั้นนอกจากจะใช้เพื่อตรวจสอบปริมาณแล้วยังสามารถใช้ในการบอกตำแหน่งของหน่วยย่อยในคาร์โบไฮเดรทที่เป็นพอลิเมอร์ได้ การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์นิยมใช้ปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของดีเอนเอส (3,5 –dinitrosalicylic acid, DNS) โดยสารละลายดีเอนเอสมีหมู่ไนโตร 2 หมู่ และมีลักษณะสีเหลือง เมื่อหมู่ไนโตร 1 หมู่ถูกรีดิวซ์โดยหมู่แอลดีไฮด์ของน้ำตาลโดยมีความร้อนและสารละลายด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะทำให้สารละลายดีเอนเอสกลายเป็นสีส้ม-แดง ที่สามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 520-550 นาโนเมตรดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ปฏิกิริยาของ 3,5 –dinitrosalicylic acid (DNS) ที่หมู่ไนโตร 1 หมู่ถูกรีดิวซ์โดยหมู่ แอลดีไฮด์ของน้ำตาลกลายเป็น 3–amino–5 –nitrosalicylate ที่มีสีส้ม-แดง
ที่มา : http://www.lsbu.ac.uk/biology/enzyme/practical1.html

การย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย

ในด้านสิ่งแวดล้อมแอคติโนมัยซีทใช้เป็นตัวย่อยสลายทางชีวภาพเพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมี เป็นการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม โดยที่อาศัยความสามารถในการสร้างเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ได้ เชื้อแอคติโนมัยซีทในธรรมชาติส่วนใหญ่มีถิ่นอาศัยอยู่ในดิน จึงมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบของสารอินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบอินทรีย์จากพืชและสัตว์จะทนทานต่อการย่อยสลายในน้ำเสียที่มีสารอินทรีย์มากจะมีแบคทีเรียและเชื้อราอยู่มาก ส่วนแอคติโนมัยซีทจะเจริญเติบโตได้ช้ากว่า จึงจะเจริญภายหลังเชื้อเหล่านั้น และจะเจริญได้ดีเมื่อจุลินทรีย์ที่เป็นคู่แข่งได้ลดปริมาณลงแล้ว คือในช่วงที่สารประกอบมีโมเลกุลขนาดใหญ่และทนทานต่อการย่อยสลายอยู่มาก แอคติโนมัยซีทที่มีหลากหลายสายพันธุ์จะช่วยย่อยสลายสารพวก กรดอินทรีย์ น้ำตาลชนิดต่าง ๆ แป้ง ไขมัน และโปรตีน (Alexander, 1997) โดยสารประกอบโปรตีนในโครงสร้างของสัตว์และพืช จะประกอบด้วยกรดอะมิโนเรียงต่อกันเป็นสายยาว จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถย่อยสลายโปรตีนเพื่อใช้เป็นเหล่งไนโตรเจนได้รวมทั้งแอคติโนมัยซีทด้วย (จีรพรรณ์ ใจอินผล, 2550) และมีแอคติโนมัยซีทบางกลุ่ม สามารถตรึงไนโตรเจนและฟอสเฟตที่อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ เช่นสกุล *Nocardia* และยังมีแอคติโนมัยซีทที่อยู่รวมกับพืชแล้วสามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศได้คือ Frankia นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงความสามารถของ *Streptosporangium* ที่แยกได้จากดินที่เป็นกรดในการละลายหินฟอสเฟตให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ได้ โดยเชื้อในกลุ่มนี้สามารถผลิตกรดออกมาย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียได้ (ชนิกานต์ คุ้มนก, 2554)

ลักษณะคุณสมบัติของน้ำเสีย

น้ำเสียจากกิจกรรมต่าง ๆ ในชีวิตประจำวัน ซึ่งมีองค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้

(1) สารอินทรีย์ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน เช่น เศษข้าว ก๋วยเตี๋ยว น้ำแกง เศษใบตอง พืชผัก ชิ้นเนื้อ เป็นต้น ซึ่งสามารถถูกย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจน ทำให้ระดับออกซิเจนละลายน้ำ (Dissolved Oxygen) ลดลงเกิดสภาพเน่าเหม็นได้ ปริมาณของสารอินทรีย์ในน้ำนิยมวัดด้วยค่าบีโอดี (BOD) เมื่อค่าบีโอดีในน้ำสูง แสดงว่ามีสารอินทรีย์ปะปนอยู่มากและสภาพเน่าเหม็นจะเกิดขึ้นได้ง่าย (Bitton, 2005)

(2) สารอนินทรีย์ได้แก่ แร่ธาตุต่าง ๆ ที่อาจไม่ทำให้เกิดน้ำเน่าเหม็น แต่อาจเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต ได้แก่ คลอไรด์, ซัลเฟอร์ เป็นต้น (Bitton, 2005)

(3) โลหะหนักและสารพิษ อาจอยู่ในรูปของสารอินทรีย์หรืออนินทรีย์และสามารถสะสมอยู่ในวงจรอาหาร เกิดเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต เช่น ปรอท โครเมียม ทองแดง ปกติจะอยู่ในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมและสารเคมีที่ใช้ในการกำจัดศัตรูพืชที่ปนมากับน้ำทิ้งจากการเกษตร สำหรับในเขตชุมชนอาจมีสารมลพิษนี้ มาจากอุตสาหกรรม ในครัวเรือนบางประเภท เช่น ร้านซุบโลหะ อู่ซ่อมรถ และน้ำเสียจาก โรงพยาบาล เป็นต้น (Bitton, 2005)

(4) น้ำมันและสารลอยน้ำต่าง ๆ เป็นอุปสรรคต่อการสังเคราะห์แสงและกีดขวางการกระจายของออกซิเจนจากอากาศลงสู่น้ำทำให้เกิดสภาพไม่น่าดู

(5) ของแข็ง เมื่อจมตัวสู่ก้นลำ น้ำ ทำให้เกิดสภาพไร้ออกซิเจนที่ท้องน้ำ ทำให้แหล่งน้ำตื้นเขิน ความขุ่นสูง มีผลกระทบต่อการดำรงชีพของสัตว์น้ำ

(6) สารก่อให้เกิดฟองหรือสารซักฟอก ได้แก่ ผงซักฟอก สบู่ ฟองจะกีดกันการกระจายของออกซิเจนในอากาศสู่น้ำ และอาจเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ

(7) จุลินทรีย์ น้ำเสียจากโรงฟอกหนัง โรงฆ่าสัตว์ หรือโรงงานอาหารกระป๋อง จะมีจุลินทรีย์เป็นจำนวนมากจุลินทรีย์เหล่านี้ใช้ออกซิเจนในการดำรงชีวิตสามารถลดระดับของออกซิเจนละลายน้ำทำให้เกิดสภาพเน่าเหม็น นอกจากน้ำจุลินทรีย์บางชนิดอาจเป็นเชื้อโรคที่เป็นอันตรายต่อประชาชน เช่น จุลินทรีย์ในน้ำเสียจากโรงพยาบาล (Bitton, 2005)

(8) ธาตุอาหาร ได้แก่ ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส เมื่อมีปริมาณสูงจะทำให้เกิดการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วของสาหร่าย (Algae Bloom) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญทำให้ระดับออกซิเจนในน้ำลดลงต่ำมากในช่วงกลางคืน อีกทั้งยังทำให้เกิดวัชพืชน้ำ ซึ่งเป็นปัญหาแก่การสัญจรทางน้ำ (Bitton, 2005)

(9) กลิ่น เกิดจากก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายของสารอินทรีย์แบบไร้ออกซิเจนหรือกลิ่นอื่น ๆ จากโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น โรงงานทำปลา โรงฆ่าสัตว์ เป็นต้น

องค์ประกอบและคุณลักษณะน้ำเสียที่แสดงโดยพารามิเตอร์

(1) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เป็นค่าที่บอกถึงความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำเสีย ทั่วไปสิ่งมีชีวิตในน้ำและจุลินทรีย์ในถังบำบัดจะดำรงชีพได้ดีในสภาะเป็นกลาง คือ pH ประมาณ 6-8

(2) บีโอดี (Biochemical Oxygen Demand) เป็นค่าที่บอกถึงปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ ถ้าค่าบีโอดีสูงแสดงว่าความต้องการออกซิเจนสูง นั่นคือมีความสกปรกหรือสารอินทรีย์ในน้ำมาก (Tchobanoglous et al., 2004)

(3) ปริมาณของแข็ง (Solids) หมายถึง ปริมาณสารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในน้ำเสียทั้งในลักษณะที่ไม่ละลายน้ำและที่ละลายน้ำ (Dissolved Solids) ของแข็งบางชนิดมีน้ำหนักเบาและแขวนลอยอยู่

ในน้ำ (Suspended Solids) บางชนิดหนักและจมตัวลงเบื้องล่าง (Settleable Solids) ของแข็งที่ไม่ละลายน้ำ อาจสร้างปัญหาในการอุดตัน เครื่องเติมอากาศ และถ้าปล่อยทิ้งในปริมาณมากจะทำให้เกิดความสกปรกและตื้นเขินในลำน้ำธรรมชาติ ตลอดจนบดบังแสงแดดที่ส่องลงสู่ท้องน้ำ (Tchobanoglous et al., 2004)

(4) ไนโตรเจน (Nitrogen) เป็นธาตุจำเป็นในการสร้างเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ไนโตรเจนจะเปลี่ยนสภาพเป็นแอมโมเนีย ถ้าหากในน้ำมีออกซิเจนพอเพียงก็จะถูกย่อยสลายไปเป็นไนไตรต์และไนเตรท ดังนั้นการปล่อยน้ำเสียมีสารประกอบไนโตรเจนสูงจึงทำให้ออกซิเจนที่มีอยู่ในน้ำลดน้อยลง (Tchobanoglous et al., 2004)

(5) ไขมันและน้ำมัน (Grease and Oil) ส่วนใหญ่ ได้แก่ น้ำมันและไขมันจากพืชและสัตว์ที่ใช้ในการทำอาหาร สบู่จากการอาบน้ำ ฟองสารซักฟอกจากการชำระล้าง สารเหล่านี้มีน้ำหนักเบาและลอยน้ำ ทำให้เกิดสภาพไม่น่าดูและขวางกั้นการซึมของอกอซิเจนจากอากาศสู่แหล่งน้ำ นอกจากนี้ยังมีค่าบีโอดีสูงเพราะเป็นสารอินทรีย์ (Chowdhury et al., 2010)

(6) ซีโอดี (Chemical Oxygen Demand, COD) คือค่าปริมาณออกซิเจนที่ใช้ในการย่อยสารอนินทรีย์ด้วยวิธีการทางเคมีมักใช้เทียบหาค่าบีโอดี ซึ่งปกติ COD: BOD ของน้ำเสียชุมชนประมาณ 2-4 เท่า (Tchobanoglous et al., 2004)

การบำบัดน้ำเสีย หมายถึง การกำจัดหรือทำลายสิ่งปนเปื้อนในน้ำเสียให้หมดไป หรือเหลือน้อยที่สุดให้ได้มาตรฐานที่กำหนดและไม่ทำให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม น้ำเสียจากแหล่งต่างกันจะมีคุณสมบัติไม่เหมือนกันดังนั้นกระบวนการบำบัดน้ำจึงมีหลายวิธี โดยระบบบำบัดน้ำเสียทั่วไปมี 3 วิธี คือ

1. กระบวนการทางเคมี (Chemical process)

เป็นวิธีการบำบัดน้ำเสียโดยการแยกสารต่าง ๆ หรือสิ่งปนเปื้อนในน้ำเสียที่บำบัด เช่น โลหะหนัก สารพิษ สภาพความเป็นกรด ด่างสูง ๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ด้วยการเติมสารเคมีต่าง ๆ ลงไปเพื่อให้เข้าไปทำปฏิกิริยาซึ่งจะมีประโยชน์ในการแยกสาร แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือ เมื่อเติมสารเคมีลงในน้ำเสียแล้ว ทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและวิธีนี้จะมีค่าใช้จ่ายสำหรับสารเคมีค่อนข้างสูง ดังนั้นกระบวนการทางเคมีจะเลือกใช้ก็ต่อเมื่อน้ำเสียไม่สามารถบำบัดได้ด้วยกระบวนการทางกายภาพหรือชีวภาพ

การทำให้เกิดตะกอน (Precipitation) อาศัยหลักการเติมสารเคมีลงไปทำปฏิกิริยาทำให้เกิดกลุ่มตะกอนตกลงมา โดยทั่วไปสารแขวนจะมีประจุลบ ดังนั้นสารเคมีที่เติมลงไปจึงเป็นประจุบวกเพื่อทำให้เป็นกลาง การแยกด้วยวิธีนี้มีค่าใช้จ่ายสูงแต่ก็มีประสิทธิภาพสูงเช่นกัน ดังนั้นวิธีนี้จะเลือกใช้ต่อเมื่อไม่สามารถ แยกได้โดยกระบวนการทางชีวภาพหรือกายภาพ

โดยส่วนมากสารเคมีที่ทำให้เกิดตะกอนจะละลายน้ำ เช่น เกลือของสารประกอบต่าง ๆ เช่น เกลืออะลูมิเนียมซัลเฟต หรือสารส้ม ($Al_2(SO_4)$) เกลือเหล็ก ($FeCl_3$, $FeSO_4$) และเกลือของแคลเซียม ($Ca(OH)_2$) ส่วนเกลือที่นำมาช่วยในการเกิดตะกอนได้ดียิ่งขึ้นนี้เป็นสารประกอบของ กลุ่ม Activated ของ Silica และ Polyelectrolytes โดยกระบวนการทางเคมีมีหลายวิธี

การเกิดออกซิเดชันทางเคมี (Chemical oxidation) อาศัยหลักการเสียอิเล็กตรอนของอะตอม ให้แก่สารเคมีที่เติมลงไปในน้ำเสียโดยสารเคมีนี้จะทำหน้าที่เป็นตัวออกซิไดซ์ (Oxidizing agent) ส่วนมากวิธีนี้จะนิยมใช้เปลี่ยนโมเลกุลของโลหะที่เป็นพิษ เช่น การเปลี่ยน Fe^{2+} ซึ่งมีพิษมากไปเป็นสาร Fe^{3+} ซึ่งมีพิษน้อย ด้วยคลอรีน ดังแสดงในสมการต่อไปนี้

$$2Fe^{2+} + Cl_2 \text{ ---> } 2\ Fe^{3+} + 2Cl^-$$

การเกิดรีดักชันทางเคมี (Chemical reduction)

เป็นปฏิกิริยาที่มีการรับอิเล็กตรอน วิธีการนี้เป็นการเปลี่ยนสภาพของสารพิษไปเป็นสารที่มีอันตรายน้อยลง อะตอมหรืออิออน ของสารพิษจะรับอิเล็กตรอนจากสารเคมีที่เติมลงไปซึ่งมีสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์ (reducing agent) เช่น การเปลี่ยน Cr^{6+} ซึ่งมีพิษมากไปเป็น Cr^{3+} ด้วย เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) ในสภาพที่เป็นกรด ดังแสดงในสมการต่อไปนี้

$$6\ FeSO_4 + 2\ CrO_3 + 6\ H_2SO_4 \text{ -----> } 3\ Fe_2(SO_4)_3 + Cr_2(SO_4)_3 + 6\ H_2O$$

การสะเทิน (Neutralization) เป็นการเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำเสียให้มีฤทธิ์เป็นกลาง (pH = 7) ถ้าต้องการปรับค่าน้ำเสียที่มีฤทธิ์เป็นกรด (pH < 7 ในน้ำเสียให้สูงขึ้นต้องเติมสารที่มีฤทธิ์เป็นด่าง เช่น แคลเซียมคาร์บอเนตหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ ส่วนกรณีถ้าต้องการปรับน้ำเสียมีฤทธิ์เป็นด่าง (pH > 7) ให้มีค่า pH ต่ำลงจะต้องเติมกรด เช่น กรดซัลฟิวริก กรดไนตริก กรดเกลือและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น

2. กระบวนการทางชีววิทยา (Biological Process)

กระบวนการทางชีววิทยา (Biological process) เป็นการอาศัยหลักการใช้จุลินทรีย์ต่าง ๆ มาทำการย่อยสลายเปลี่ยนอินทรีย์สารไปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และแอมโมเนีย เป็นการบำบัดน้ำเสียที่ดีที่สุดในแง่ของการลดปริมาณสารอินทรีย์ในแหล่งน้ำ แต่หลักการนี้เลือกสภาวะแวดล้อมให้เหมาะกับการทำงานของจุลินทรีย์ โดยสัมพันธ์กับปริมาณของจุลินทรีย์ และเวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย แบคทีเรียที่เลือกใช้ในการย่อยสลายสารอินทรีย์แยกออกได้เป็น 2 ประเภท คือ แบคทีเรียที่ต้องใช้ออกซิเจน (Aerobic bacteria) ส่วนกลุ่มที่ 2 เป็นพวกไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic bacteria)

3. กระบวนการทางกายภาพ (Physical process)

กระบวนการทางกายภาพ (Physical process) เป็นการบำบัดน้ำเสียอย่างง่ายซึ่งจะแยกของแข็งที่ไม่ละลายน้ำออก วิธีนี้จะแยกตะกอนได้ประมาณ 50-65% ส่วนเรื่องการแยกความสกปรกในรูปของสารอินทรีย์ (BOD5) ประมาณ 20-30% เท่านั้น วิธีการต่าง ๆ ในกระบวนการนี้มีหลายวิธี เช่น การดักด้วยตะแกรง (Screening) เป็นการแยกเศษขยะต่าง ๆ ที่มากับน้ำเสีย เช่น เศษไม้ ถุงพลาสติก กระดาษ ตะแกรงมีหลายขนาด การดักด้วยตะแกรงจึงเป็นการแยกขั้นตอนแรกในการบำบัดน้ำเสีย การตัดย่อย (Combination) คือ การใช้เครื่องตัดทำลายเศษขยะขนาดใหญ่ให้มีขนาดเล็กลง การกวาด (Skimming) เป็นการกำจัดนำมันและไขมันโดยทำการดักหรือกวาดออกจากน้ำเสีย การทำให้ลอย (Floating) จะใช้กับตะกอนที่มีความถ่วงจำเพาะน้อยกว่าน้ำ การตกตะกอน (Sedimentation) เป็นการแยกตะกอนออกจากน้ำเสียโดยอาศัยหลักการเรื่องแรงโน้มถ่วง ซึ่งจะใช้กับตะกอนที่มีความถ่วงจำเพาะมากกว่าน้ำ

4. กระบวนการทางกายภาพ-เคมี (Physical-chemical process)

เป็นกระบวนการที่ต้องมีอุปกรณ์ช่วยมากกว่ากระบวนการที่กล่าวมา ซึ่งกระบวนการนี้จะใช้ในขั้นตอนสุดท้ายในการบำบัดน้ำเสีย ที่ผ่านกระบวนในขั้นตอนอื่นแล้ว เช่น กระบวนการดังต่อไปนี้

4.1 การดูดซับด้วยถ่าน (Carbon adsorption) วิธีการนี้ใช้ผงถ่านหรือคาร์บอนเป็นตัวดูดซับสารเจือปนที่ละลายอยู่ในน้ำทิ้ง

4.2 การแลกเปลี่ยนประจุ วิธีการนี้อาศัยหลักการแลกเปลี่ยนประจุระหว่างสารปนเปื้อนในน้ำเสียกับตัวกลางที่บรรจุซึ่งมีทั้งประจุบวกและประจุลบ โดยจะมีการลำเลียงน้ำภายใน

วิธีการบำบัดน้ำเสีย

ขั้นตอนการบำบัดน้ำเสีย โดยทั่วไปการบำบัดน้ำทิ้งแบ่งออกได้เป็น 4 ขั้น ดังนี้

1. การบำบัดขั้นเตรียมการ (Preliminary treatment) เป็นขั้นตอนการแยกสิ่งสกปรกที่มีขนาดใหญ่ ไม่ละลายน้ำออกจากน้ำ โดยการใช้ตะแกรง (Screens)

2. การบำบัดขั้นต้น (Primary treatment) น้ำเสียที่ผ่านขั้นตอนจากข้อที่ 1 แล้ว จะถูกนำมาตกตะกอนในถังตกตะกอน ซึ่ง เรียกว่า primary sludge การบำบัดในขั้นนี้จะลดค่า BOD ได้ประมาณ 25-40% แล้วแต่คุณลักษณะของน้ำทิ้งและประสิทธิภาพของถังตกตะกอน

3. การบำบัดขั้นที่สอง (Secondary treatment) น้ำเสียจากข้อ 2 จะถูกนำเข้าไปสู่ถังเติมอากาศซึ่งจะมีการเติมอากาศให้แก่แบคทีเรียโดยใช้เครื่องเติมอากาศ แบคทีเรีย ช่วยย่อยสลายและกำจัดสารอินทรีย์หรือ BOD ซึ่งอยู่ในรูปของสารละลายหรืออนุภาคคอลลอยด์ ออกไปจากน้ำกลายเป็นตะกอน ตกลงไปที่ก้นถังกากตะกอนในส่วนนี้จะถูกนำไปกำจัดต่อไป น้ำในส่วนบนของถังตกตะกอนจะใสขึ้น ในขั้นตอนนี้จะช่วยลดค่า BOD ลงได้ประมาณ 75-95% ซึ่งค่า BOD ของน้ำส่วนนี้จะต่ำกว่า 20 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถปล่อยทิ้งลงสู่แม่น้ำได้แต่ถ้าต้องการความสะอาดเหมาะแก่การนำกลับมาใช้ใหม่เข้าสู่การบำบัดขั้นที่ 3 ต่อไป

4. การบำบัดขั้นที่สาม (Tertiary treatment) ต้องการความบริสุทธิ์สะอาดสามารถนำกลับมาใช้อุปโภคและบริโภคได้ กระบวนการบำบัดนี้จึงเป็นกระบวนการเคมีรวมกับฟิสิกส์ - เคมี น้ำทิ้งจากการบำบัด ขั้นตอนที่สอง จะถูกนำมาตกตะกอนด้วยวิธีทางเคมีแยกสารประกอบฟอสเฟตออกด้วยปูนขาว จากนั้นจึงนำมากำจัดสารอินทรีย์ที่เหลืออยู่ด้วยกระบวนการทาง ฟิสิกส์ -เคมีด้วยวิธีการ ion exchange ซึ่งจะได้น้ำที่สะอาดเมื่อผ่านการฆ่าเชื้อโรคแล้วจะได้น้ำที่สะอาด

หลักการจัดการน้ำเสีย

หลักการจัดการน้ำเสียที่สำคัญได้แก่การนำน้ำเสียที่เกิดขึ้นเข้าสู่กระบวนการบำบัดให้ได้ตามมาตรฐานน้ำทิ้ง ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม และสุขภาพอนามัย โดยทั่วไปการจัดการน้ำเสียจะประกอบด้วย

1. การรวบรวมน้ำเสีย (Collection)
2. การบำบัดน้ำเสีย (Treatment)
3. การนำกลับมาใช้ประโยชน์ (Reuse and reclamation)

สำหรับโรงงานอุตสาหกรรมมีการจัดการระบบบำบัดน้ำเสียต่างกันไปทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดพื้นที่ในการจัดการเรื่องระบบน้ำเสีย สำหรับโรงงานอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ที่มีการถ่ายเทน้ำเสียในปริมาณมากออกสู่สิ่งแวดล้อม เช่นโรงงานน้ำตาล โรงงานผลิตอาหารทางการเกษตร จะมีการจัดการเรื่องระบบบำบัดซึ่งต้องใช้พื้นที่ขนาดใหญ่ ดังนั้นระบบบำบัดจึงเหมาะสำหรับเป็นระบบบ่อชนิดต่าง ๆ ทั้งมีการใช้ออกซิเจนและไม่มีการใช้ออกซิเจน บ่อบำบัดที่ใช้ออกซิเจนที่อาศัยหลักการธรรมชาติและง่ายที่สุด เช่น ระบบ บ่อผึ่ง (Oxidation pond)นอกจากนี้ยังมี บ่อเติมอากาศ (Aerated Lagoon) บ่อที่มีออกซิเจน (Aerobic pond) บ่อบำบัดที่ไม่ใช้ออกซิเจน เช่น บ่อหมัก (Anaerobic pond) บ่อบำบัดทั้งสองประเภทจะเป็นรูปบ่อเดียวหรือหลายบ่อต่อเป็นอนุกรมก็ได้ ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและปริมาณของน้ำเสียที่จะทำการบำบัด ระบบบำบัดน้ำเสียเหล่านี้อาศัยการทำงานของแบคทีเรีย

และสาหร่าย บ่อเหล่านี้ยังให้ผลพลอยได้ เช่น จะให้ก๊าซมีเทนมาใช้หุงต้มอาหาร แต่มีข้อจำกัดที่ใช้เนื้อที่ขนาดใหญ่และการทำงานจะดียิ่งขึ้นถ้าบริเวณนั้นมีแสงแดดมาก

ดังนั้นระบบแบบนี้จึงเหมาะกับประเทศที่กำลังพัฒนาซึ่งมีข้อจำกัดในเรื่องการลงทุนและค่าใช้จ่ายระบบบำบัดที่ใช้พื้นที่น้อย ระบบบำบัดในกลุ่มนี้ก็มีมากมายหลายชนิดให้เลือก มีรูปแบบและลักษณะที่แตกต่างกันออกไปเริ่มจากระบบตะกอนแขวนลอย (Activated sludge, AS) ที่ต้องใช้เครื่องจักรกลมากที่สุดและมีค่าใช้จ่ายสูง แต่มีคุณภาพในการจัดการสูง ระบบตะกอนยึดติดวัสดุ (Trickling Filter, TF) ระบบคลองวนเวียน (Oxidation ditch) ระบบจานหมุน (Rotating biological contractors) ระบบบำบัดในกลุ่มนี้ ออกแบบยากกว่า ผู้ดูแลจะต้องมีความรู้ ความเข้าใจจึงจะเกิดประสิทธิภาพ โดยสรุประบบบำบัดน้ำเสียโดยชีวภาพที่นิยมในประเทศไทยมีด้วยกัน 5 ระบบ ได้แก่

1. ระบบเอเอส (Activited Sludge - AS)
2. ระบบคลองวนเวียน (Oxidation Ditch - OD)
3. ระบบจานหมุนชีวภาพ (Rotating Biological Contactors - RBC)
4. ระบบบ่อผึ่ง (Oxidation Pond)
5. ระบบสระเติมอากาศ (Aerated Lagoon)

การบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ

การบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพเป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด เนื่องจากเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าวิธีอื่น วิธีการนี้เป็นการให้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติใช้สารอินทรีย์ที่เจือปนในน้ำเสียเป็นอาหาร สารอินทรีย์ ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ จะถูกใช้เป็นแหล่งพลังงาน ๆ คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และเซลล์ใหม่ ทำให้น้ำเสียมีสารอินทรีย์ลดลงจนอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานตามกฎหมายที่ยอมให้ปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้ แบคทีเรียในระบบบำบัดน้ำเสียโดยทั่วไปพัฒนาจากจุลินทรีย์จากบ่อเกรอะซึ่งมีจุลินทรีย์ที่หลากหลาย เมื่อเดินระบบไปนานพอจนมีการคัดเลือกจุลินทรีย์ตามธรรมชาติทำให้เหลือแต่จุลินทรีย์ชนิดที่เหมาะสมและปริมาณของจุลินทรีย์ค่อนข้างคงที่ การใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมมีประสิทธิภาพในการบำบัดสูงเติมลงในระบบบำบัดน้ำเสียจะช่วยระบบบำบัดเข้าสู่ภาวะเสถียรเร็วขึ้น จึงเป็นที่น่าสนใจ (Emad, 2011) ในการนำมาประยุกต์ใช้กลุ่มจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตหัวเชื้อ เช่น แลคติกแอซิดแบคทีเรีย, แบคทีเรียสังเคราะห์แสง, แอคติโนมัยซีท, ยีสต์และ รา เป็นต้น

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Duan et al. (2015) ศึกษาแบคทีเรียชอบเค็มมีความสามารถในการใช้อินทรีย์คาร์บอนเป็นแหล่งคาร์บอนโดยกระบวนการ nitrification - denitrification แบบใช้ออกซิเจน ที่แยกได้จากตะกอนทะเล พบว่าเป็นเชื้อ Vibrio diabolicus SF16 มีความสามารถถึง 91.82% ของ NH_4^+ -N (119.77 มิลลิกรัม/ลิตร) และ 99.71% ของ NO_3^- -N (136.43 มิลลิกรัม/ลิตร) สภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมคือ ความเค็ม 1 - 5% ใช้โซเดียมอะซิเตท เป็นแหล่งคาร์บอน, C/N เท่ากับ 10 และ ค่า pH 7.5 - 9.5

Behnood et al. (2014) ได้ทำการศึกษาผลความเค็มในน้ำเสีย ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา Phanerochaete chrysosporium และความสามารถในการผลิตเอนไซม์ พบว่าเชื้อราชนิดนี้ความสามารถย่อยสลายน้ำมันดิบที่เป็นมลพิษในน้ำเสียที่มีความเค็ม เช่น น้ำท้องเรือ นอกจากนี้ยังได้

ศึกษาผลของความเค็ม 0, 10, 20, 30 และ 40 กรัม/ลิตร เพื่อคัดเลือกมาเพาะเลี้ยงเชื้อรา ผลการศึกษาพบว่าความเค็มไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา แต่พบว่าการผลิตเอนไซม์ MNPจะลดลงที่ความเค็ม 30 และ 40 กรัม/ลิตร

Hozzein et al. (2012) ทำการแยกแอคติโนมัยซีท จากระบบบำบัดน้ำเสีย Beni-Suef 3 แหล่ง ได้แก่ น้ำเสียก่อนบำบัด, ถังตกตะกอนและน้ำทิ้ง เพื่อศึกษาความสามารถของแอคติโนมัยซีทในการบำบัดทางชีวภาพและการกำจัดโลหะหนักจากน้ำเสีย พบแอคติโนมัยซีท 17 สายพันธุ์ จากนั้นคัดเลือกแอคติโนมัยซีทจำนวน 10 สายพันธุ์ ที่มีสัณฐานวิทยาแตกต่างกันและมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่โดดเด่น กลุ่ม Nocardia, Streptomyces, Rhodococcus, Gordonia และ Nocardiopsis จากนั้นประเมินความสามารถในการบำบัดน้ำเสียโดยการวัดค่า BOD, COD และรวมสารแขวนลอย (TSS); และทดสอบความสามารถในการกำจัดโลหะหนัก เช่น Cu, Fe, Mn, ตะกั่วและสังกะสี ผลการศึกษาพบว่า แอคติโนมัยซีทส่วนใหญ่ที่คัดเลือกจะมีประสิทธิภาพในการการบำบัดน้ำเสียและมีความสามารถในการลดค่า BOD, COD และ TSS และสามารถลดความเข้มข้นของโลหะหนักที่ทดสอบได้อย่างเด่นชัด โดยสายพันธุ์ Streptomyces C11 ถูกพบว่ามีประสิทธิภาพมากที่สุดในการบำบัดน้ำเสียและการกำจัดของโลหะหนัก

ศศิธร ไกรฤทธิชัย (2552) ทำการคัดแยกแบคทีเรีย จากตัวอย่างดิน มูลสัตว์ ขอนไม้ผุ และปุ๋ยหมักภายในภาคเหนือตอนบน จำนวน40 ตัวอย่างคัดแยกได้ 142 ไอโซเลต โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร Carboxymethyl cellulose Agar (CMC Agar) บ่มที่อุณหภูมิ 45, 50, และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทดสอบด้วยวิธี Congo red พบว่ามี 68 ไอโซเลต ที่ทำให้เกิดวงใส (Clear zone) โดยมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มี pH 6.5 มี CMC 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและ yeast extract 3% เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง วัดค่า enzyme activity และค่า specific activity ได้เท่ากับ 194.80 ± 2.05 และ 0.11 ± 0.01 U/μg proton ตามลำดับ จีรานันท์ อินทร์โพธิ์ และวชิรภัทร แคนยุกต์ (2555) ทำการคัดแยกแบคทีเรีย จากดินในพื้นที่อำเภอลับแล จังหวัดอุตรดิตถ์ นำมาศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส (Cellulose) และเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) โดย สังเกตได้จากการเกิดวงใส (Clear zone) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch casein agar ที่มี 1% ของแหล่ง สับสเตรทได้แก่ไซแลน (Xylan) คาร์บอกซีเมทิล เซลลูโลส (Carboxymethyl cellulose หรือ CMC) และอะวิเซล (Avicel) บ่มที่อุณหภูมิ 50o C ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ TF1 เกิดวงใสขนาดใหญ่ที่สุดเมื่อย่อยสลาย CMC ส่วน TF3 เกิดวงใสขนาดใหญ่ที่สุดเมื่อย่อยสลาย Avicel การจัดจำแนกสายพันธุ์ แบคทีเรียด้วยการวิเคราะห์จากลำดับยีน 16S rDNA พบว่าสายพันธุ์ TF1 และTF3 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Actinomadura* sp. (99%) และ *Brevibacillus* sp. (99%) ตามลำดับ สำหรับสายพันธุ์TP4 มีความ คล้ายคลึงกับเชื้อ *Thermoactinomtces* sp. (99%) การทดสอบการผลิตเอนไซม์เพื่อหากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (Specific activity) ของสายพันธุ์ TF1 และTF3 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีเปลือกข้าวโพด (Corn cob) เป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิ 50o C TF1 และ TF3 ผลิตเอนไซม์ Xylanase ได้มากที่สุดเท่ากับ 132.6 และ122.5 U/mg ตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีซังข้าวโพด (corn hull) เป็นแหล่ง คาร์บอน TF1 และTF3 ผลิตเอนไซม์ Avicelase เท่ากับ 115.6 และ 60.2 U/mg ตามลำดับผู้วิจัยกล่าวว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียมีการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจากเป็น เอนไซม์ที่สามารถนำมาย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้เป็นอย่างดี

การบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพเป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด เนื่องจากเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าวิธีอื่น การใช้เอนไซม์จะไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างเหมือนการใช้สารเคมี เนื่องจากเอนไซม์จะถูกทำลายโดยจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม การใช้เอนไซม์จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ดีต่อสิ่งแวดล้อม วิธีการนี้เป็นการให้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติใช้สารอินทรีย์ที่เจือปนในน้ำเสียเป็นอาหาร สารอินทรีย์ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ จะถูกใช้เป็นแหล่งพลังงาน คาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และเซลล์ใหม่ ทำให้น้ำเสียมีสารอินทรีย์ลดลงจนอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานตามกฎหมายที่ยอมให้ปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกทีมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย โดยส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นเส้นใย เชื้อในกลุ่มนี้มีความสำคัญในระบบนิเวศและมีบทบาทต่อความอุดมสมบูรณ์ของดิน โดยผลิตเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่หลายชนิดที่ทับถมในดินซึ่งย่อยสลายยาก เช่น ไคติน เซลลูโลส ลิกนิน เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการสร้างสารต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์เช่น สารปฏิชีวนะ สารต้านมะเร็ง และวิตามินชนิดต่าง ๆ ปัจจุบันแบคทีเรียหลายชนิดในกลุ่มแอคติโนมัยซีทกำลังเป็นที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เพราะนอกจากมีการสร้างสารทุติยภูมิที่สำคัญหลายชนิด มีลักษณะโครงสร้างและมีพันธุกรรมที่หลากหลายแล้ว แอคติโนมัยซีทสามารถสร้างเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ (Extracellular enzyme) ได้หลายชนิด ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ได้หลายด้าน สามารถย่อยสลายยาปราบศัตรูพืช เช่น diuron (Castillo et al., 2006) และ alachlor ซึ่งเป็นยาปราบศัตรูพืชที่มีพิษรุนแรง (Sette et al., 2005) และย่อยสลายยาฆ่าแมลง lindane (γ- hexachloro cyclohexane) (Benimeli et al., 2008) แอคติโนมัยซีทสามารถย่อยสลายสารที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น สารประกอบจำพวก Chlorobenzene, dichlorobenzene และ phenol (Rehfuss and Urban, 2005) รวมทั้งของเสียที่เกิดจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น 1,4-dioxane (Parales et al., 1994) และสามารถย่อยสลายพลาสติกชนิด Polytetramethylene succinate (PTMS) (Jarerat & Tokiwa, 2001) แอคติโนมัยซีทสามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิดเช่น Xylanase, Cellulase, Amylase และ Chitinase เป็นต้น แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีหลายจีนัสที่สามารถผลิต Amylase ที่มีคุณสมบัติในการย่อยแป้งได้ เช่น *Micromonospora, Nocardia* และ *Streptomyces* (Das, 2003) เอนไซม์ Amylase สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่าง ๆ เช่น ลดความหนืดของแป้งในอุตสาหกรรมทอผ้า เพิ่มหรือผลิตสารให้ความหวานในอุตสาหกรรมเบียร์ หรือเครื่องดื่ม เป็นต้น จีนัสที่สามารถผลิต Chitinase ได้แก่ Streptomyces (Dahiya, 2006) เอนไซม์ Chitinase สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ได้เช่น นำมาทำ Protoplast ของราเพื่อศึกษาองค์ประกอบของผนังเซลล์ของรา การสังเคราะห์สารต่าง ๆ การนำมาเป็นสารควบคุมทางชีวภาพ เช่น ใช้ควบคุมราที่ก่อโรคพืช และการนำมาย่อยสลายของเสียทางอุตสาหกรรมการแช่แข็งอาหารทะเลเป็นการเพิ่มมูลค่าของของเสียในอุตสาหกรรม และมีความสำคัญต่อการหมุนเวียนของสารอาหารในธรรมชาติเพื่อนำกลับมาใช้ใหม่อยู่ตลอดเวลา เป็นต้น ปัจจุบันน้ำเสียและสิ่งปฏิกูลต่าง ๆ มีเพิ่มมากขึ้น ซึ่งส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เช่น เกิดการเปลี่ยนแปลงระบบนิเวศ รวมถึงมลพิษทางน้ำที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ ตลอดจนส่งผลให้มีการทำลายทัศนียภาพในเรื่องสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวด้วย

การบำบัดน้ำเสียมีอยู่หลายวิธีการ กระบวนการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความนิยมกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายน้อย โดยมีปัจจัยสำคัญคือ

จุลินทรีย์ ซึ่งทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ในน้ำเสีย ซึ่งเป็นสาเหตุของการที่ออกซิเจนลดลงจนทำให้น้ำเกิดเน่าเสียในที่สุดโดยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียมักมีประสิทธิภาพไม่สูงพอที่จะสามารถบำบัดน้ำเสียได้อย่างมีประสิทธิภาพ หรือบางกรณีอาจจะมีปริมาณจุลินทรีย์ไม่เพียงพอที่จะบำบัดน้ำเสียเหล่านั้น จึงต้องทำการเติมจุลินทรีย์ให้กับระบบ ซึ่งแอคติโนมัยซีทก็เป็นจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่สามารถบำบัดน้ำเสียได้ เนื่องจากเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่แอคติโนมัยซีทผลิตขึ้นนั้นมีความหลากหลายสูง และแอคติโนมัยซีทเป็นผู้ย่อยสลายจึงสามารถนำมาใช้ในการบำบัดของเสียอินทรีย์ได้

การศึกษาในครั้งนี้มุ่งเน้นการใช้เชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินบริเวณภาคตะวันออกและภาคใต้ของประเทศไทยที่เก็บรักษาไว้ที่สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล ศึกษาคุณลักษณะของแอคติโนมัยซีทที่แยกได้เบื้องต้นและตรวจหากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส โปรติเอส และ เอสเทอเรส วัดประสิทธิภาพของเอนไซม์ จากนั้นนำแอคติโนมัยซีทที่มีประสิทธิภาพที่ดีไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เอนไซม์ปริมาณมาก เช่น ทำการเลี้ยงในความเค็มและความเป็นกรดด่างที่แตกต่างกัน จากนั้นนำเชื้อที่ได้ทดสอบการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ และน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมในภาคตะวันออก อันจะเป็นทางเลือกหนึ่งในการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพ เพื่อลดค่าใช้จ่ายและลดการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม นอกจากนนี้ข้อมูลจากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ได้จากทะเลที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส โปรติเอส เอสเทอเรส และไลโซไซม์

2.เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทให้ได้เอนไซม์ปริมาณมากและเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสีย

3.เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมในภาคตะวันออก

ขอบเขตการวิจัย

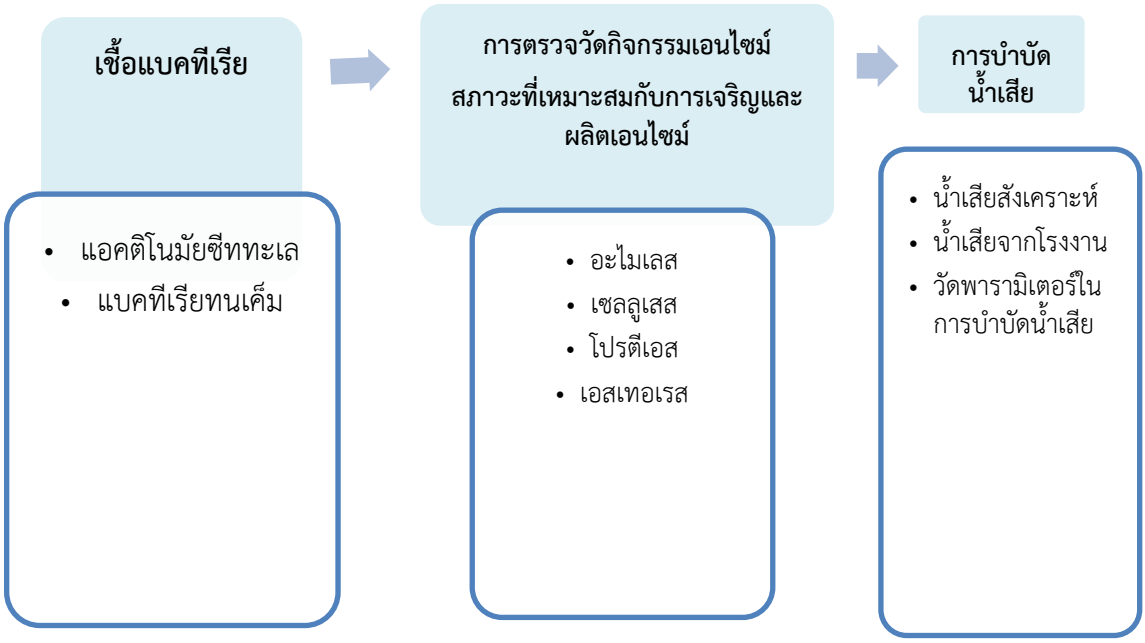
1. นำเชื้อแอคติโนมัยซีทบริสุทธิ์จำนวน 25 ไอโซเลต และเชื้อแบคทีเรียที่ทนความเค็มจำนวน 5 ไอโซเลต จากห้องปฏิบัติการสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มาเลี้ยงและตรวจหากิจกรรมอะไมเลส เซลลูเลส โปรติเอส และ เอสทอเรส

2. คัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพที่ดี 5 ไอโซเลต ไปศึกษาสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสม โดยทดลองเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารที่แตกต่างกันอย่างน้อย 4 สูตร ที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ค่าความเค็มที่ใช้ในการเลี้ยงแตกต่างกัน 3 ระดับ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3 ระดับ

3. ตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยา และจำแนกชนิดของแอคติโนมัยซีทที่ให้ผลการทดลองที่ดี 5 ไอโซเลต

4. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ให้กิจกรรมเอนไซม์ที่ดีไปทดสอบการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์เบื้องต้น

วิธีดำเนินการวิจัยและแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย



ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยจะได้นำไปพัฒนาเป็นต้นแบบสำหรับใช้ในวัตถุประสงค์ต่าง ๆ เช่น การบำบัดน้ำเสียจากครัวเรือน การบำบัดน้ำเสียของห้างสรรพสินค้า น้ำเสียจากโรงงานน้ำปลา น้ำเสียจากโรงงานแป้งมัน การบำบัดน้ำเสียในโรงบำบัดของเทศบาล เป็นต้น

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เตรียมหัวเชื้อแอคติโนมัยซีทสำหรับใช้ในการทดลองในอาหารเหลวสูตร ISP2

2. คัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ โดยใช้แอคติโนมัยซีทที่เจริญบนชิ้นวุ้น เจาะชิ้นวุ้นมา 1 ชิ้น ใส่ในอาหารเหลว ทดลองเลี้ยงในอาหารแตกต่างกัน 4 สูตร ได้แก่ ISP2, ISP3, OYG (ข้าวโอ๊ต Yeast extract และกลีเซอรอล) และ OYC (ข้าวโอ๊ต yeast extract และ CMC)

3. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

3.1 วิเคราะห์กิจกรรมอะไมเลส ทำได้โดยการวัดน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแป้ง โดยเอนไซม์โดยใช้ Dinitro Salicylic acid (Wood & Bhat, 1988)

3.2 วิเคราะห์เซลลูเลสโดยวิธี Agar well diffusion โดยใช้อาหาร Carboxymethyl cellulose Agar (CMC Agar) วัดกิจกรรมเอนไซม์โดยตรวจวัดขนาดของวงใสที่เกิดขึ้น (Dashtban M, et al., 2009)

3.3 วิเคราะห์กิจกรรมโปรติเอสโดยวิธี Agar well diffusion โดยใช้ Gelatin-agar plate และ Casein-agar plate (Smith & Goodner, 1958)

3.4 วิเคราะห์กิจกรรมเอสเทอเรส โดยใช้ p-nitrophenyl butyrate เป็นสับเตรต ตามวิธี (Oeser et al., 2010)

4. วัดปริมาณโปรตีนตามวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976)

5.1 นำค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้มาคำนวณเป็นค่า Specific activity เพื่อนำมาคัดเลือกอาหารที่ดีที่สุดโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

5.2 การวัดการเจริญเติบโตของแอคติโนมัยซีท นำเชื้อที่ดีที่สุด 5 ไอโซเลต ที่ให้ผลกิจกรรมเอนไซม์ที่ดี ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเติบโตและกิจกรรมของเอนไซม์โดยเลี้ยงในอาหารเหลว ที่มีค่า pH แตกต่างกัน 3 ระดับ 5, 7 และ 10 ตามลำดับ ค่าความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ 0, 17 และ 35 ppt ตามลำดับ ชั่งน้ำหนักเซลล์และวัดกิจกรรมเอนไซม์ โดยวางแผนการทดลองแบบ factorial design ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

5. การศึกษาอัตราการบำบัดน้ำเสีย โดยการวัดค่า COD (มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์, 2540) โดยนำเชื้อที่ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ จาก 5 ไอโซเลต นำผลการวัดกิจกรรมเอนไซม์ ระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญมาวิเคราะห์เพื่อคัดเลือกเชื้อ เพื่อนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสีย โดยจะแบ่งการทดลองเป็น 4 การทดลอง ตัวอย่างเช่น 1) กลุ่ม Control 2) Treatment1 ใช้เชื้ออันดับ 1 ในการบำบัด 3) treatment2 ใช้เชื้ออันดับ 2 ในการบำบัด และ 4) Treatment3 ใช้เชื้ออันดับ 1 และ 2 ผสมกันในการบำบัด วัดค่า COD, pH ในตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 20 วัน ตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานแป้งมันวัดน้ำตาลรีดิวซ์ ที่เกิดขึ้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลพื้นฐานของเชื้อแอคติโนมัยซีท ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส โปรติเอส และ เอสเทอเรส

2.สามารถนำตัวอย่างแอคติโนมัยซีทที่ผลิตเอนไซม์และมีประสิทธิภาพที่ดีไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม

3. เพื่อถ่ายทอดความรู้แก่ผู้สนใจและเป็นประโยชน์ในการทำปัญหาพิเศษ และวิทยานิพนธ์แก่นิสิตนักศึกษาที่สนใจ

4. การตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการ

5. การเผยแพร่ข้อมูลในการประชุมสัมมนาทางวิชาการ

6. การผลิตบัณฑิตและนักวิจัยรุ่นใหม่ โดยการเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ที่ปรึกษาร่วม

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 สถานที่ทำการทดลอง

สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

2.2 ระยะเวลาทำการทดลอง

กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2561 – สิงหาคม พ.ศ. 2561

2.3 วัสดุและอุปกรณ์

1. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
2. ที่เจาะ (Cork borer)
3. ตะเกียงบุนเสน (Bunsen burner)
4. ออโต้ปิเปต และทิป (Autopipette and Tip) บริษัท GILSON (France)
5. เครื่องอ่านไมโครเพลท (Microplate reader) บริษัท Prima Scientific (Thailand)
6. ไมโครเวลเพลท (Microwellplate)
7. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
8. เครื่องวัดกรด – ด่าง (pH meter)
9. เครื่องวัดความเค็ม (Refractometer)
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (Centrifuge)
11. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
12. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Mechanical balance) บริษัท OHAUS (USA)
13. เตาไฟฟ้า (Hotplate)
14. โถดูดความชื้น (Desiccator)
15. หลอดย่อยสลาย ขนาด 20 x 100 มิลลิเมตร
16. เตาอบ (Oven)

2.4 สารเคมี

2.4.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. น้ำทะเลธรรมชาติ (Natural seawater)
2. Malt extract บริษัท Becton, Dickinson and Company (USA)
3. Yeast extract บริษัท Becton, Dickinson and Company (USA)
4. Dextrose บริษัท Becton, Dickinson and Company (USA)
5. Agar บริษัท Becton, Dickinson and Company (USA)
6. Carboxymethly cellulose บริษัท Sigma Chemical Company. (USA)
7. Soluble starch บริษัท CARLO ERBA Reagents S.A.S. (France)
8. Cassava starch บริษัท สิทธินันท์ จำกัด (Thailand)

9. Oatmeal บริษัท Quaker Products (M) sdn. Bhd. (Malaysia)

10. Glycerol ($C_3H_8O_3$) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd. (Australia)

11. L-Asparagine ($C_4H_8N_2O_3$) บริษัท Sigma Chemical Company. (USA)

12. Potassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd. (Australia)

13. Dextrose บริษัท Becton,Dickinson and Company (USA)

2.4.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

1. Sodium sulfite (Na_2SO_3) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd. (Australia)

2. Phenol (C6H5OH) บริษัท Merck Sharp & Dohme Corp. (Germany)

3. 3,5-Dinitrosalicylic acid ($C_7H_4N_2O_7$) บริษัท Fluka Chemical Corp. (Swizerland)

4. Sodium hydroxide (NaOH) บริษัท EMSURE (Germany)

5. Potassium sodium tartrate ($KNaC_4H_4O_6 \bullet 4H_2O$) บริษัท CARLO ERBA Reagents S.A.S. (France)

2.4.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

1. Albumin, bovine serum, Fraction V, Approx. 99% บริษัท Sigma Chemical Company. (USA)

2. Protein Assay Dye Reagent บริษัท Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)

2.4.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ COD

1. Potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd. (Australia)

2. Sulfuric acid (conc. H_2SO_4) บริษัท QREC CHEMICAL CO LTD. (New Zealand)

3. Mercury (II) sulfate ($HgSO_4$) บริษัท CARLO ERBA Reagents S.A.S. (France)

4. Silver sulfate (Ag_2SO_4) บริษัท Avantor Performance Materials Poland S.A. (Poland)

5. 1,10-phenanthroline monohydrate ($C_{12}H_8N_2H_2O$) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd. (Australia)

6. Iron(II) Sulfate Heptahydrate ($FeSO_4.7H_2O$) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd. (Australia)

7. Ferrous Ammonium Sulfate ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$) บริษัท Ajax Finechem Pty Ltd. (Australia)

2.4.5 สารเคมีสำหรับน้ำเสียสังเคราะห์แป้งมันสำปะหลัง

1. แป้งมันสำปะหลัง

2. KH_2PO_4

3. $MnCl_2.4H_2O$

4. $CaCl_2.2H_2O$

5. $MgSO_4.7H_2O$

6. $FeCl_3$
7. NaCl

2.5 การเตรียมหัวเชื้อแอคติโนมัยซีท

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ได้จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา จำนวน 30 ไอโซเลต มาทำการเก็บในอาหารแข็งเอียง (ISP2) ที่ความเค็ม 17 ppt ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.2 ± 0.5ไว้เป็นหัวเชื้อสำหรับการทดลอง

2.6 วิธีการทดลอง

2.6.1 การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติในการย่อยสับสเตรตได้ดี

1. การเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ได้เตรียมไว้ทั้งหมด 30 ไอโซเลต ทำการเลี้ยงในอาหารเหลว ISP2ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยเจาะชิ้นวุ้นเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตรใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเค็ม 17 ppt ค่าความเป็นกรด – ด่าง 6.2 ± 0.5 ในตู้บ่มเชื้อที่มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่าอยู่ที่ 110 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน เมื่อครบกำหนดแยกส่วนของน้ำเลี้ยงออกจากเซลล์ โดยนำตัวอย่างกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์1 เก็บส่วนน้ำเลี้ยงเป็นตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ทันที

2. การศึกษาอาหารที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

นำเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ที่ได้ขีด (Streak) บนอาหารแข็ง ISP2 มาเจาะชิ้นวุ้นเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เลี้ยงในอาหารเหลวแตกต่างกัน 4 ชนิด ได้แก่ ISP2, ISP2+Starch, ISP2+CMC และ OYC ที่มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ความเค็ม 17 ppt ค่าความเป็นกรด - ด่าง 6.2 ± 0.5 ในตู้บ่มเชื้อที่มีอัตราการเขย่าอยู่ที่ 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน เมื่อครบกำหนดแยกส่วนของน้ำเลี้ยงออกจากเซลล์ โดยนำตัวอย่างกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์1 เก็บส่วนน้ำเลี้ยงเป็นตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ทันที

3. การศึกษากิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 รายวัน

นำเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ที่ได้ขีด (streak) บนอาหารแข็ง ISP2 มาเจาะชิ้นวุ้นเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เลี้ยงในอาหาร ISP2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ความเค็ม 17 ppt ค่าความเป็นกรด - ด่าง 6.2 ± 0.5 ในตู้บ่มเชื้อที่มีอัตราการเขย่าอยู่ที่ 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 10 วัน แยกส่วนของน้ำเลี้ยงออกจากเซลล์ โดยนำตัวอย่างกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์1 เก็บส่วนน้ำเลี้ยงเป็นตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ทันที

4. ผลของค่าความเป็นกรด – ด่าง และความเค็มต่อกิจกรรมของเอนไซม์จากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

นำเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 เลี้ยงในอาหาร ISP2 ที่มีค่า ความเป็นกรด – ด่าง แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 4.0, 6.2 และ 10 ตามลำดับ ค่าความเค็มที่แตกต่างกัน 3 ระดับ 0, 17 และ 35 ppt ตามลำดับ โดยเจาะชิ้นวุ้นเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100

มิลลิลิตร ที่มีค่าความเป็นกรด – ด่าง และความเค็มต่างกัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อที่มีอัตราการเขย่าอยู่ที่ 110 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 วัน โดยนำตัวอย่างกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์1 เก็บส่วนน้ำเลี้ยงเป็นตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ทันที โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial design)

5. การตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ น้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณโปรตีน

5.1 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (Amylase activity)

สารสับสเตรทสำหรับทดสอบกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสใช้ Soluble starch (Carlo Erba, Italy) เข้มข้นร้อยละ 1 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ทำได้โดยปิเปตสารละลายสับสเตรท 800 ไมโครลิตรใส่ในหลอดก้นแหลมขนาด 1.5 มล. จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 25± 0.5 องศาเซลเซีย 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำสารตัวอย่างดังกล่าววัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) โดยปิเปตสารที่หยุดกิจกรรมของเอนไซม์ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DNS ปริมาตร 60 ไมโครลิตร บ่มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Wood and Bhat, 1988) ทันที และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976) นำค่าที่ได้คำนวณเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่อปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม)

กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส 1 ยูนิต/มิลลิลิตร หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 ไมโครโมลของ reducing sugar จากการย่อยสับเสตรท ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

5.2 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase activity)

สารสับสเตรทสำหรับทดสอบกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสใช้ Carboxymethyl cellulose (CMC, Sigma-Aldrich: USA) เข้มข้นร้อยละ 0.1 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ทำได้โดยปิเปตสารละลายสับสเตรท 800 ไมโครลิตรใส่ในหลอดก้นแหลมขนาด 1.5 มล. จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 25± 0.5 องศาเซลเซีย 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำสารตัวอย่างดังกล่าววัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) โดยปิเปตสารที่หยุดกิจกรรมของเอนไซม์ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย DNS ปริมาตร 60 ไมโครลิตร บ่มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (Wood and Bhat, 1988) ทันที และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976) นำค่าที่ได้คำนวณเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่อปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม)

กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส 1 ยูนิต/มิลลิลิตร หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 ไมโครโมลของ reducing sugar จากการย่อยสับเสตรท ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

5.3 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (Protease activity)

สารสับสเตรทสำหรับทดสอบกิจกรรมเอนไซม์โปรตีนเอสใช้นมขาดมันเนย (Skim milk, Difco: USA) ความเข้มข้นร้อยละ 5 วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โดยปิเปตสารตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ผสมกับสับสเตรท 150 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 30 นาที เมื่อครบกำหนดวัดค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร และบันทึกลักษณะการตกตะกอนของสับสเตรท โดยที่ค่าการดูดกลืนแสง

ของนมขาดมันเนยเริ่มต้นเป็น 1.9546 คิดเป็นร้อยละ 100 การลดลงของค่าการดูดกลืนแสงแสดงถึงกิจกรรมของเอนไซม์ดัดแปลงจากวิธีของ Anson (Anson, 1938)

กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 1 ยูนิต/มิลลิลิตร หมายถึง ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบในการย่อยสลายสับเสตรตเทียบกับชุดควบคุม ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

5.4 กิจกรรมของไลโซไซม์ (Lysozyme activity)

- การเตรียมสารละลายเชื้อสำหรับทดสอบกิจกรรมของไลโซไซม์ทำได้โดยนำเชื้อ *Micrococcus lysodeilticus* ละลายใน Phosphate Buffer Saline (PBS) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.24 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วง 0.6-0.7

- การทดสอบกิจกรรมของไลโซไซม์ทำได้โดยปิเปตสารละลายตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายเชื้อ *M. lysodeilticus* 150 ไมโครลิตร ในไมโครเวลเพลท บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 30 นาที เมื่อครบกำหนดวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร โดยที่ค่าการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงแสดงถึงกิจกรรมของไลโซไซม์ดัดแปลงจากวิธีของ Shugar (Shugar, 1952) และนำค่าที่ได้คำนวณเป็นการผลิตเอนไซม์ในหน่วยยูนิต (Unit/ml)

กิจกรรมของไลโซไซม์ 1 ยูนิต/มิลลิลิตร หมายถึง ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบในการย่อยสลาย *M. lysodeilticus* เทียบกับชุดควบคุม ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

5.5 กิจกรรมของเอสเทอเรส (Esterase activity)

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอเรสของเชื้อแอคติโนมัยซีท (Oeser et al., 2010) นำน้ำเลี้ยงที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับซับสเตรท 1 mM 4-Nitrophenyl butyrate ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ 0.01 M PBS buffer ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 ปริมาตร 130 ไมโครลิตร ในแผ่นไมโครเพลท ตั้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 410 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader ทำ 3 ซ้ำ จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณหา กิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอร์เรส โดยกำหนดให้หนึ่งหน่วยเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาย่อยซับเสตรท 4-Nitrophenyl butyrate แล้วทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ p-nitrophenol 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาทีในสภาวะเดียวกัน

6. การเตรียมกราฟมาตรฐาน Reducing sugar และการวิเคราะห์หาปริมาณ Reducing sugar ใน supernatant ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (Wood and Bhat, 1988)

1. เตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 5 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร โดยชั่งกลูโคส 0.001 กรัม และ 0.005 กรัม ตามลำดับ ละลายในน้ำทะเลธรรมชาติความเค็ม 17 ppt 1 มิลลิลิตร

2. นำสารละลายกลูโคสที่เตรียมไว้ นำไปเตรียมเป็นสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ ตามตารางที่ 1

3. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทำได้โดยปิเปตสารละลายความเข้มข้นต่างๆ 60 ไมโครลิตร ผสมกับ Dinitrosalicylic acid 60 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

4. นำสารละลายที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลทที่ค่าความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ทันที

5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคสและค่าการดูดกลืนแสง ในเชิงสมการเส้นตรงเพื่อใช้หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายมาตรฐาน

6. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่างทำได้โดยปิเปต supernatant 60 ไมโครลิตร ผสมกับ Dinitrosalicylic acid 60 ไมโครลิตร จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ลบค่าของ blank (0.093) ไปคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ตารางที่ 1 การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ปริมาณกลูโคส (µg)	สารละลายกลูโคส 1 mg / ml (µl)	สารละลายกลูโคส 5 mg / ml (µl)	น้ำทะเล (µl)	ค่าการดูดกลืนแสง (540 nm)
10	10	-	50	0.0035
20	20	-	40	0.0064
30	30	-	30	0.0116
40	40	-	20	0.0442
50	50	-	10	0.1049
60	60	-	-	0.1639
80	-	16	44	0.2573
160	-	32	28	0.7089
240	-	48	12	1.1510
300	-	60	-	1.5247
ตัวอย่าง	60		-	

7. การเตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีนและการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนใน supernatant ด้วยวิธีการของแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976)

ก) การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

1. เตรียม 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA โดยชั่ง Bovine serum albumin (BSA) 0.0100 กรัม ละลายใน 0.01 M PBS ประมาณ 8 มิลลิลิตร ตั้งไว้ให้ BSA ละลายแล้วปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. เตรียม 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA ปิเปต 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA 100 ไมโครลิตร เติม 0.01 M PBS จนได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3. เตรียม 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA ปิเปต 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA 500 ไมโครลิตร เติม 0.01 M PBS จนได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

4. เตรียม 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA ปิเปต 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA 500 ไมโครลิตร เติม 0.01 M PBS จนได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

5. เตรียม 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA ปิเปต 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA 500 ไมโครลิตร เติม 0.01 M PBS จนได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

6. เตรียม 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA ปิเปต 0.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA 500 ไมโครลิตร เติม 0.01 M PBS จนได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

7. เตรียม 0.03125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA ปิเปต 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร BSA 500 ไมโครลิตร เติม 0.01 M PBS จนได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ข) การสร้างกราฟมาตรฐาน

ปิเปตโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมลงในไมโครเพลท เติม Dye reagent ที่เจือจางอัตราส่วน 1 : 4 (Dye reagent : น้ำ) ลงในไมโครเพลท ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่าเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลทที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ค) การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ปิเปต Supernatant ที่ผ่านการ Centrifuge ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมลงในไมโครเพลท เติม Dye reagent ที่เจือจางอัตราส่วน 1 : 4 (Dye reagent : น้ำ) ลงในไมโครเพลท ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่าเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลทที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

2.6.2 การศึกษาการบำบัดน้ำเสีย

2.6.2.1 การศึกษาอัตราการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์แป้งมันสำปะหลังโดยวัดอัตราการลดลงของ COD

นำเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 มาใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการบำบัดน้ำเสีย โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 กลุ่มการทดลอง คือ กลุ่มควบคุมเป็นกลุ่มที่ไม่ใส่หัวเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยมีปริมาตรน้ำเสีย 4,500 มิลลิลิตร และอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 500 มิลลิลิตร กลุ่มทดสอบ เป็นกลุ่มที่มีปริมาตรหัวเชื้อแอคติโนมัยซีท 500 มิลลิลิตร และปริมาตรน้ำเสีย 4,500 มิลลิลิตร การบำบัดน้ำเสียในกลุ่มทดสอบทำได้โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร ISP2 ที่ความเค็ม 17 ppt ค่าความเป็นกรด – ด่าง 6.2 ± 0.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 วัน เติมอากาศตลอดระยะเวลาการทดลอง เก็บตัวอย่างน้ำเพื่อวัดค่า COD, ค่าความเป็นกรด – ด่าง,น้ำตาลรีดิวซ์, น้ำหนักตะกอน, ความเค็ม, อุณหภูมิ และค่าออกซิเจนละลายน้ำทุกวัน เป็นเวลา 15 วัน โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD)

2.6.2.2 การศึกษาอัตราการบำบัดน้ำเสียโรงงานน้ำปลาโดยวัดอัตราการลดลงของ COD

นำเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 มาใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการบำบัดน้ำเสีย โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 การทดลองแบ่งเป็น 2 กลุ่มการทดลอง คือ กลุ่มควบคุมเป็นกลุ่มที่ไม่ใส่หัวเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยมีปริมาตรน้ำเสีย 4,500 มิลลิลิตร และอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และกลุ่มทดสอบเป็นกลุ่มที่มีปริมาตรหัวเชื้อแอคติโนมัยซีท 500 มิลลิลิตร และปริมาตรน้ำเสีย 4,500 มิลลิลิตร การบำบัดน้ำเสียในกลุ่มทดสอบทำได้โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร ISP2 ที่ความเค็ม 17 ppt ค่าความเป็นกรด – ด่าง 6.2 ± 0.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 วัน เติมอากาศตลอดระยะเวลาการทดลอง เก็บตัวอย่างน้ำเพื่อวัดค่า COD, ค่าความเป็นกรด – ด่าง, โปรตีนละลายน้ำ (Bradford, 1976), น้ำหนักตะกอน, ความเค็ม, อุณหภูมิ และค่าออกซิเจนละลายน้ำทุกวันเป็นเวลา 18 วัน โดยวางแผนการทดลองแบบ T-Test

2.6.2.3 การวิเคราะห์ chemical oxygen demand (COD) (มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์, 2540)

ก) การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายโปแทสเซียมไดโครเมตความเข้มข้น 0.1 N

อบโพแทสเซียมไดโครเมตร ($K_2Cr_2O_7$) ที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งอย่างละเอียด 4.913 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 167 มิลลิลิตร เติมเมอคิวริคซัลเฟต 33.3 กรัม คนให้ละลายตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

2. กรดซัลฟูริกรีเอเจนต์

ละลายซิลเวอร์ซัลเฟต (Ag_2SO_4) 10.11 กรัม ในกรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) 1 ลิตร คนช้าๆจนกว่าซิลเวอร์ซัลเฟตจะละลายหมด (ต้องใช้เวลาในการละลาย 1 – 2 วัน)

3. เฟอโรอินอินดิเคเตอร์

ละลาย 1,10-ฟีแนนโทรลีนโมโนไฮเดรต (1,10-phenanthroline monohydrate ($C_{12}H_8N_2.H_2O$)) 1.485 กรัม และไอร์ออน (II) ซัลเฟตเฮปตร้าไฮเดรต ($FeSO_4.7H_2O$) 0.695 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.1 M

ละลายเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต [$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$] (FAS) 39.2 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร คนให้ละลายแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร

ข) การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานเฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟต (FAS)

ปิเปตโพแทสเซียมไดโครเมต 10 มิลลิลิตร ใส่ลงขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร เติมซัลฟูริกรีเอเจนต์ 30 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็นเติมเฟอร์โรอินอินดิเคเตอร์ 2 – 3 หยด แล้วนำไปไทเทรตกับ FAS จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล หาความเข้มข้นมาตรฐานได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของ FAS (M)} = \frac{\text{ปริมาตรของโพแทสเซียมไดโครเมตร (\ \ ml.) x 0.1}}{\text{ปริมาตร FAS ที่ใช้ไทเทรต (ml.)}}$$

ค) วิธีการวิเคราะห์

1. ล้างหลอดย่อยสลายและฝาจุกด้วยกรดซัลฟูริกร้อยละ 50 ก่อนนำมาใช้

2. นำตัวอย่างน้ำใส่ในหลอดย่อยสลายแล้วเติมสารละลายที่ใช้ย่อย ซึ่งได้แก่ สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไดโครเมต ตามตารางที่ ข - 2

3. จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกรีเอเจนต์ให้ไหลลงก้นหลอดแก้ว ปิดจุกให้แน่น คว่ำหลอดไปมาจนผสมกันดี

4. นำหลอดย่อยสลายไปใส่ตู้อบ ซึ่งมีอุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียสไว้ก่อนแล้ว ใช้เวลา รีฟลักซ์ 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นถึงอุณหภูมิห้อง

5. เทใส่ขวดรูปชมพู่ เติมเฟอโรอินอินดิเคเตอร์ 0.05 – 1 มิลลิลิตร (1-2 หยด)

6. นำมาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน FAS 0.1 M จนถึงจุดยุติ (เปลี่ยนสีจากสีฟ้าอมเขียวเป็นสีน้ำตาลแดง) ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ

7. Blank ให้ดำเนินการเช่นเดียวกับการวิเคราะห์น้ำตัวอย่าง แต่ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างน้ำ

ง) การคำนวณหาค่า COD

$$COD\ (mg\ O_2 / L) = \frac{(A - B) \times 8,000}{\text{ปริมาตรตัวอย่างน้ำ (ml.)}}$$

กำหนดให้ A = ปริมาตรของ FAS ที่ใช้ในการไทเทรต Blank (ml.)

B = ปริมาตรของ FAS ที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่างน้ำ (ml.)

M = ความเข้มข้นของ FAS (M)

ตารางที่ 2 ปริมาณตัวอย่างและรีเอเจนต์ที่ใช้สำหรับขนาดต่างๆ ของภาชนะที่ใช้ในการย่อยสลายสำหรับการวิเคราะห์ COD โดยวิธีฟลักซ์แบบปิด

หลอดย่อยสลาย (ขนาดหลอดแก้ว)	ปริมาตรน้ำตัวอย่าง (ml.)	ปริมาตรสารละลาย $K_2Cr_2O_7$ (ml.)	กรดซัลฟูริกรีเอเจนต์ (ml.)	ปริมาตรทั้งหมด (ml.)
16 x 100 mm.	2.5	1.5	3.5	7.5
20 x 150 mm.	5.0	3.0	7.0	15.0
25 x 150 mm.	10.0	6.0	14.0	30.0

2.6.3 การจัดจำแนกเชื้อ

นำเชื้อที่มีกิจกรรมเอนไซม์ดีที่สุดศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลำดับเบสของ 16S rRNA

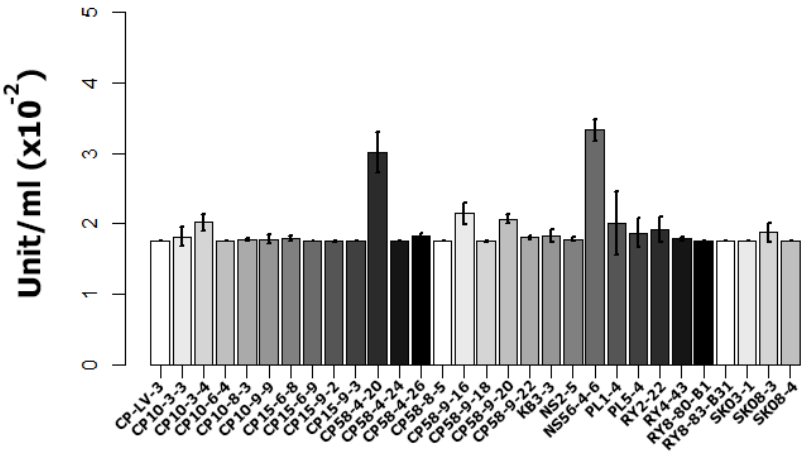
2.6.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลการทดลองของการศึกษาอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติในการย่อยสับสเตรตได้ดี, ผลของค่าความเป็นกรด – ด่าง และความเค็มต่อกิจกรรมของเอนไซม์จากเชื้อ NS56-4-6 และการศึกษาอัตราการบำบัดน้ำเสียโดยวัดอัตราการลดลงของ COD มาวิเคราะห์ข้อมูลสถิติโดย การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และทำการเปรียบพหุคูณโดยวิธี Duncan’s multiple rang test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยโปรแกรม R version 3.3.1 (Ihaka and Gentleman, 1996)

ผลการวิจัย

การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติในผลิตเอนไซม์

จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต ที่คัดแยกจากดินตะกอนป่าชายเลน จังหวัดชลบุรี ระยอง ชุมพร นครศรีธรรมราช กระบี่ และสุราษฎร์ธานี ในอาหารเหลว ISP2 ความเค็ม 17 ppt. ค่าความเป็นกรด – ด่าง 6.2 ± 0.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน พบว่าเชื้อพบว่าแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลตสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส โปรติเอส และไลโซไซม์ได้ โดยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6, CP58-4-20 และ CP58-9-16 แสดงค่าการทำงานเอนไซม์อะไมเลสดีที่สุด เชื้อแอคติโนมัยซีท CP58-9-20, NS56-4-6 และ PL1-4 แสดงค่าการทำงานเอนไซม์เซลลูเลสดีที่สุด และเชื้อแอคติโนมัยซีท CP15-9-2, CP58-9-18 และ CP15-6-9 แสดงค่าการทำงานเอนไซม์โปรติเอสดีที่สุด แอคติโนมัยซีท NS56-4-6 มีกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส ดีที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 3 และ 4 ดังนั้นจึงได้เลือกเชื้อ NS56-4-6 นำไปใช้ทดลองการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ และน้ำเสียจากโรงงานน้ำปลา อีกทั้งยังพบว่าแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลตสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส โปรติเอส และไลโซไซม์ได้ ดังแสดงในตารางที่ 5-7 และภาพที่ 2-6

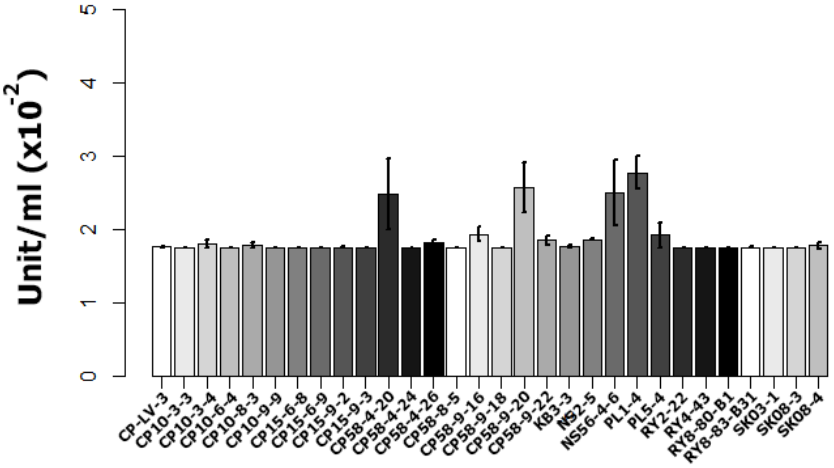


ภาพที่ 2 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต

ตารางที่ 3 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต

กิจกรรมอะไมเลส			
แอคติโนมัยซีท	**Unit/ml(x10^{-2})**	**แอคติโนมัยซีท**	**Unit/ml(x10^{-2})**
CP-LV-3	1.75±0.00^{g}	CP58-9-18	1.75±0.01^{g}
CP10-3-3	1.82±0.13^{g}	CP58-9-20	2.07±0.06^{cd}
CP10-3-4	2.02±0.12^{cde}	CP58-9-22	1.80±0.02^{g}
CP10-6-4	1.75±0.00^{g}	KB3-3	1.83±0.09^{efg}
CP10-8-3	1.77±0.02^{g}	NS2-5	1.78±0.03^{g}
CP10-9-9	1.78±0.06^{g}	NS56-4-6	3.33±0.15^{a}
CP15-6-8	1.78±0.04^{g}	PL1-4	2.01±0.45^{cdef}
CP15-6-9	1.75±0.00^{g}	PL5-4	1.87±0.21^{defg}
CP15-9-2	1.75±0.01^{g}	RY2-22	1.92±0.18^{cdefg}
CP15-9-3	1.75±0.00^{g}	RY4-43	1.79±0.02^{g}
CP58-4-20	3.00±0.29^{b}	RY8-80-B1	1.75±0.00^{g}
CP58-4-24	1.75±0.00^{g}	RY8-83-B31	1.76±0.01^{g}
CP58-4-26	1.83±0.03^{efg}	SK03-1	1.74±0.00^{g}
CP58-8-5	1.75±0.00^{g}	SK08-3	1.88±0.14^{defg}
CP58-9-16	2.14±0.16^{c}	SK08-4	1.75±0.00^{g}

กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส 1 ยูนิต/ มิลลิลิตร หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 ไมโครโมลของ reducing sugar จากการย่อยสับสเตรทในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

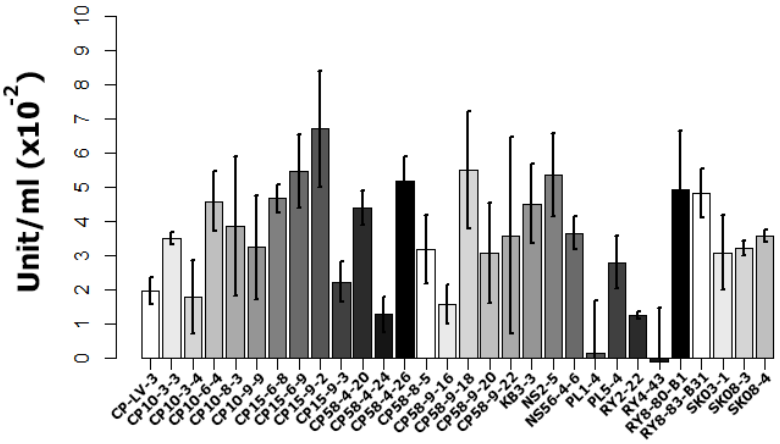


ภาพที่ 3 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต

ตารางที่ 4 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต

กิจกรรมเซลลูเลส			
แอคติโนมัยซีท	**Unit/ml(x10^{-2})**	**แอคติโนมัยซีท**	**Unit/ml(x10^{-2})**
CP-LV-3	1.76±0.01^{c}	CP58-9-18	1.75±0.00^{c}
CP10-3-3	1.75±0.00^{c}	CP58-9-20	2.56±0.34^{ab}
CP10-3-4	1.80±0.06^{c}	CP58-9-22	1.85±0.06^{c}
CP10-6-4	1.75±0.00^{c}	KB3-3	1.77±0.02^{c}
CP10-8-3	1.78±0.03^{c}	NS2-5	1.86±0.01^{c}
CP10-9-9	1.75±0.00^{c}	NS56-4-6	2.50±0.45^{b}
CP15-6-8	1.75±0.00^{c}	PL1-4	2.77±0.23^{a}
CP15-6-9	1.75±0.00^{c}	PL5-4	1.92±0.16^{c}
CP15-9-2	1.75±0.01^{c}	RY2-22	1.75±0.00^{c}
CP15-9-3	1.75±0.00^{c}	RY4-43	1.75±0.00^{c}
CP58-4-20	2.48±0.48^{b}	RY8-80-B1	1.75±0.00^{c}
CP58-4-24	1.75±0.00^{c}	RY8-83-B31	1.75±0.01^{c}
CP58-4-26	1.82±0.02^{c}	SK03-1	1.75±0.00^{c}
CP58-8-5	1.75±0.00^{c}	SK08-3	1.75±0.00^{c}
CP58-9-16	1.93±0.09^{c}	SK08-4	1.78±0.04^{c}

กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส 1 ยูนิต/มิลลิลิตร หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้เกิด 1 ไมโครโมลของ reducing sugar จากการย่อย**สั**บสเตรทในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด



ภาพที่ 4 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต

ตารางที่ 5 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต

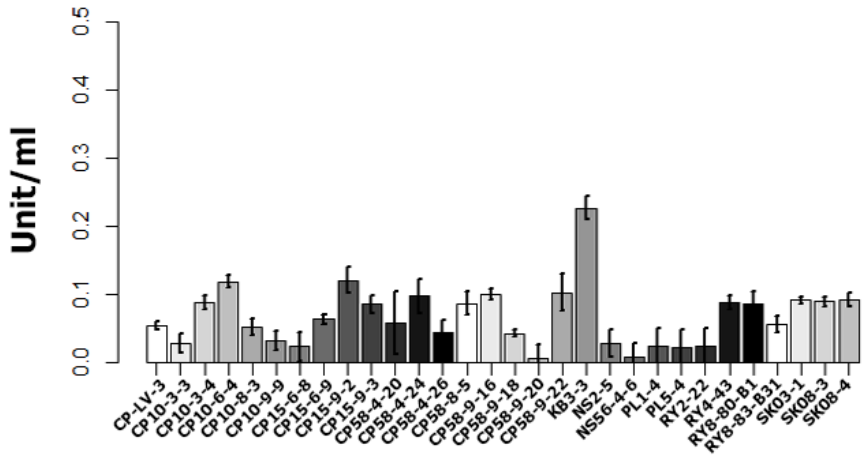
กิจกรรมโปรติเอส			
แอคติโนมัยซีท	**Unit/ml(x10^{-2})**	**แอคติโนมัยซีท**	**Unit/ml(x10^{-2})**
CP-LV-3	1.96 ± 0.39^{ghij}	CP58-9-18	5.49 ± 1.71^{ab}
CP10-3-3	3.49 ± 0.17^{bcdefghi}	CP58-9-20	3.05 ± 1.47^{efghi}
CP10-3-4	1.79 ± 1.07^{ghij}	CP58-9-22	3.58 ± 2.89^{bcdefgh}
CP10-6-4	4.58 ± 0.57^{abcde}	KB3-3	4.51 ± 1.17^{abcdef}
CP10-8-3	3.85 ± 2.05^{bcdefg}	NS2-5	5.36 ± 1.23^{abcd}
CP10-9-9	3.23 ± 1.52^{bdefghi}	NS56-4-6	3.65 ± 0.49^{bcdefgh}
CP15-6-8	4.67 ± 0.41^{abcde}	PL1-4	0.12 ± 1.55^{j}
CP15-6-9	5.47 ± 1.08^{abc}	PL5-4	2.79 ± 0.77^{efghi}
CP15-9-2	6.71 ± 1.70^{a}	RY2-22	1.23 ± 0.11^{ij}
CP15-9-3	2.22 ± 0.60^{fghij}	RY4-43	-0.11 ± 1.58^{j}
CP58-4-20	4.39 ± 0.48^{bcdef}	RY8-80-B1	4.93 ± 1.70^{abcde}
CP58-4-24	1.27 ± 0.52^{hij}	RY8-83-B31	4.81 ± 0.71^{abcde}
CP58-4-26	5.15 ± 0.73^{abcde}	SK03-1	3.07 ± 1.09^{defghi}
CP58-8-5	3.15 ± 1.00^{cdefghi}	SK08-3	3.20 ± 0.21^{bdefghi}
CP58-9-16	1.56 ± 0.58^{ghij}	SK08-4	3.56 ± 0.19^{bcdefgh}

กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 1 ยูนิต/มิลลิลิตร หมายถึง ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบในการย่อยสลายสับสเตรทเทียบกับชุดควบคุม ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

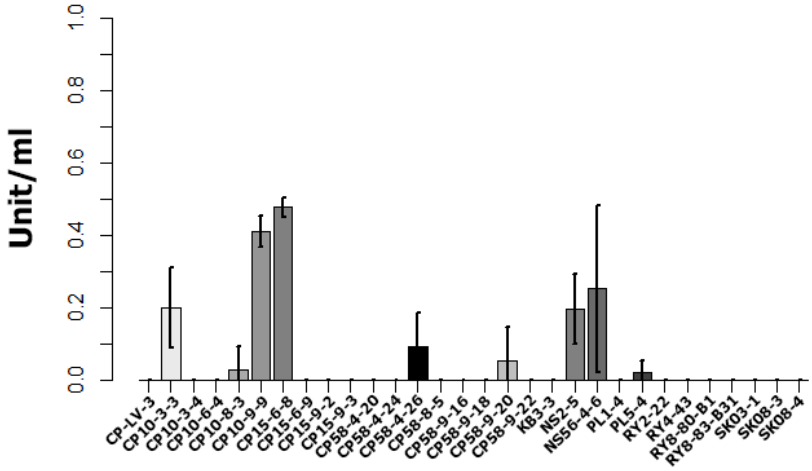
ตารางที่ 6 กิจกรรมเอนไซม์เอสเทอเรสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต

กิจกรรมเอสเทอเรส			
แอคติโนมัยซีท	**Unit/ml**	**แอคติโนมัยซีท**	**Unit/ml**
CP-LV-3	0.05 ± 0.00^{ghijk}	CP58-9-18	0.04 ± 0.1^{ijk}
CP10-3-3	0.03 ± 0.01^{jkl}	CP58-9-20	0.00 ± 0.02^{l}
CP10-3-4	0.09 ± 0.01^{bdef}	CP58-9-22	0.10 ± 0.03^{bcd}
CP10-6-4	0.12 ± 0.01^{bc}	KB3-3	0.02 ± 0.02^{a}
CP10-8-3	0.05 ± 0.01^{hijk}	NS2-5	0.03 ± 0.02^{jkl}
CP10-9-9	0.03 ± 0.01^{jkl}	NS56-4-6	0.01 ± 0.02^{l}
CP15-6-8	0.02 ± 0.02^{kl}	PL1-4	0.02 ± 0.02^{kl}
CP15-6-9	0.06 ± 0.01^{efghi}	PL5-4	0.02 ± 0.02^{kl}
CP15-9-2	0.12 ± 0.02^{b}	RY2-22	0.02 ± 0.02^{kl}
CP15-9-3	0.08 ± 0.01^{defgh}	RY4-43	0.09 ± 0.01^{bdefg}
CP58-4-20	0.06 ± 0.04^{efghij}	RY8-80-B1	0.09 ± 0.02^{defgh}
CP58-4-24	0.10 ± 0.02^{bcd}	RY8-83-B31	0.05 ± 0.01^{fhijk}
.CP58-4-26	0.04 ± 0.02^{ijk}	SK03-1	0.09 ± 0.01^{bcde}
CP58-8-5	0.08 ± 0.02^{cdefgh}	SK08-3	0.09 ± 0.01^{bcde}
CP58-9-16	0.10 ± 0.1^{bcd}	SK08-4	0.09 ± 0.01^{bcde}

กิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอร์เรส โดยกำหนดให้หนึ่งหน่วยเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาย่อยซับสับสเตรท 4-Nitrophenyl butyrate แล้วทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ p-nitrophenol 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาทีในสภาวะเดียวกัน



ภาพที่ 5 กิจกรรมเอนไซม์เอสเทอเรสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต



ภาพที่ 6 กิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์จากเชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต

ตารางที่ 7 กิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์จากเชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต

กิจกรรมไลโซไซม์			
แอคติโนมัยซีท	**Unit/ml**	**แอคติโนมัยซีท**	**Unit/ml**
CP-LV-3	0.00±0.00^{e}	CP58-9-18	0.00±0.00^{e}
CP10-3-3	0.20±0.11^{bc}	CP58-9-20	0.05±0.09^{de}
CP10-3-4	0.00±0.00^{e}	CP58-9-22	0.00±0.00^{e}
CP10-6-4	0.00±0.00^{e}	KB3-3	0.00±0.00^{e}
CP10-8-3	0.03±0.06^{de}	NS2-5	0.19±0.09^{bc}
CP10-9-9	0.41±0.04^{a}	NS56-4-6	0.25±0.23^{b}
CP15-6-8	0.48±0.03^{a}	PL1-4	0.00±0.00^{e}
CP15-6-9	0.00±0.00^{e}	PL5-4	0.02±0.03^{de}
CP15-9-2	0.00±0.00^{e}	RY2-22	0.00±0.00^{e}
CP15-9-3	0.00±0.00^{e}	RY4-43	0.00±0.00^{e}
CP58-4-20	0.00±0.00^{e}	RY8-80-B1	0.00±0.00^{e}
CP58-4-24	0.00±0.00^{e}	RY8-83-B31	0.00±0.00^{e}
CP58-4-26	0.09±0.09^{cd}	SK03-1	0.00±0.00^{e}
CP58-8-5	0.00±0.00^{e}	SK08-3	0.00±0.00^{e}
CP58-9-16	0.00±0.00^{e}	SK08-4	0.00±0.00^{e}

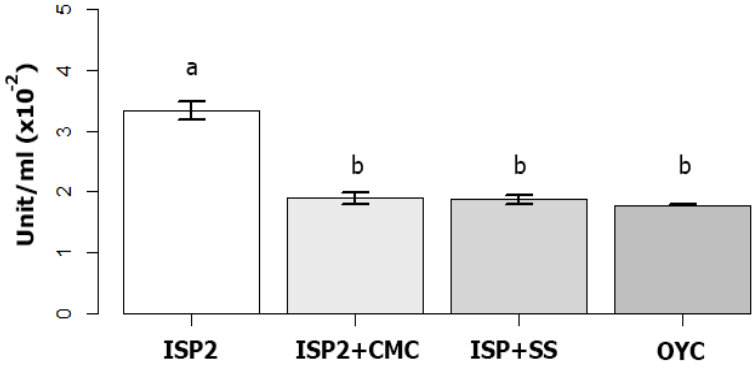
กิจกรรมของไลโซไซม์ 1 ยูนิต/มิลลิลิตร หมายถึง ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบในการย่อยสลาย *M. lysodeilticus* เทียบกับชุดควบคุม ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

การศึกษาอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

จากการศึกษาในครั้งนี้ได้คัดเลือกแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ไปศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เนื่องจาก แอคติโนมัยซีท NS56-4-6 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส ดีที่สุด และแสดงค่ากิจกรรมโปรติเอสได้ โดยมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 3.65±0.49 Unit/ml($x10^{-2}$) จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันจำนวน 5 สูตรได้แก่ ISP2, ISP2+CMC, ISP2+SS และ OYC ความเค็ม 17 ppt ค่าความเป็นกรด – ด่าง 6.2 ± 0.5 เป็นเวลา 4 วัน เมื่อวัดกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส โปรติเอส เอสเทอเรส และไลโซไซม์ พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 มีกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส และไลโซไซม์มากที่สุดเมื่อใช้อาหารสูตร ISP2 (ภาพที่ 7-9) และกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส และเอสเทอเรส มากสุดในอาหารสูตร OYC (ภาพที่10 -11) โดยผลการทดลอง และผลการทดสอบสถิติด้วย Duncan's multiple range test แสดงในตารางที่ 8-12 ตามลำดับ

ตารางที่ 8 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ISP2, ISP2+CMC, ISP2+SS และ OYC

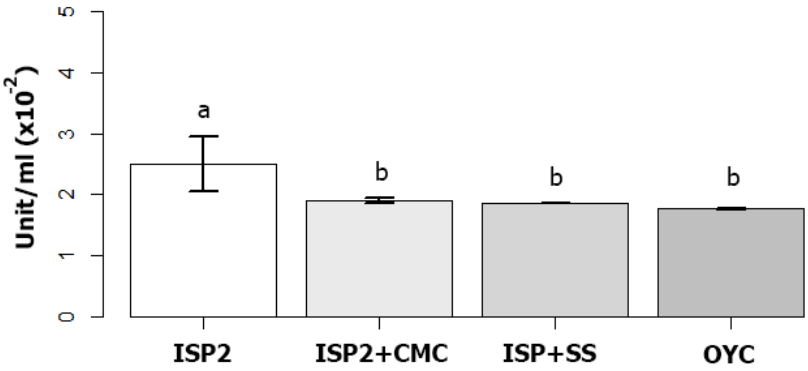
กิจกรรมอะไมเลส	
อาหารเลี้ยงเชื้อ	**Unit/ml ($x10^{-2}$)**
ISP2	3.33 ± 0.15^{a}
ISP2+CMC	1.89 ± 0.10^{b}
ISP2+SS	1.87 ± 0.08^{b}
OYC	1.78 ± 0.02^{b}



ภาพที่ 7 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน 4 ชนิด

ตารางที่ 9 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ISP2, ISP2+CMC, ISP2+SS และ OYC

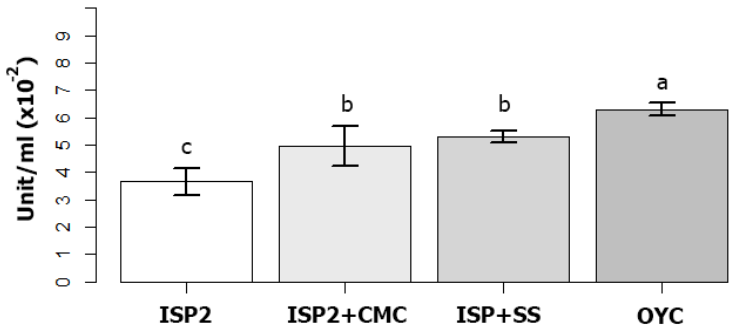
กิจกรรมเซลลูเลส	
อาหารเลี้ยงเชื้อ	**Unit/ml ($x10^{-2}$)**
ISP2	2.50 ± 0.45^{a}
ISP2+CMC	1.89 ± 0.04^{b}
ISP2+SS	1.85 ± 0.01^{b}
OYC	1.76 ± 0.01^{b}



ภาพที่ 8 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน 4 ชนิด

ตารางที่ 10 กิจกรรมเอนไซม์โปติเอสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ISP2, ISP2+CMC, ISP2+SS และ OYC

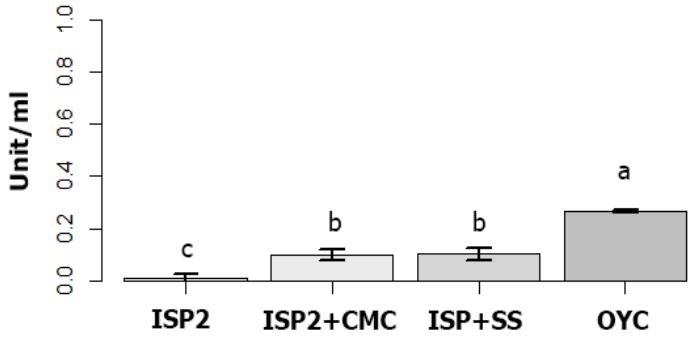
กิจกรรมโปรติเอส	
อาหารเลี้ยงเชื้อ	**Unit/ml**
ISP2	0.04 ± 0.00^{c}
ISP2+CMC	0.05 ± 0.01^{b}
ISP2+SS	0.05 ± 0.00^{b}
OYC	0.06 ± 0.00^{a}



ภาพที่ 9 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน 4 ชนิด

ตารางที่ 11 กิจกรรมเอนไซม์เอสเทอเรสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ISP2, ISP2+CMC, ISP2+SS และ OYC

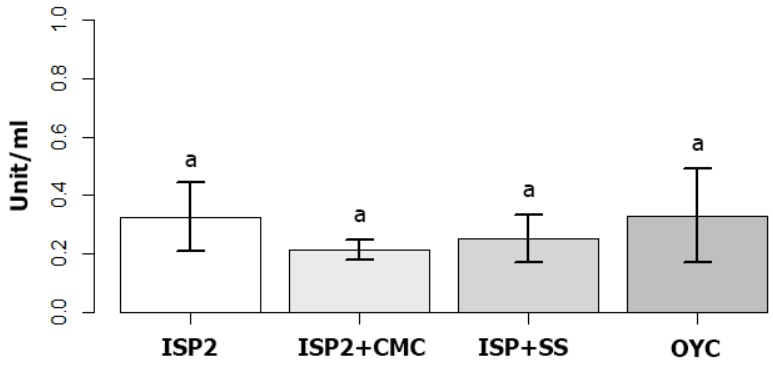
Esterase activity	
อาหารเลี้ยงเชื้อ	**Unit/ml**
ISP2	0.01 ± 0.02^{c}
ISP2+CMC	0.10 ± 0.02^{b}
ISP2+SS	0.10 ± 0.02^{b}
OYC	0.26 ± 0.01^{a}



ภาพที่ 10 กิจกรรมเอนไซม์เอสเทอเรสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน 4 ชนิด

ตารางที่ 12 กิจกรรมเอนไซม์เอสเทอเรสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ISP2, ISP2+CMC, ISP2+SS และ OYC

Lysozyme activity	
อาหารเลี้ยงเชื้อ	**Unit/ml**
ISP2	0.32±0.12[a]
ISP2+CMC	0.21±0.04[a]
ISP2+SS	0.25±0.08[a]
OYC	0.33±0.16[a]



ภาพที่ 11 กิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์จากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน 4 ชนิด

จากการศึกษาอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 มีกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส และไลโซไซม์มากที่สุดเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารสูตร ISP2 และกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส และเอสเทอเรส มากสุดในอาหารสูตร OYC ดังนั้นจึงนำเชื้อแอคติโนมัยซีทที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร ISP2 มาหาสภาวะเรื่องความเป็นกรดด่าง และค่าความเค็มต่อประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ และการนำไปน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นองค์ประกอบต่อไป

ผลของความเป็นกรด – ด่าง และความเค็มต่อกิจกรรมของเอนไซม์

จากการเลี้ยงเชื้อเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารสูตร ISP2 ความเค็ม 3 ระดับ 0, 17, 35ppt. ค่าความเป็นกรด–ด่าง 3 ระดับ 4.0, 6.2 และ 10.0 พบผลความเป็นกรด – ด่าง และความเค็มที่มีผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ ดังนี้

กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลส พบว่าความเค็มและค่าความเป็นกรด-ด่างไม่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส (ตารางที่ 13) แต่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสดีที่สุด ในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 10.0±0.5 และความเค็มของอาหาร 35 พีพีที โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์คือ $(1.85\pm0.31)\times10^{-2}$ ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่าง

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในความเค็มและค่าความเป็นกรด-ด่างอื่นๆ ที่นำมาศึกษา (p<0.05) (ตารางที่ 14)

กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส พบว่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสดีที่สุด ในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.0±0.5 และ 6.2±0.5 แต่ความเค็มของอาหารไม่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ดังแสดงในตาราง 15 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในความเค็มและค่าความเป็นกรด-ด่างอื่นๆที่นำมาศึกษา (p<0.05)

กิจกรรมเอนไซม์เอสเทอเรส พบว่าความเค็ม และค่าความเป็นกรด-ด่าง ไม่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ (ตารางที่ 16) พบค่ากิจกรรมเอมไซม์ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในความเค็มและค่าความเป็นกรด-ด่างอื่นๆที่นำมาศึกษา (p<0.05)

กิจกรรมของไลโซไซม์ พบว่าความเค็ม ค่าความเป็นกรด-ด่าง มีผลในการผลิตไลโซไซม์ (ตารางที่ 17) โดยเชื้อไม่สามารถผลิตไลโซไซม์ เมื่อความเค็ม ค่าความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 13 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส จากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างและความเค็ม ที่แตกต่างกัน

ความเค็ม (พีพีที)	กิจกรรมของอะไมเลส ยูนิต/มิลลิลิตร (x10^{-2})			
	ค่าความเป็นกรด-ด่าง			ค่าเฉลี่ยแยกตามความเค็ม
	4.0±0.5	6.2±0.5	10.0±0.5	
0	2.04±0.21^{a}	1.96±0.08^{ab}	1.90±0.21^{ab}	1.96±0.13^{a}
17	2.02±0.17^{a}	2.05±0.14^{a}	1.89±0.17^{ab}	1.99±0.16^{a}
35	2.04±0.07^{a}	1.96±0.06^{ab}	1.77±0.04^{b}	1.93±0.13^{a}
ค่าเฉลี่ยแยกตามค่าความเป็นกรด-ด่าง	2.03±0.10^{a}	1.99±0.10^{a}	1.86±0.15^{b}	

ตารางที่ 14 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างและความเค็ม ที่แตกต่างกัน

ความเค็ม (พีพีที)	กิจกรรมของเซลลูเลส ยูนิต/มิลลิลิตร (x10^{-2})			
	ค่าความเป็นกรด-ด่าง			ค่าเฉลี่ยแยกตามความเค็ม
	4.0±0.5	6.2±0.5	10.0±0.5	
0	1.58±0.07^{c}	1.58±0.06^{c}	1.69±0.04^{abc}	1.61±0.07^{a}
17	1.64±0.04^{bc}	1.66±0.03^{bc}	1.77±0.07^{ab}	1.69±0.08^{a}
35	1.65±0.08^{bc}	1.63±0.10^{abc}	1.85±0.31^{a}	1.71±0.20^{a}
ค่าเฉลี่ยแยกตามค่าความเป็นกรด-ด่าง	1.62±0.07^{b}	1.62±0.07^{b}	1.77±0.18^{a}	

ตารางที่ 15 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส จากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเค็ม ที่แตกต่างกัน

ความเค็ม (พีพีที)	กิจกรรมของโปรติเอส ยูนิต/มิลลิลิตร ($\times 10^{-2}$)			
	ค่าความเป็นกรด-ด่าง			ค่าเฉลี่ยแยกตาม
	4.0±0.5	6.2±0.5	10.0±0.5	ความเค็ม
0	4.44±1.39^{a}	3.74±0.54^{a}	-2.04±4.45^{c}	2.04±3.88^{a}
17	4.80±1.73^{a}	2.73±0.92^{abc}	-1.06±1.26^{bc}	2.15±2.82^{a}
35	3.59±2.51^{ab}	3.03±3.82^{ab}	3.76±2.67^{a}	3.46±2.67^{a}
ค่าเฉลี่ยแยกตามค่าความเป็นกรด-ด่าง	4.28±1.76^{a}	3.16±2.03^{a}	0.22±3.79^{b}	

ตารางที่ 16 กิจกรรมเอนไซม์เอสเทอเรส จากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเค็ม ที่แตกต่างกัน

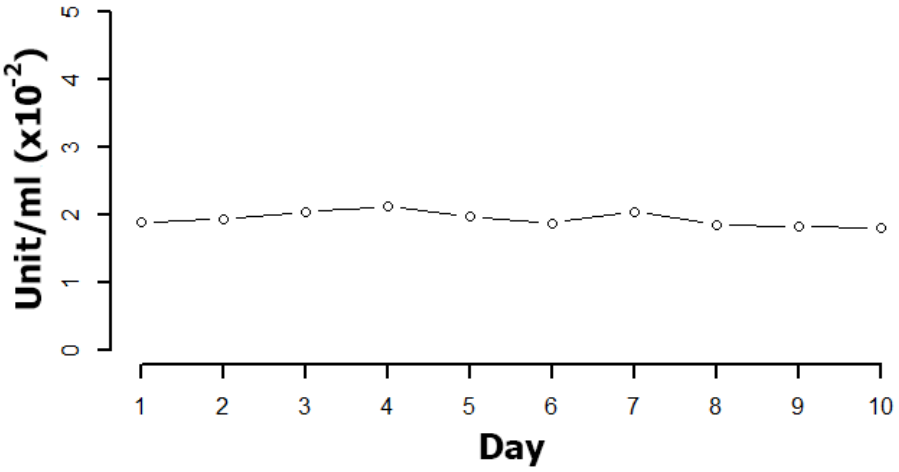
ความเค็ม (พีพีที)	กิจกรรมของเอสเทอเรส ยูนิต/มิลลิลิตร			
	ค่าความเป็นกรด-ด่าง			ค่าเฉลี่ยแยกตาม
	4.0±0.5	6.2±0.5	10.0±0.5	ความเค็ม
0	0.10±0.00^{d}	0.26±0.02^{a}	0.10±0.02^{dde}	0.15±0.08^{a}
17	0.02±0.01^{e}	0.17±0.04^{bc}	0.08±0.02^{de}	0.09±0.07^{a}
35	0.16±0.01^{c}	0.02±0.02^{e}	0.23±0.10a^{b}	0.14±0.10^{a}
ค่าเฉลี่ยแยกตามค่าความเป็นกรด-ด่าง	0.10±0.06^{a}	0.15±0.10^{a}	0.14±0.09^{a}	

ตารางที่ 17 กิจกรรมไลโซไซม์ จากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเค็ม ที่แตกต่างกัน

ความเค็ม (พีพีที)	กิจกรรมของไลโซไซม์ ยูนิต/มิลลิลิตร ($\times 10^{-2}$)			
	ค่าความเป็นกรด-ด่าง			ค่าเฉลี่ยแยกตาม
	4.0±0.5	6.2±0.5	10.0±0.5	ความเค็ม
0	0	0	0	0
17	0	0	0	0
35	0	0	0	0
ค่าเฉลี่ยแยกตามค่าความเป็นกรด-ด่าง	0	0	0	0

การศึกษากิจกรรมเอนไซม์จากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 รายวัน

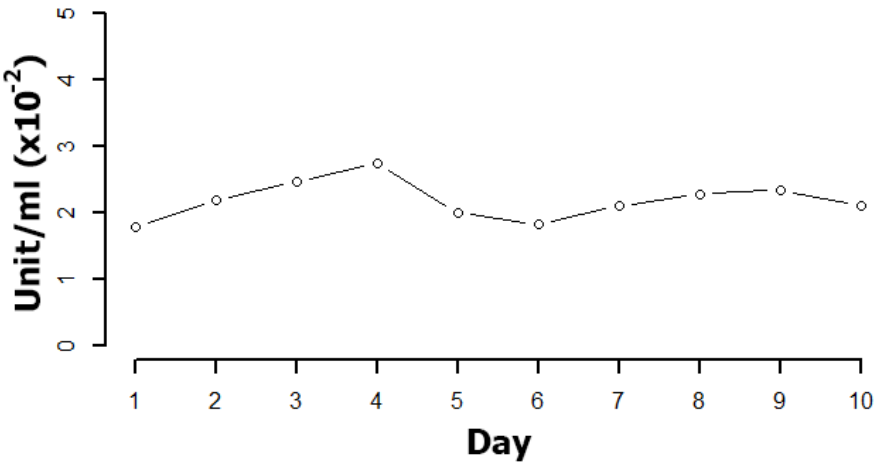
จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 แบบ Free cell ในอาหารเหลว ISP2 ความเค็ม 17 ppt ค่าความเป็นกรด – ด่าง 6.2 ± 0.5 เป็นเวลา 10 วัน พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส โปรติเอส และเอสเทอเรส สูงสุดอยู่วันที่ 4 ในขณะที่กิจกรรมไลโซไซม์สูงสุดอยู่วันที่ 8, 9 และ 10 และผลการทดสอบสถิติด้วย Duncan's multiple range test แสดงในตารางที่ 18-22 และ ภาพที่ 12-16 ตามลำดับ



ภาพที่ 12 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 รายวัน

ตารางที่ 18 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 รายวัน

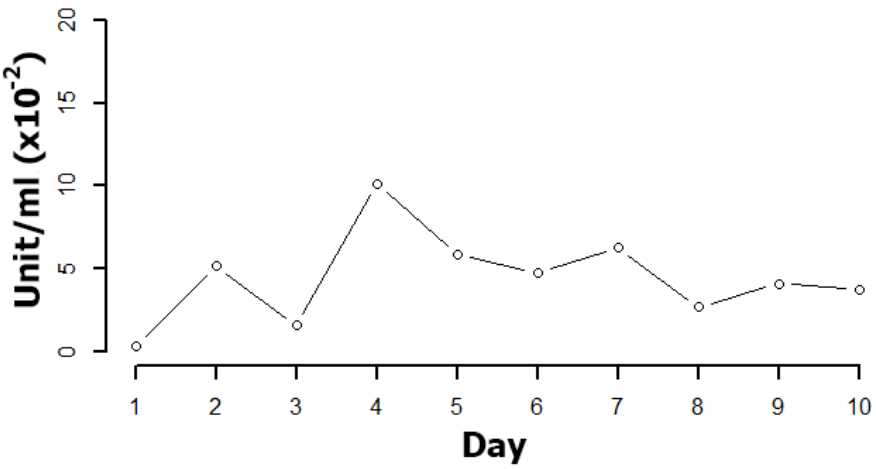
วัน	กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส Unit/ml ($x10^{-2}$)
1	1.89 ± 0.16^{bcde}
2	1.94 ± 0.12^{bcde}
3	2.04 ± 0.04^{abc}
4	2.13 ± 0.02^{a}
5	1.98 ± 0.10^{abcd}
6	1.88 ± 0.01^{cde}
7	2.05 ± 0.11^{ab}
8	1.86 ± 0.02^{de}
9	1.83 ± 0.01^{de}
10	1.80 ± 0.03^{e}



ภาพที่ 13 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 รายวัน

ตารางที่ 19 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 รายวัน

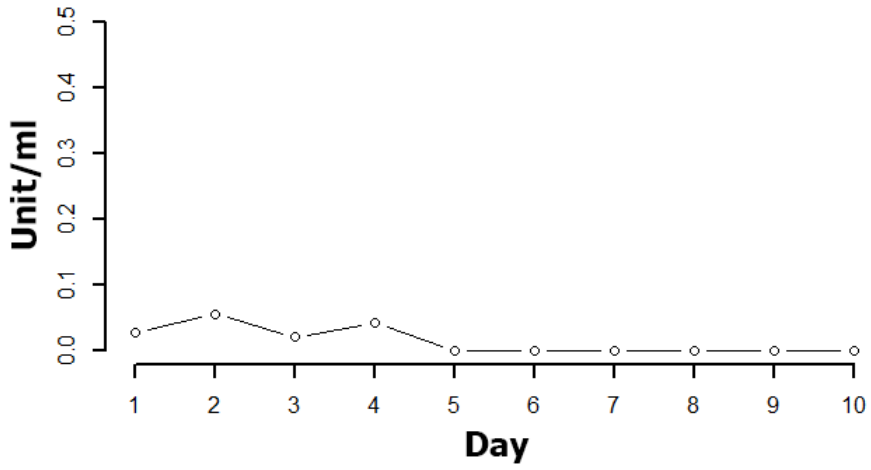
วัน	กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส Unit/ml ($x10^{-2}$)
1	1.78 ± 0.00^{d}
2	2.19 ± 0.19^{bc}
3	2.46 ± 0.08^{ab}
4	2.74 ± 0.02^{a}
5	2.01 ± 0.08^{cd}
6	1.82 ± 0.1^{d}
7	2.10 ± 0.11^{bcd}
8	2.28 ± 0.06^{bc}
9	2.35 ± 0.03^{bc}
10	2.10 ± 0.04^{bcd}



ภาพที่ 14 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 รายวัน

ตารางที่ 20 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 รายวัน

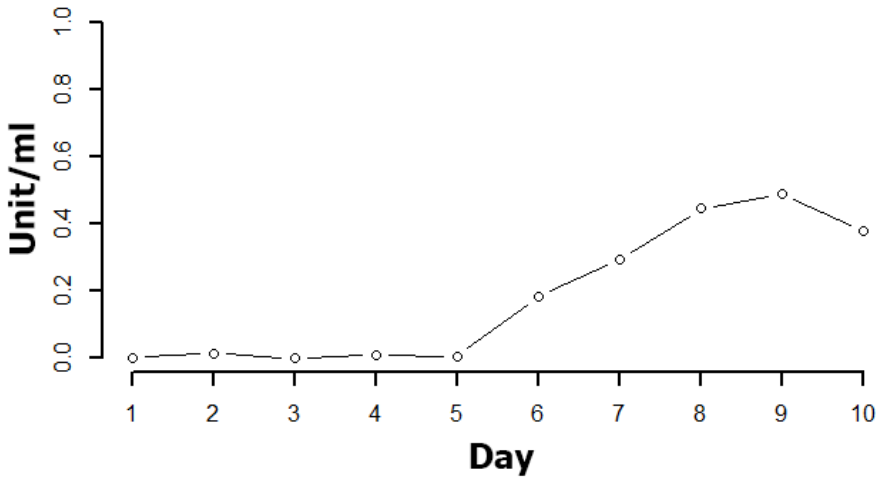
วัน	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส Unit/ml ($x10^{-2}$)
1	0.34 ± 0.24^{d}
2	5.19 ± 2.27^{bc}
3	1.60 ± 0.97^{bcd}
4	10.15 ± 1.79^{a}
5	5.87 ± 4.04^{b}
6	4.75 ± 0.70^{bcd}
7	6.27 ± 1.02^{ab}
8	2.69 ± 1.12^{bcd}
9	4.12 ± 0.46^{bcd}
10	3.78 ± 1.06^{bcd}



ภาพที่ 15 กิจกรรมเอนไซม์เอสเทอเรสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 รายวัน

ตารางที่ 21 กิจกรรมเอนไซม์เอสเทอเรสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 รายวัน

วัน	กิจกรรมเอนไซม์เอสเทอเรส Unit/ml
1	0.03 ± 0.02^{b}
2	0.06 ± 0.01^{a}
3	0.02 ± 0.01^{bc}
4	0.04 ± 0.02^{ab}
5	0.00±0.00
6	0.00±0.00
7	0.00±0.00
8	0.00±0.00
9	0.00±0.00
10	0.00±0.00



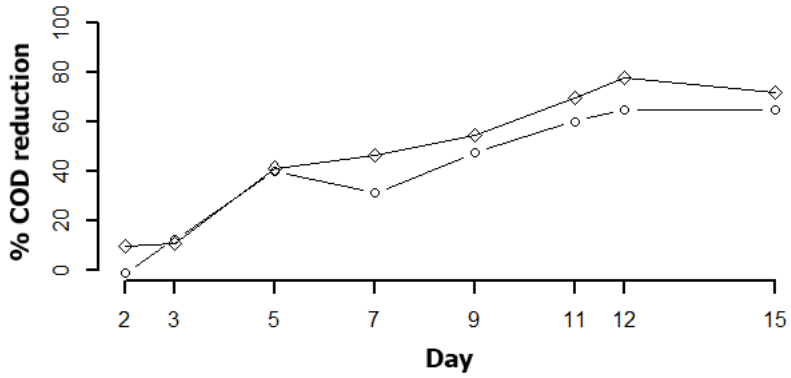
ภาพที่ 16 กิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์จากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 รายวัน

ตารางที่ 22 กิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์จากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 รายวัน

วัน	กิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์ Unit/ml
1	0.00 ± 0.00^{d}
2	0.01 ± 0.03^{d}
3	0.0 ± 0.00^{d}
4	0.01 ± 0.02^{d}
5	0.00 ± 0.01^{d}
6	0.18 ± 010^{c}
7	0.29 ± 0.13^{bc}
8	0.44 ± 0.03^{a}
9	0.49 ± 0.03^{a}
10	0.38 ± 0.03^{ab}

การบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์แป้งมันสำปะหลังโดยวัดอัตราการลดลงของ COD

น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นองค์ประกอบมีค่า COD 94,400 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดสอบกลุ่มควบคุมเป็นกลุ่มที่ไม่เติมเชื้อแอคติโนมัยซีท มีปริมาตรน้ำเสีย 4,500 มิลลิลิตร และอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 500 มิลลิลิตร กลุ่มทดลอง เป็นกลุ่มที่มีปริมาตรเชื้อแอคติโนมัยซีท 500 มิลลิลิตร และปริมาตรน้ำเสีย 4,500 มิลลิลิตร จากการเติมเชื้อ NS56-4-6 ลงในถังปฏิกิริยาจำนวน 3 ถังที่มีน้ำเสียสังเคราะห์ โดยวัดค่า COD, ค่าความเป็นกรด – ด่าง,น้ำตาลรีดิวซ์, น้ำหนักตะกอน, ความเค็ม, อุณหภูมิ และค่าออกซิเจนละลายน้ำทุกวัน ทุกวันเป็นเวลา 15 วัน พบว่า ณ วันที่ 11 และ 12 เชื้อ NS56-4-6 สามารถลดค่า COD ลงได้ร้อยละ 69.40±7.06 และ 69.40±7.06 (ภาพที่ 17) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับในกลุ่มควบคุมที่สามารถลดค่า COD ได้เพียงร้อยละ 60.17±4.15 และ 64.97±7.92 ตามตารางที่ 23



ภาพที่ 17 อัตราการลดลงของ COD ของน้ำเสียสังเคราะห์แป้งมันสำปะหลัง จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

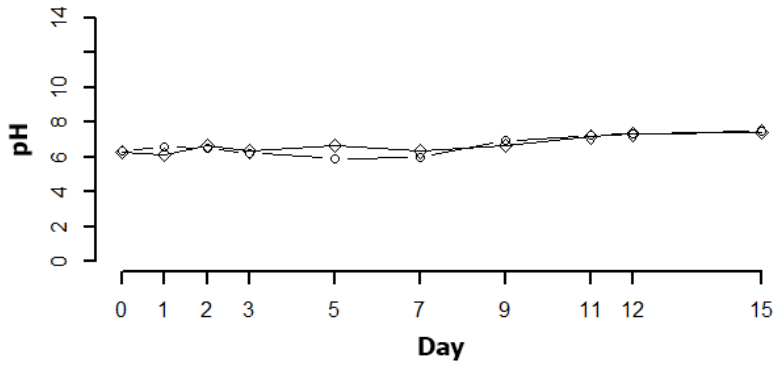
(○ = ชุดควบคุม, ◇ = ชุดการทดลอง)

ตารางที่ 23 อัตราการลดลงของ COD ในน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

วัน	การลดลงของค่า COD (%)	
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลองที่ 1 (free cell)
2	-1.13±19.84[a]	9.95±13.96[a]
3	12.43±12.62[a]	10.94±11.74[a]
5	40.11±7.92[a]	41.29±15.30[a]
7	31.30±13.04[a]	46.27±15.02[a]
9	47.46±8.02[a]	54.73±10.95[a]
11	60.17±4.15[b]	69.40±7.06[a]
12	64.97±7.92[b]	77.61±4.90[a]
15	64.97±9.92[a]	71.64±7.31[a]

ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

น้ำเสียสังเคราะห์มีค่า ความเป็นกรด – ด่าง 6.37 ผลจากการเติมเชื้อ NS56-4-6 ลงในถังปฏิกิริยาจำนวน 3 ถังที่มีน้ำเสียสังเคราะห์ โดยวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง ทุกวันเป็นเวลา 15 วัน พบว่า ตลอดระยะเวลาการทดลองค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มสูงขึ้น ณ วันที่ 15 ค่าความเป็นกรด-ด่างในชุดควบคุมอยู่ที่ 7.47±0.02 และชุดการทดลองอยู่ที่ 7.44±0.02 (ภาพที่18) แต่เมื่อทดสอบสถิติพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างทั้ง 2 ชุดการทดลอง (ตารางที่ 24) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพที่ 18 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำเสียสังเคราะห์แป้งมันสำปะหลังจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

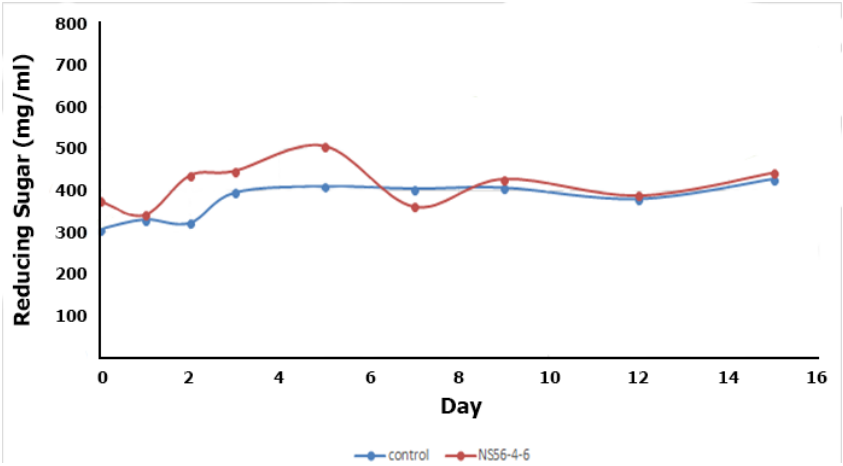
(○ = ชุดควบคุม, ◇ = ชุดการทดลอง)

ตารางที่ 24 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดของเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

วัน	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลองที่ 1 (free cell)
0	6.37±0.05[a]	6.30±0.05[a]
1	6.59±0.00[a]	6.15±0.76[a]
2	6.50±0.08[a]	6.63±0.29[a]
3	6.23±0.20[a]	6.32±0.11[a]
5	5.90±0.45[a]	6.68±0.17[a]
7	5.99±0.92[a]	6.32±0.70[a]
9	6.92±0.15[a]	6.65±0.56[a]
11	7.26±0.04[a]	7.15±0.35[a]
12	7.32±0.02[b]	7.30±0.01[a]
15	7.47±0.02[a]	7.44±0.02[a]

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ในน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

จากการทดสอบน้ำตาลรีดิวส์พบว่าในวันที่ 5 ของการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ของชุดทดลองของเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 มีค่าน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดในวันที่ 5 แสดงให้เห็นว่าเอมไซม์ทำงานได้ดีในวันที่ 5 ของการบำบัด (ภาพที่ 19)

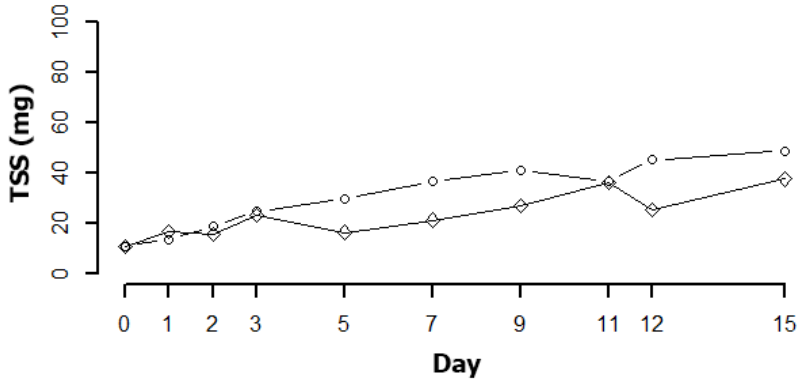


ภาพที่ 19 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

(○ = ชุดควบคุม, ◇ = ชุดการทดลอง)

ปริมาณตะกอนในน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

น้ำเสียสังเคราะห์มีน้ำหนักตะกอนเริ่มต้นในชุดควบคุมคือ 11.03±2.90 มิลลิกรัม และชุดการทดลองคือ 10.87±1.46 กรัม ผลจากการเติมเชื้อ NS56-4-6 ลงในถังปฏิกิริยาจำนวน 3 ถังที่มีน้ำเสียสังเคราะห์ โดยวัดน้ำหนักตะกอน ทุกวันเป็นเวลา 15 วัน พบว่า น้ำหนักตะกอนมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ณ วันที่ 15 มีน้ำหนักตะกอนคือ 48.70±4.76 มิลลิกรัม ในชุดควบคุม และ 37.57±2.37 มิลลิกรัม ในชุดการทดลอง (ภาพที่ 20) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับในกลุ่มควบคุม ตามตารางที่ 25



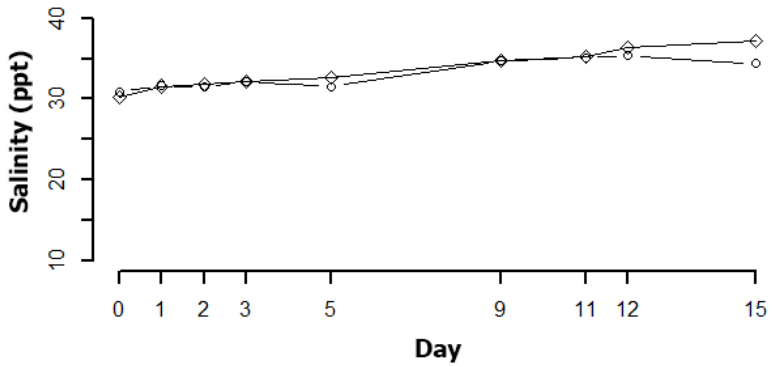
ภาพที่ 20 ปริมาณตะกอนในน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6
(○ = ชุดควบคุม, ◇ = ชุดการทดลอง)

ตารางที่ 25 ปริมาณตะกอนในน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

วัน	ตะกอน (มิลลิกรัม)	
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลองที่ 1 (free cell)
0	11.03±2.90[a]	10.87±1.46[a]
1	13.47±2.97[a]	16.67±6.33[a]
2	19.13±3.01[a]	15.77±4.37[a]
3	24.87±3.09[a]	23.17±6.90[a]
5	29.87±0.66[a]	16.50±2.27[b]
7	36.57±6.05[a]	21.37±5.57[b]
9	41.27±9.83[a]	26.83±2.73[a]
11	36.80±10.94[a]	36.23±6.20[a]
12	45.20±0.56[a]	25.40±0.53[b]
15	48.70±4.76[a]	37.57±2.37[b]

ความเค็มในน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

น้ำเสียสังเคราะห์มีความเค็มเริ่มต้นในชุดควบคุมคือ 30.97±0.23 พีพีที และชุดการทดลองคือ 30.30±0.26 พีพีที ผลจากการเติมเชื้อ NS56-4-6 ลงในถังปฏิกิริยาจำนวน 3 ถังที่มีน้ำเสียสังเคราะห์ โดยวัดความเค็ม ทุกวันเป็นเวลา 15 วัน พบว่า ความเค็มมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ณ วันที่ 15 มีความเค็มคือ 34.37±0.6 พีพีที ในชุดควบคุม และ 37.17±0.94 พีพีที ในชุดการทดลอง (ภาพที่ 21 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับในกลุ่มควบคุม ตามตารางที่ 26



ภาพที่ 21 ค่าความเค็มในน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

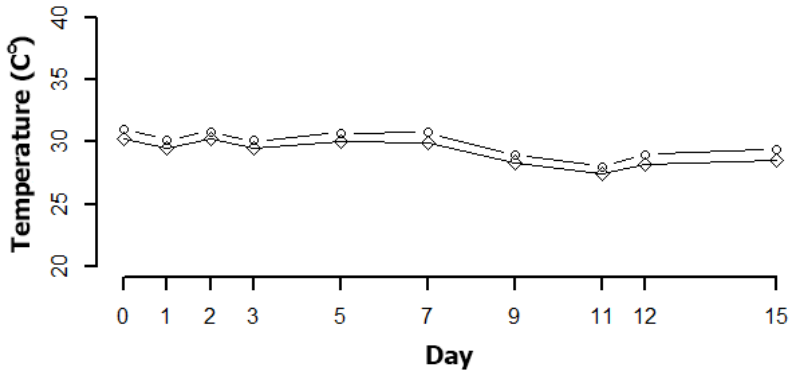
(○ = ชุดควบคุม, ◇ = ชุดการทดลอง)

ตารางที่ 26 ค่าความเค็ม ในน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

วัน	ความเค็ม (พีพีที)	
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลองที่ 1 (free cell)
0	30.97±0.23[a]	30.30±0.26[b]
1	31.63±0.71[a]	31.60±0.46[a]
2	31.50±1.10[a]	31.87±0.57[a]
3	32.13±0.81[a]	32.13±0.45[a]
5	31.60±0.60[a]	32.70±0.92[a]
9	34.73±1.69[a]	34.73±1.07[a]
11	35.13±1.89[a]	35.23±1.27[a]
12	35.33±0.15[a]	36.33±0.85[a]
15	34.37±0.66[b]	37.17±0.94[a]

อุณหภูมิในน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

น้ำเสียสังเคราะห์มีอุณหภูมิเริ่มต้นในชุดควบคุมคือ 30.97±0.23 องศาเซลเซียส และชุดการทดลองคือ 30.30±0.26 องศาเซลเซียส ผลจากการเติมเชื้อ NS56-4-6 ลงในถังปฏิกิริยาจำนวน 3 ถังที่มีน้ำเสียสังเคราะห์ โดยวัดอุณหภูมิ ทุกวันเป็นเวลา 15 วัน พบว่าอุณหภูมิมีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน (ภาพที่ 22) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในวันที่ 0, 7 และ 15 เมื่อเทียบกับในกลุ่มควบคุม ตามตารางที่ 27



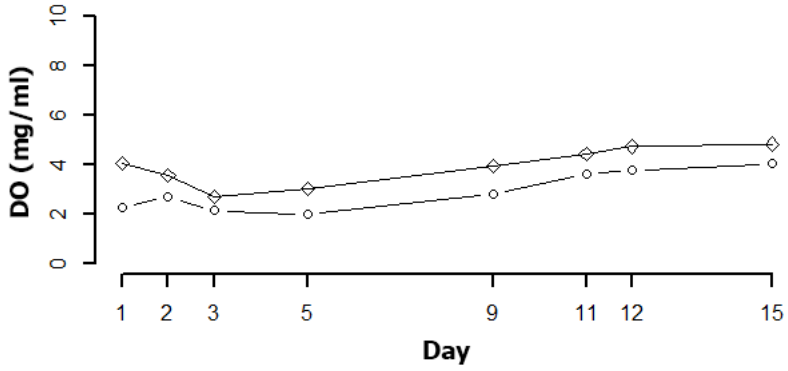
ภาพที่ 22 อุณหภูมิทั้ง ในน้ำเสียสังเคราะห์จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 (○ = ชุดควบคุม, ◇ = ชุดการทดลอง)

ตารางที่ 27 อุณหภูมิ ในน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

วัน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลองที่ 1 (free cell)
0	30.97±0.23[a]	30.30±0.26[b]
1	30.20±0.70[a]	29.47±0.06[a]
2	30.83±0.55[a]	30.23±0.15[a]
3	30.10±0.44[a]	29.47±0.15[a]
5	30.73±0.46[a]	30.07±0.06[a]
7	30.77±0.38[a]	29.93±0.25[b]
9	28.97±0.80[a]	28.37±0.50[a]
11	28.03±0.95[a]	27.47±0.55[a]
12	29.00±0.85[a]	28.17±0.35[a]
15	29.43±0.42[a]	28.50±0.36[b]

ค่าออกซิเจนละลายน้ำในน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

ผลจากการเติมเชื้อ NS56-4-6 ลงในถังปฏิกิริยาจำนวน 3 ถังที่มีน้ำเสียสังเคราะห์ โดยวัดค่าออกซิเจนละลายน้ำทุกวันเป็นเวลา 15 วัน พบว่าค่าออกซิเจนละลายน้ำมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น (ภาพที่ 23) ณ วันที่ 1, 9 และ 15 พบว่ามีความค่าออกซิเจนละลายน้ำแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับในกลุ่มควบคุม ตามตารางที่ 28



ภาพที่ 23 ค่าออกซิเจนละลายน้ำ ในน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

(○ = ชุดควบคุม, ◇ = ชุดการทดลอง)

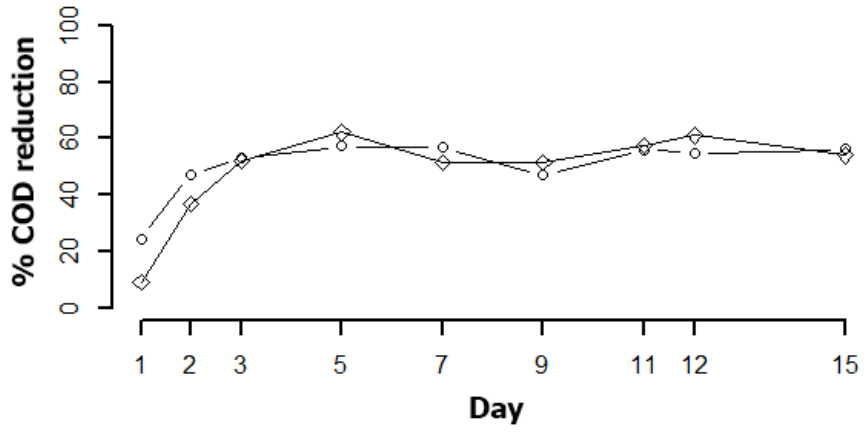
ตารางที่ 28 ค่าออกซิเจนละลายน้ำในน้ำเสียสังเคราะห์ จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

วัน	ค่าออกซิเจนละลายน้ำ (มก./มล.)	
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลองที่ 1 (free cell)
1	2.26±0.31[b]	4.07±0.35[a]
2	2.69±1.37[a]	3.55±1.19[a]
3	2.16±1.10[a]	2.71±2.30[a]
5	2.00±0.96[a]	3.03±1.99[a]
9	2.80±0.53[b]	3.94±1.26[a]
11	3.61±0.98[a]	4.42±0.84[a]
12	3.78±0.83[a]	4.73±0.06[a]
15	4.04±0.22[b]	4.83±0.07[a]

การศึกษาการบำบัดน้ำเสียโรงงานน้ำปลาโดยวัดอัตราการลดลงของ COD

อัตราการลดลงของ COD ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลา

น้ำเสียโรงงานน้ำปลามีค่า COD 53,066 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลจากการเติมเชื้อ NS56-4-6 ลงในถังปฏิกิริยาจำนวน 3 ถังที่มีน้ำเสียโรงงานน้ำปลา โดยวัดค่า COD, ค่าความเป็นกรด – ด่าง, ปริมาณโปรตีน, น้ำหนักตะกอน, ความเค็ม, อุณหภูมิ และค่าออกซิเจนละลายน้ำทุกวัน ทุกวันเป็นเวลา 15 วัน พบว่า ณ วันที่ 15 สามารถลดค่า COD ลงได้ร้อยละ 56.28±6.03 ในชุดควบคุม และ 54.05±3.35 ในชุดการทดลอง (ภาพที่ 24) ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ตามตารางที่ 29



ภาพที่ 24 อัตราการลดลงของ COD ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

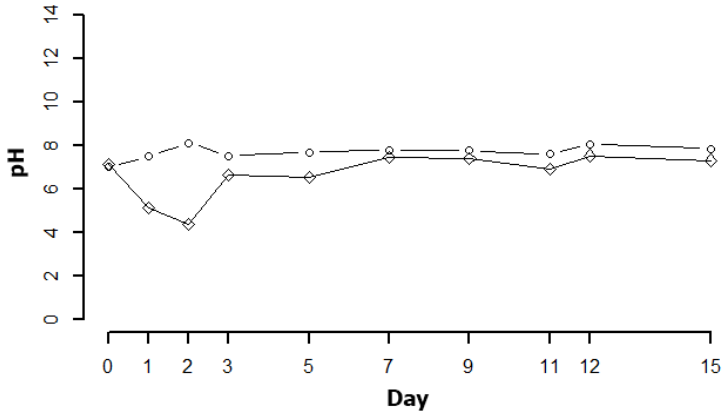
(○ = ชุดควบคุม, ◇ = ชุดการทดลอง)

ตารางที่ 29 อัตราการลดลงของ COD ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

วัน	ร้อยละการลดลงของ COD	
	ชุดควบคุม	**ชุดการทดลอง**
1	24.62±13.75[a]	9.19±9.84[b]
2	47.49±5.28[a]	37.03±4.43[b]
3	53.02±4.12[a]	52.16±7.72[a]
5	57.29±3.16[a]	62.16±9.40[a]
7	56.78±7.78[a]	51.57±4.92[a]
9	47.24±4.26[a]	51.35±3.40[a]
11	56.03±2.46[a]	57.57±5.95[a]
12	54.77±5.04[b]	61.08±4.10[a]
15	56.28±6.03[a]	54.05±3.35[a]

ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

น้ำเสียโรงงานน้ำปลามีค่า ความเป็นกรด – ด่าง 6.37 ผลจากการเติมเชื้อ NS56-4-6 ลงในถังปฏิกิริยาจำนวน 3 ถังที่มีน้ำเสียสังเคราะห์ โดยวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง ทุกวันเป็นเวลา 15 วัน พบว่า ตลอดระยะเวลาการทดลองค่าความเป็นกรด-ด่างข้นข้างคงที่ ณ วันที่ 15 ค่าความเป็นกรด-ด่างในชุดควบคุมอยู่ที่ 7.85±0.09 และชุดการทดลองอยู่ที่ 7.31±0.07 (ภาพที่25) แต่เมื่อทดสอบสถิติพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างทั้ง 2 ชุดการทดลอง (ตารางที่ 30) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



ภาพที่ 25 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

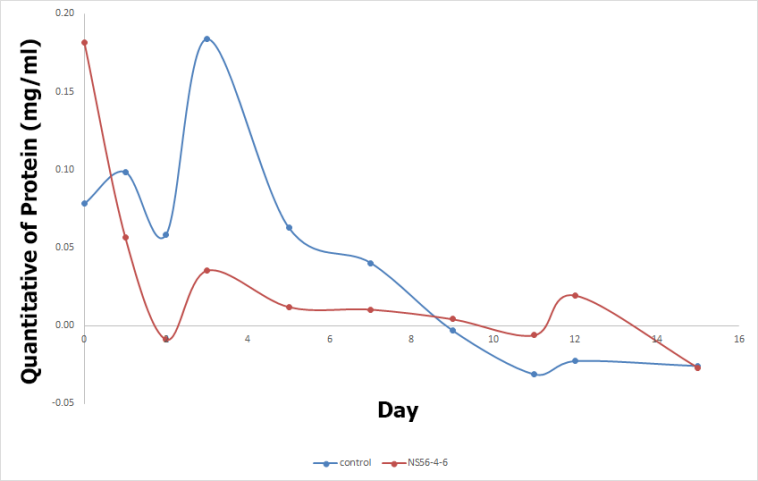
(○ = ชุดควบคุม, ◇ = ชุดการทดลอง)

ตารางที่ 30 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

วัน	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง
0	7.01±0.08[a]	7.12±0.00[a]
1	7.50±0.83[a]	5.13±0.04[b]
2	8.13±0.64[a]	4.37±0.12[b]
3	7.53±0.59[a]	6.62±0.08[a]
5	7.69±0.34[a]	6.52±0.16[b]
7	7.80±0.24[a]	7.45±0.00[a]
9	7.75±0.24[a]	7.39±0.02[a]
11	7.61±0.48[a]	6.92±0.02[a]
12	8.06±0.07[a]	7.53±0.05[b]
15	7.85±0.09[a]	7.31±0.07[b]

ปริมาณโปรตีนในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

พบว่าปริมาณโปรตีนในชุดทดลองที่มีเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 มีค่าลดลงในวันที่ 3 ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) **ภาพที่ 26**

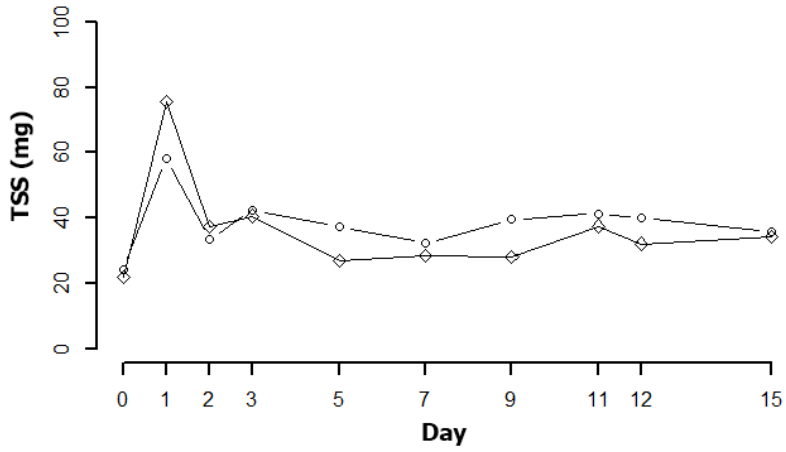


ภาพที่ 26 ปริมาณโปรตีนในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

ปริมาณตะกอนในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

น้ำเสียโรงงานน้ำปลามีน้ำหนักตะกอนเริ่มต้นในชุดควบคุมคือ 24.37±3.77 มิลลิกรัม และชุดการทดลองคือ 22.13±5.23 กรัม ผลจากการเติมเชื้อ NS56-4-6 ลงในถังปฏิกิริยาจำนวน 3 ถังที่มีน้ำเสียโรงงานน้ำปลา โดยวัดน้ำหนักตะกอน ทุกวันเป็นเวลา 15 วัน พบว่า น้ำหนักตะกอนมีปริมาณค่อนข้างคงที่ ณ วันที่ 15 มีน้ำหนักตะกอนคือ 35.83±1.04 มิลลิกรัม ในชุดควบคุม และ

34.23±3.20 มิลลิกรัม ในชุดการทดลอง (ภาพที่ 27) ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับในกลุ่มควบคุม ตามตารางที่ 31



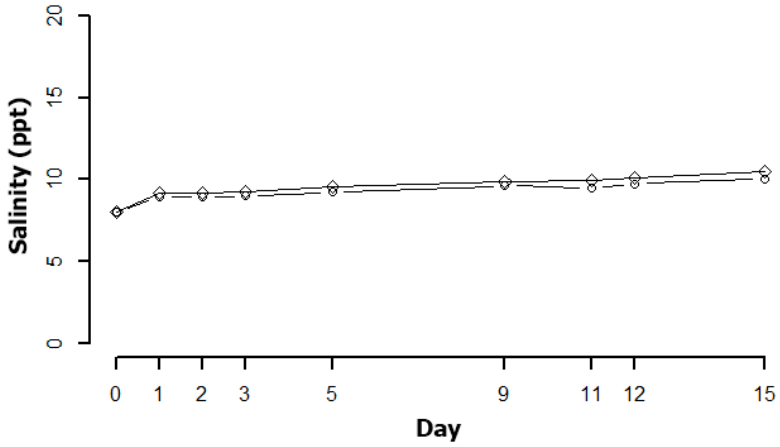
ภาพที่ 27 ปริมาณตะกอนในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 (○ = ชุดควบคุม, ◇ = ชุดการทดลอง)

ตารางที่ 31 ปริมาณตะกอนในน้ำเสียโรงงานน้ำปลา จากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

วัน	ตะกอน (มิลลิกรัม)	
	ชุดควบคุม	**ชุดการทดลอง**
0	24.37±3.77[a]	22.13±5.23[a]
1	58.30±7.63[a]	75.57±15.18[a]
2	33.43±9.65[a]	37.53±16.98[a]
3	42.50±3.39[a]	40.70±12.51[a]
5	37.40±3.21[a]	27.00±6.94[a]
7	32.37±4.23[a]	28.63±11.16[a]
9	39.63±4.39[a]	28.30±4.43[b]
11	41.40±4.54[a]	37.63±3.92[a]
12	41.13±2.57[a]	32.23±3.96[b]
15	35.83±1.04[a]	34.23±3.20[a]

ความเค็มในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

น้ำเสียโรงงานน้ำปลามีความเค็มเริ่มต้นในชุดควบคุมและชุดการทดลองคือ 8.00±0.00 พีพีที ผลจากการเติมเชื้อ NS56-4-6 ลงในถังปฏิกิริยาจำนวน 3 ถังที่มีน้ำเสียสังเคราะห์ โดยวัดความเค็ม ทุกวันเป็นเวลา 15 วัน พบว่า ความเค็มมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ณ วันที่ 15 มีความเค็มคือ 10.03±0.21พีพีที ในชุดควบคุม และ 10.50±0.10 พีพีที ในชุดการทดลอง (ภาพที่ 28) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับในกลุ่มควบคุม ตามตารางที่ 32



ภาพที่ 28 ค่าความเค็ม ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

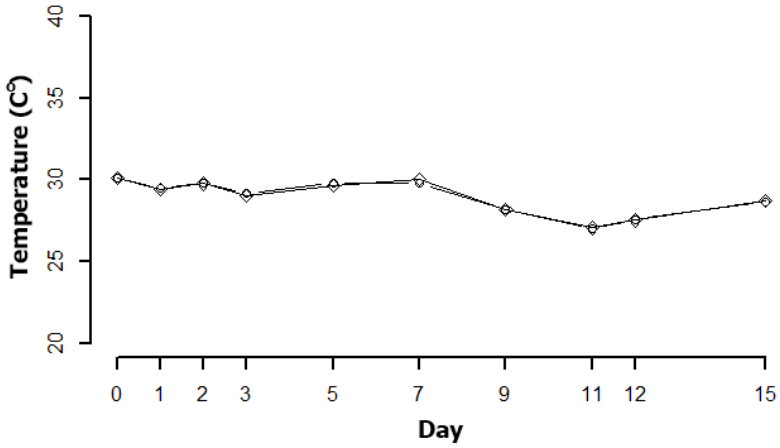
(○ = ชุดควบคุม, ◇ = ชุดการทดลอง)

ตารางที่ 32 ค่าความเค็มในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดโดยใช้เชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

วัน	ความเค็ม (มิลลิกรัม/ลิตร)	
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง
0	8.00±0.00[a]	8.00±0.00[a]
1	8.93±0.15[a]	9.17±0.06[a]
2	8.93±0.30[a]	9.20±0.10[a]
3	9.00±0.36[a]	9.27±0.06[a]
5	9.23±0.25[a]	9.57±0.12[a]
9	9.63±0.25[a]	9.81±0.12[a]
11	9.50±0.36[a]	9.97±0.15[a]
12	9.73±0.12[b]	10.13±0.06[a]
15	10.03±0.21[b]	10.50±0.10[a]

อุณหภูมิในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

น้ำเสียโรงงานน้ำปลามีอุณหภูมิเริ่มต้นในชุดควบคุมคือ 30.13±0.06 องศาเซลเซียส และชุดการทดลองคือ 30.10±0.20 องศาเซลเซียส ผลจากการเติมเชื้อ NS56-4-6 ลงในถังปฏิกิริยาจำนวน 3 ถังที่มีน้ำเสียสังเคราะห์ โดยวัดอุณหภูมิ ทุกวันเป็นเวลา 15 วัน พบว่าอุณหภูมิมีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน ค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการทดลอง (ภาพที่ 29) ซึ่งพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในตลอดระยะเวลาการทดลอง ตามตารางที่ 33



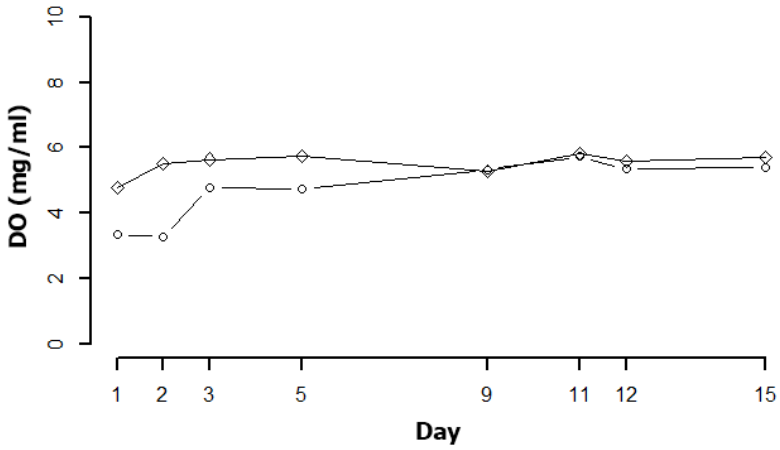
ภาพที่ 29 อุณหภูมิในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 (○ = ชุดควบคุม, ◇ = ชุดการทดลอง)

ตารางที่ 33 อุณหภูมิ ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

วัน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง
0	30.13±0.06[a]	30.10±0.20[a]
1	29.50±0.10[a]	29.40±0.10[a]
2	29.83±0.15[a]	29.77±0.15[a]
3	29.17±0.21[a]	29.00±0.17[a]
5	29.80±0.10[a]	29.67±0.15[a]
7	29.80±0.20[a]	30.00±0.30[a]
9	28.20±0.30[a]	28.17±0.35[a]
11	27.00±0.20[a]	27.07±0.25[a]
12	27.60±0.10[a]	27.53±0.15[a]
15	28.67±0.06[a]	28.70±0.10[a]

ค่าออกซิเจนละลายน้ำในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

ผลจากการเติมเชื้อ NS56-4-6 ลงในถังปฏิกิริยาจำนวน 3 ถังที่มีน้ำเสียโรงงานน้ำปลา โดยค่าออกซิเจนละลายน้ำทุกวันเป็นเวลา 15 วัน พบว่าค่าออกซิเจนละลายน้ำมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น (ภาพที่ 30) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับในกลุ่มควบคุม ตามตารางที่ 34



ภาพที่ 30 ค่าออกซิเจนละลายน้ำ ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

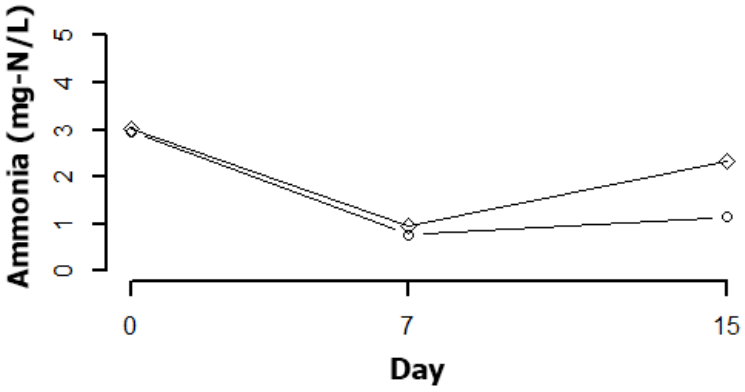
(○ = ชุดควบคุม, ◇ = ชุดการทดลอง)

ตารางที่ 34 ค่าออกซิเจนละลายน้ำ ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

วัน	ค่าออกซิเจนละลายน้ำ (มก./มล.)	
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง
1	3.35±0.45[b]	4.79±0.04[a]
2	3.30±0.98[b]	5.52±0.32[a]
3	4.80±0.52[a]	5.65±0.14[a]
5	4.75±0.413[b]	5.76±0.10[a]
9	5.33±0.46[a]	5.30±0.24[a]
11	5.74±0.87[a]	5.84±0.11[a]
12	5.36±0.24[a]	5.61±0.16[a]
15	5.39±0.24[a]	5.72±0.11[a]

ปริมาณแอมโมเนียละลายน้ำในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

จากการเติมเชื้อ NS56-4-6 ลงในถังปฏิกิริยาจำนวน 3 ถังที่มีน้ำเสียโรงงานน้ำปลา โดยวัดปริมาณแอมมเนียเป็นเวลา 3 วัน พบว่าปริมาณแอมโมเนียมีปริมาณลดลงในวันที่ 7 และเพิ่มขึ้นในวันที่ 15 (ภาพที่ 31) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับในกลุ่มควบคุม ตามตารางที่ 35



ภาพที่ 31 ปริมาณแอมโมเนีย (mg-N/L) ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

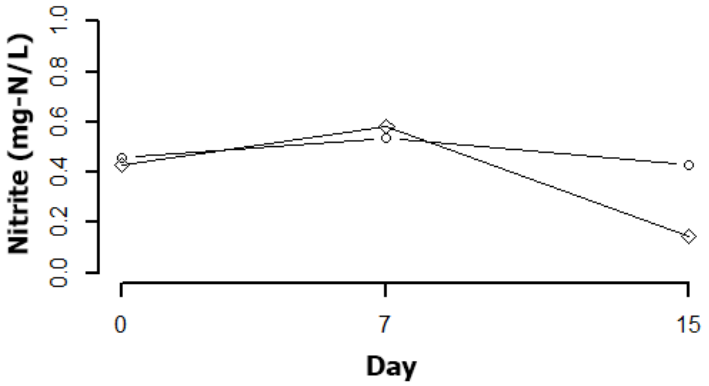
(○ = ชุดควบคุม, ◇ = ชุดการทดลอง)

ตารางที่ 35 ปริมาณแอมโมเนีย (mg-N/L) ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

วันที่	แอมโมเนีย (mg-N/L)	
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง
0	2.96±0.08[a]	3.01±0.03[a]
7	0.78±0.13[a]	0.97±0.06[a]
15	1.16±0.26[b]	2.34±0.29[a]

ปริมาณไนไตร์ทในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

จากการเติมเชื้อ NS56-4-6 ลงในถังปฏิกิริยาจำนวน 3 ถังที่มีน้ำเสียโรงงานน้ำปลา โดยวัดปริมาณไนไตร์ทเป็นเวลา 3 วัน พบว่าปริมาณไนไตร์ทละลายน้ำมีปริมาณเพิ่มขึ้นในวันที่ 7 และลดลงในวันที่ 15 (ภาพที่ 32) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับในกลุ่มควบคุม ตามตารางที่ 36



ภาพที่ 32 ปริมาณไนไตร์ท (mg-N/L) ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

(○ = ชุดควบคุม, ◇ = ชุดการทดลอง)

ตารางที่ 36 ปริมาณไนไตร์ท (mg-N/L) ในน้ำเสียโรงงานน้ำปลาจากการบำบัดด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

วันที่	ไนไตร์ท (mg-N/L)	
	ชุดควบคุม	ชุดการทดลอง
0	0.46±0.09[a]	0.43±0.07[a]
7	0.54±0.10[a]	0.58±0.01[a]
15	0.43±0.28[a]	0.14±0.02[a]

บทที่ 3
อภิปรายผลการวิจัย

การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์

จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต ในอาหารเหลว ISP2 ความเค็ม 17 ppt ค่าความเป็นกรดด่าง 6.2 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน พบว่าแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลตสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส โปรติเอส และไลโซไซม์ได้ โดยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6, CP58-4-20 และ CP58-9-16 แสดงค่าการทำงานเอนไซม์อะไมเลสดีที่สุด เชื้อแอคติโนมัยซีท CP58-9-20, NS56-4-6 และ PL1-4 แสดงค่าการทำงานเอนไซม์เซลลูเลสดีที่สุด และเชื้อแอคติโนมัยซีท CP15-9-2, CP58-9-18 และ CP15-6-9 แสดงค่าการทำงานเอนไซม์โปรติเอสดีที่สุด

เชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6, CP58-4-20 และ CP58-9-16 แสดงค่าการทำงานเอนไซม์อะไมเลสดีที่สุด เชื้อแอคติโนมัยซีท CP58-9-20, NS56-4-6 และ PL1-4 แสดงค่าการทำงานเอนไซม์เซลลูเลสดีที่สุด การตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว และเนื้อไม้ (ศิราภรณ์ สุขวโรทัย, 2550) รวมทั้งการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอก และอุตสาหกรรมผลิตเชื้อเพลิง (Carrasco, 2016) ซึ่งแอคติโนมัยซีทในกลุ่ม *Micromonospora* พบว่ามีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารอินทรีย์เช่น เซลลูโลส กลูโคไซส์ ไคตินเพ็นโตแซน และลิกนิน เป็นต้น (จีรพรรณ์ ใจอินผล, 2550) จากการศึกษาของ จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, พัฒน ศิลปชัย และ ณิษา สิรนนท์ธนา (2560) พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีท CP58-4-26 แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลนจังหวัดชุมพร ซึ่งอยู่ในสกุล *Micromonospora* sp. มีกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและอะไมเลสมากที่สุดมีศักยภาพในการพัฒนาไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานแป้งมันหรือโรงงานที่มีวัสดุเหลือทิ้งเป็นแป้งหรือเซลลูโลส กากตะกอนจากการบำบัดน้ำเสียสามารถนำไปใช้เป็นปุ๋ยได้ เนื่องจากในกระบวนการย่อยสลายสุดท้ายจะได้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตกรดฮิวมิค (Zhao et al., 2017) โดยกรดฮิวมิคที่เกิดขึ้นสามารถช่วยให้ต้นข้าวแตกกอมากขึ้น จำนวนรวง ความยาวรวง และจำนวนเมล็ดดีต่อรวงสูง (กนกพร, 2532)

เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายเซลลูโลสให้มีขนาดโมเลกุลที่เล็กลง เช่น กลูโคส (Glucose) โดยพบว่าเอนไซม์นี้สร้างได้โดยสิ่งมีชีวิตทั้งพืช สัตว์และจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย และเชื้อรา เป็นต้น ส่วนใหญ่ถูกสร้างและหลั่งออกมานอกเซลล์ (Extracellular enzyme) ซึ่งถูกเหนี่ยวนำ ให้สร้างโดยสิ่งแวดล้อม ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อจุลินทรีย์ปัจจัยสำคัญที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ นอกจากจะ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์แล้วยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ อีก เช่น ชนิดความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรอง รวมไปถึงสภาพแวดล้อมการผลิต ได้แก่ อายุและ ปริมาณของเชื้อเริ่มต้น ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) อุณหภูมิการให้อากาศ และอัตราการเขย่า (พรเทพ, 2538) อะไมเลสเปนกลุ่มเอนไซมที่มีความสำคัญในการยอยแปงใหเปนน้ำตาล ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมตอการทำงานของเอนไซมคือแปงตองผานกระบวนการตมใหสุกกอน ทำใหเสียพลังงาน เสียเวลา และสิ้นเปลืองคาใชจาย จึงได มีการศึกษาการย อยแป งโดยไม ต องทำให สุกก อน โดยใช จุลินทรีย ที่ผลิตอะไมเลสที่มีความสามารถในการยึดเกาะและยอยแปงดิบชนิดตาง ๆ ซึ่งเหตุผลสำคัญที่ใชเอนไซมจากจุลินทรียใน

การยอยแปงนั้น เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซมไดในปริมาณมาก ตนทุนการผลิตต่ำ และควบคุมสภาวะได้ง่าย (เบญจพร, 2542) ดังนั้นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ NS56-4-6, CP58-4-20 และ CP58-9-16 แสดงค่าการทำงานเอนไซม์อะไมเลสดีที่สุด และเชื้อแอคติโนมัยซีท CP58-9-20, NS56-4-6 และ PL1-4 แสดงค่าการทำงานเอนไซม์เซลลูเลสดีที่สุด มีศักยภาพในการพัฒนาไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานแป้งมัน หรือโรงงานที่มีวัสดุเหลือทิ้งเป็นแป้งหรือเซลลูโลส โปรติเอสส่วนใหญ่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมซักล้างและอุตสาหกรรมอาหาร โดยในอุตสาหกรรมฟอกหนัง (Leather industry) เป็นอีกอุตสาหกรรมหนึ่งที่ใช้โปรติเอส โดยปกติใช้สารเคมีเช่น โซเดียมซัลไฟต์ในการฟอกหนังและกำจัดขน แต่การใช้สารเคมีก่อให้เกิดปัญหาสารเคมีตกค้าง โปรติเอสจึงถูกเลือกมาใช้ทดแทนสารเคมีเพื่อลดปัญหาทางสิ่งแวดล้อม อุตสาหกรรมอาหารหลายกลุ่มมีการใช้โปรติเอส เช่น อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์นม (Dairy industry) ใช้โปรติเอสในการผลิตเนยแข็งช่วยในการตกตะกอนของนม ในอุตสาหกรรมขนมอบ (baking industry) ในกระบวนการผลิตแป้งสาลีมีโปรตีนที่เรียกว่า กลูเต็น (Gluten) จะมีการใช้ โปรติเอสผสมลงไปช่วยในการย่อยโปรตีน และลดเวลาในการผสม ทำให้ขนมอบมีปริมาตรเพิ่มขึ้น ในการผลิตซอสปรุงรสและน้ำปลา การใช้โปรติเอสในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์จากถั่ว โดยช่วยย่อยสลายโปรตีนจากวัตถุดิบ เอนไซม์โปรติเอสถูกนำมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ แอสปาร์แตม ซึ่งเป็นสารที่ให้ความหวานนำมาใช้ใน ผลิตภัณฑ์อาหารและยา ในอุตสาหกรรมยา เอนไซม์โปรติเอสถูกนำมาใช้ในการพัฒนาประสิทธิภาพของยาต้านจุลินทรีย์และใช้ร่วมกับสาร ปฏิชีวนะในการรักษาบาดแผล (Suryanarayana, et al., 1998) จากการศึกษาของ พัฒนและคณะในปี 2560 พบเชื้อแอคติโนมัยซีท KB3-3 และ NS56-4-6 แยกจากดินตะกอนป่าชายเลนจังหวัดกระบี่ และนครศรีธรรมราช มีค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสดีที่สุด สามารถย่อยสลายโปรตีนเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ และพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 สามารถทำให้โปรตีนจากนมตกตะกอน หากนำไปใช้บำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตนมมีความเป็นไปได้ที่กากตะกอนจากการบำบัดน้ำเสียด้วยแอคติโนมัยซีทสามารถนำมาเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ ดังนั้นเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ CP15-9-2, CP58-9-18 และCP15-6-9 มีประสิทธิภาพในกิจกรรมเอมไซม์โปรติเอสที่ดี สามารถนำไปพัฒนาเพื่อนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงาน และสามารถนำไปใช้ในอุตสหกรรมที่เกี่ยวข้องได้ เอมไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ (Microbial proteases) มีข้อดีกว่าและมีบทบาทที่สำคัญ กว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากพืชและสัตว์ เนื่องจากจุลินทรีย์เจริญเร็ว ใช้เวลาในการผลิตสั้นกว่า ใช้พื้นที่น้อย ง่ายต่อการปรับปรุง สายพันธุ์และสามารถใช้ วัตถุดิบในการนำมาผลิตได้หลากหลายชนิด (Suryanarayana et al., 1998)

แอคติโนมัยซีท CP10-9-9, CP15-6-8, NS56-4-6 สามารถผลิตเอนไซม์ไลโซไซม์ ไลโซไซม์ (Lysozyme) เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่ง มีคุณสมบัติ ตัดย่อยโปรตีน และมีฤทธิ์เจาะผนังเซลล์ของเชื้อ เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการป้องกันเชื้อโรค ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกำจัดแบคทีเรียที่สำคัญของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ เอนไซม์นี้เป็นสัญญาณเตือนถึงภาวะการติดเชื้อหรือการเกิดสภาวะเครียด (Demers & Bayne, 1997) การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ไลโซไซม์ในเรื่องกำรบำบัดน้ำเสีย ไลโซไซม์จะช่วยทำลายแบคทีเรีย ช่วยลดการใช้ออกซิเจนในแหล่งน้ำเสีย ทำให้แหล่งน้ำเสียมีค่าออกซิเจนละลายน้ำดีขึ้น

จากการศึกษาในครั้งนี้ได้คัดเลือกแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ไปศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เนื่องจาก แอคติโนมัยซีท NS56-4-6 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส ที่ดีที่สุด และแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสได้ โดยมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 3.65±0.49 Unit/ml($x10^{-2}$) จากการศึกษาของพัฒนและคณะในปี 2560 พบเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสดีที่สุด สามารถย่อยสลายโปรตีนเพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ และพบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 สามารถทำให้โปรตีนจากนมตกตะกอน เชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าเชื้อตัวอื่นๆ การได้สภาวะการเลี้ยงที่ดีที่สุด ในการผลิตเอนไซม์ สามารถนำไปพัฒนาและนำไปใช้ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องต่อไป

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันจำนวน 5 สูตร ได้แก่ ISP2, ISP2+CMC, ISP2+SS และ OYC ความเค็ม 17 ppt ค่าความเป็นกรดด่าง 6.2 เป็นเวลา 4 วัน เมื่อวัดกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส โปรติเอส เอสเทอเรส และไลโซไซม์ พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 มีกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส และไลโซไซม์มากที่สุดเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารสูตร ISP2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร ISP2 มีส่วนผสมหลักเป็น yeast extract และ malt extract (Atlas, R.M., 2010) ผสมกับน้ำทะเลธรรมชาติ และพบว่าความเค็มและความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยการเลี้ยงเชื้อที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 10 ความเค็ม 35 พีพีที สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด และพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 4 และ 6 มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยความเค็มและค่าความเป็นกรด-ด่างไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์ เอสเทอเรส และไลโซไซม์ ดังนั้นเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ดีและเหมาะสมการนำเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานต้องคำนึงถึงค่าความเป็นกรดด่างและค่าความเค็มด้วย

เชื้อแอคติโนมัยซีทสามารถเจริญและสร้างสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน จากรายงานพบว่าแหล่งของสารอาหารที่เป็นที่นิยมใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน เช่น กลูโคส แป้ง กลีเซอรอล, แหล่งไนโตรเจน เช่น แอสพาราจีน, ถั่วเหลือง, yeast extract, เปปโตน, แหล่งของแร่ธาตุอื่นๆ เช่น โซเดียมคลอไรด์ แคลเซียมคาร์บอร์เนต แมกนีเซียมซัลเฟต, โพแพสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็นต้น (Kala and Chandrika, 1993) แอคติโนมัยซีทสามารถเจริญได้ดีใน ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เป็นกลาง ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 6 – 8 เมื่อ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่ำกว่า 6 มีผลทำให้โคโลนีมีขนาดเล็กลง และไม่มีการสร้างเส้นใยอากาศเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง นอกจากนั้นยังสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 10 – 60 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิคือ 26 – 28 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกลับรายงานของ Shik และคณะ (2000) ที่รายงานว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Streptomyces* sp. NS13239 คือ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 ความเข้มข้นของ NaCl 3%

แอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีความสำคัญทางการแพทย์ เภสัชกรรมในการใช้บำบัดรักษาโรค ด้านการเกษตร ในธรรมชาติแอคติโนมัยซีทสามารถสร้างเอนไซม์ออกมาหลายชนิดเพื่อใช้ในการย่อยสายโพลิเมอร์ของซากพืช ซากสัตว์ หรือ เชื้อราที่ตายแล้ว อาทิเช่น เซลลูเลส

(cellulase) ไคติเนส (chitinase) เอสเทอร์เรส (esterase) แอคติโนมัยซีทมีบทบาทสำคัญในการกำจัดเชื้อราที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคในพืช (ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล, 2555) และในด้านสิ่งแวดล้อมใช้เป็นตัวย่อยสลายทางชีวภาพเพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีเพื่อเป็นการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม เช่น เอนไซม์เอสเทอร์เรส (Esterase) เป็นเอนไซม์ทำหน้าที่หลักในการตัดพันธะเอสเทอร์ สามารถพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ มีความสามารถในการกำจัดสารพิษ โลหะหนัก และสารกำจัดแมลงและวัชพืช โดยที่เอนไซม์จะทำการตัดพันธะเอสเทอร์หรือเร่งปฏิกิริยาทำให้ความเป็นพิษลดน้อยลง สามารถย่อยสลายสารทางชีวภาพต่อได้ นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียโดยการใช้เอนไซม์ในกลุ่มของไกลโคซิเดสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายโมเลกุลพอลิเมอร์ของน้ำตาลด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) โดยการทำลายพันธะไกลโคซิดิคของน้ำตาลสองหน่วยโมเลกุลให้หลุดออกจากกัน ส่วนใหญ่จะพบในในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การย่อยแป้งเพื่อให้เกิดน้ำตาล โดยเอนไซม์ที่จะมีช่วงการทำงานที่ช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิที่เหมาะสม การใช้เอนไซม์จะไม่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้างเหมือนการใช้สารเคมี เนื่องจากเอนไซม์จะถูกทำลายโดยจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม แต่สามารถศึกษาสภาวะที่คงตัวของเอนไซม์ได้ เพื่อผลิตและพัฒนาให้เอนไซม์สามารถทำงานได้ในช่วงสภาวะที่กว้าง รวมถึงสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ หากมีการตรึงเอนไซม์ไว้บนตัวพยุงที่เหมาะสม การใช้เอนไซม์จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ดีต่อสิ่งแวดล้อม (รัชดาภรณ์ ศรีปรางค์ โคบายาชิ, 2556)

จากการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ *Bacillus* sp. B12 ซึ่งคัดแยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานเยื่อและกระดาษ พบว่าเชื้อชนิดนี้สามารถผลิตโปรตีเอสได้สูงและค่อนข้างคงที่ในช่วง stationary phase เอนไซม์จากสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถทำงานได้ดีในช่วง ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.0 - 11.0 อุณหภูมิที่สามารถทำงานได้และเสถียรภาพอยู่ในช่วง 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส โดยสภาวะที่ทำให้มีการเจริญและผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสเลี้ยงด้วยอาหารเหลว กากถั่วเหลืองบดร้อยละ 5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง 9 อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส นาน 24 ชม. (พิมล และคณะ, 2547)

จากการคัดเลือกเชื้อ alkaliphilic *Bacillus* sp. 27 ไอโซเลท พบวาเชื้อที่ผลิตอะไมเลสที่มีคุณสมบัติยอย แปงดิบได้สูงสุดในชวงที่เปนดางคือ *Bacillus* sp. strain 8 เมื่อบมอะไมเลสจากเชื้อ strain 8 กับสารซักฟอก พบวาทำให้กิจกรรมของเอนไซมลดลง ซึ่งอาจเกิดจากสารที่อยู่ในสารซักฟอกมีผลรบกวนตอกิจกรรมเอนไซมสภาวะ ในการผลิตเอนไซมที่เหมาะสม คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เทากับ 11 และความเข้มข้นแปงมันสำปะหลังดิบร้อยละ 1.5 (w/v) การใช้แปงเปนแหลงคารบอนที่ความเข้มข้นสูง ๆ ไมทำให้การผลิตเอนไซมเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจมีสาเหตุจากปริมาณของแปงที่มากขึ้นทำให้ปริมาณออกซิเจนในน้ำเลี้ยงลดลง จุลินทรียจึงใช้ออกซิเจนที่อยู่ในอาหารได้ยากขึ้น การเจริญจึงลดลง และผลิตเอนไซมอะไมเลสได้น้อยลง หรืออาจเกิดจาก end product repression โดยน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการยอยแปงที่ความเข้มข้นแปงสูงๆไปยับยั้งการผลิตเอนไซม จากผลของระยะเวลาการผลิตเอนไซมเมื่อ *Bacillus* sp. strain 8 เจริญเติบโตมาก การผลิตอะไมเลสมากขึ้นด้วย การเจริญเติบโตและการผลิตอะไมเลสมีลักษณะแปรผันตามกัน ดังนั้นการผลิตอะไมเลสของเชื้อ *Bacillus* sp. strain 8 เปนแบบ Growth-associated enzyme ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซมอะไมเลสคือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 10 และมีเสถียรภาพดีที่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ระหวาง 6-10 และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซมคือ 60 $^{\circ}$C และมีเสถียรภาพดีที่อุณหภูมิระหวาง 30-60 $^{\circ}$C (http://www.lib.ku.ac.th/KUCONF/KC4105020.pdf)

จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 แบบ Free cell ในอาหารเหลว ISP2 ความเค็ม 17 ppt ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.2 ± 0.5 และศึกษาการกิจกรรมเอนไซม์จากเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 รายวัน เป็นเวลา 10 วัน พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส โปรติเอส และเอสเทอเรส สูงสุดอยู่วันที่ 4 ในขณะที่กิจกรรมไลโซไซม์สูงสุดอยู่วันที่ 8, 9 และ 10 ดังนั้นเวลาที่จะนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียจะอยู่ในช่วงเวลา 15 วัน เพื่อให้ครอบคลุมระยะเวลาที่เอนไซม์ ทำงานได้ดีที่สุด

จากการศึกษาผลของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เอสเทอร์เรสจากแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกพบว่าอาหารชนิด OYC ซึ่งประกอบไปด้วย ข้าวโอ๊ต yeast extract และ CMC (carboxy methyl celluose) ให้ผลดีต่อการผลิตเอสเทอร์เรสสูงที่สุดเท่ากับ 15.05 หน่วยต่อมิลลิกรัม (จีรวรรณ, 2559) ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานการวิจัยของ Gunnarsson ในปี 2003 ที่ได้ศึกษาการสร้างสาร A 40926 จากแอคติโนมัยซีทจีนัส *Nonomuraea* sp. ATCC 39727 จากการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารที่แตกต่างกัน พบว่าสร้างสารเมตาโบไลท์ต่างกัน (Gunnarsson, 2003) การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์เอสเทอร์เรสสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และประสิทธิภาพในการทำงานจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Piazza ในปี 2016 ที่ได้นำเอนไซม์เอสเทอร์เรสจากเนื้อเยื่อและซีรัมมาศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 34,37 และ 41 องศาเซลเซียสพบว่าเอนไซม์เอสเทอร์เรส สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส (Piazza, 2016) จากการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เอสเทอร์เรสพบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ในตั้งแต่ช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 4 ไปจนถึง 8 ซึ่งให้ค่าที่ดีที่สุดคือค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เอสเทอร์เรสเท่ากับ 39.289 หน่วยต่อมิลลิกรัม ส่วนในค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 4 ค่ากิจกรรมเอนไซม์เอสเทอร์เรสเท่ากับ 31.62 หน่วยต่อมิลลิกรัม และในค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 8 เท่ากับ 32.23 หน่วยต่อมิลลิกรัม แต่เลือกค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7 เป็นค่าที่เหมาะสมในการทำงาน มีความเป็นกลางไม่ได้มีความเป็นกรดหรือด่างมากเกินไป ด้วยเหตุผลที่ว่าเอนไซม์ก็คือโปรตีน ซึ่งโปรตีนจะสามารถทำงานได้ดีและมีประสิทธิภาพที่ค่าความเป็นกรด-ด่างกลางๆ (http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0936/protein-denaturation-) การศึกษาผลของเวลาต่อการผลิตเอนไซม์เอสเทอร์เรสจากเชื้อแอคติโนมัยซีทเมื่อเลี้ยงเป็นเวลาทั้งหมด 9 วัน พบการทำงานของเอนไซม์เอสเทอร์เรสมากที่สุดเมื่อเลี้ยงมา 4 วัน เท่ากับ 152.93 หน่วยต่อมิลลิกรัม เนื่องจากหลังจากวันที่ 4 อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อมีปริมาณไม่เพียงพอ ทำให้เชื้อแอคติโนมัยซีทผลิตเอนไซม์ได้น้อยลง (จีรวรรณ, 2559)

การบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

จากการศึกษาการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นองค์ประกอบ มีค่า COD 94,400 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ได้ โดยสามารถลดค่า COD ลงได้ร้อยละ 69.40±7.06 และ 69.40±7.06 ในวันที่ 11 และ 12 ซึ่งมีความแตกต่างกับชุดควบคุมที่สามารถลดค่า COD ได้เพียงร้อยละ 60.17±4.15 และ 64.97±7.92 จากการบำบัดพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิไม่เปลี่ยนแปลง ตะกอนที่ได้จากการบำบัดลดลง ค่าออกซิเจนละลายน้ำสูงขึ้น เช่นเดียวกับค่าความเค็มที่สูงขึ้น ดังนั้นค่าความเค็มที่สูงขึ้นแสดงให้เห็นว่าเชื้อนี้มีประสิทธิภาพในการผลิตเอมไซม์ที่ทนความเค็มได้ สามารถนำเชื้อดังกล่าว

ไปใช้ในอุตสาหกรรมที่มีความเค็มของน้ำเสียได้ น้ำเสียสังเคราะห์จากการศึกษาครั้ง มีแป้งมันสำปะหลังเป็นองค์ประกอบ และในเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 มีเอนไซม์อะไมเลส และเอนไซม์เซลลูเลสมีความสำคัญในการย่อยแป้ง และเส้นใย โดยเปลี่ยนแป้งและเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาล ดังนั้นจึงทำให้ค่า COD ของชุดที่ทำการศึกษามีค่าลดลง และมีค่ามากกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีเชื้อ แสดงให้เห็นประสิทธิภาพของเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ที่สามารถนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นองค์ประกอบ โดยใช้ เวลาในการบำบัด 11-12 วัน

อุตสาหกรรมมันสำปะหลังของประเทศไทย ประกอบด้วยการผลิตมันสำปะหลัง อุตสาหกรรมแปรรูปมันสำปะหลัง และอุตสาหกรรมต่อเนื่องที่ใช้ผลิตภัณฑ์จากการแปรรูป ผลผลิตหลักของอุตสาหกรรมแปรรูปมันสำปะหลัง คือมันเส้น/มันอัดเม็ด และแป้งมันสำปะหลัง แม้การส่งออกผลิตภัณฑ์หลักมีมูลค่า เพียง 47,800 ล้านบาท แต่ผลิตภัณฑ์หลักที่ใช้ในประเทศทำให้เกิดอุตสาหกรรมต่อเนื่องมูลค่ามากกว่า 300,000 ล้านบาท เช่น อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมการหมัก (ผงชูรส กรดไลซีน) และ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมมันสำปะหลัง ยังเกี่ยวข้องกับเกษตรกรมากกว่า 2.6 ล้านคน มีการจ้างงานในอุตสาหกรรมต่อเนื่องอีกกว่า 1 ล้านคน นับได้ว่าอุตสาหกรรมมันสำปะหลังมีความสำคัญต่อ ระบบเศรษฐกิจและสังคมของประเทศ (env.anamai.moph.go.th/ewtadmin/ewt/env/ewt_ ยุทธศาสตร์วิจัยและพัฒนาอุตสหกรรมมันสำปะหลังของประเทศไทย 2555-2559)

จากการศึกษาประสิทธิภาพการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังขนาดกลางและขนาดย่อม ที่มีค่าซีโอดีเท่ากับ 19,200 มก./มล. โดยใช้แบคทีเรียประจำถิ่น *Bacillus* OSH2 ที่มีความสามารถในการย่อยสลายแป้งจากน้ำเสียตัวอย่าง พบว่า *Bacillus* OSH2 มีความสามารถในการย่อยสลายแป้งในน้ำเสียสังเคราะห์ได้ดี และสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อในน้ำเสียสังเคราะห์ 100 มล. พบว่าเชื้อเจริญเติบโตได้ดีที่ pH 8 เติมโมโนโซเดียมกลูตาเมท 0.3 ก. และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 ก. เชื้อ *Bacillus* OSH2 สามารถย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังได้หมดภายใน 6 ชั่วโมง และเมื่อศึกษาในน้ำเสียจริงลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 86.67 เมื่อทดลองในถังปฏิกรณ์ระดับห้องปฏิบัติการด้วยน้ำเสียจริงแบบเติมอากาศที่ปรับสภาพน้ำเสีย มีประสิทธิภาพในการกำจัดซีโอดีได้ ร้อยละ 75.06 น้ำเสียจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังเป็นน้ำเสียที่มีสารอินทรีย์จำพวกแป้งปริมาณมาก มีค่าซีโอดีเฉลี่ยสูงถึง19,200 มก./ล.และบีโอดีเฉลี่ย14,300มก./ล. อีกทั้งยังมีไนโตรเจนและฟอสฟอรัสต่ำมาก ไม่ได้สัดส่วนที่เหมาะสมกับซีโอดี ทำให้แบคทีเรียที่อยู่ในน้ำเสียเจริญเติบโตได้ไม่ดี การย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ไม่เต็มประสิทธิภาพ (กุลยา และคณะ 2560) ซึ่งจะเห็นว่ามีหลายปัจจัยที่มีผลต่อการการบำบัดน้ำ การเจริญของเชื้อ การหาสภาวะที่เหมาะสมมีความจำเป็นเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพที่ดีที่สุด

จากการศึกษาของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ในปี พ.ศ.2540 พบว่าในการผลิตแป้งมันสำปะหลัง 1 ตัน ก่อให้เกิดน้ำเสียในปริมาณถึง 11-33 ลบ.ม. (เฉลี่ย 23 ลบ.ม./ตันผลผลิตแป้ง) แต่ในปัจจุบันมีโรงงานหลายแห่ง ที่ได้นำเทคโนโลยีสะอาด (Clean Technology, CT) เข้าใช้ในกระบวนการผลิต ทำให้ลดปริมาณแป้งสูญเสียและลดการใช้น้ำลง ทำให้ลดน้ำเสียจากกระบวนการผลิตลง เหลือประมาณ 10-15 ลบ.ม./ตันผลผลิตแป้ง ในหลายโรงงาน อย่างไรก็ตามน้ำเสียดังกล่าวยังคงมีความเข้มข้นของสารอินทรีย์ในรูปซีโอดีสูงถึง 13,000- 20,000 มก./ล.

อุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลัง เป็นอุตสาหกรรมการเกษตร ที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย ปัจจุบันประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการส่งออกแป้งมันสำปะหลังใหญ่

ที่สุดในโลก สำหรับการผลิต ในช่วง 4 ปีที่ผ่านมาของไทย (ปี 2557-2560) พบว่าประเทศไทยมีเนื้อที่เก็บเกี่ยวขยายตัวเพิ่มขึ้นร้อยละ 1.11 ต่อปี โดยเพิ่มขึ้นจาก 8.431 ล้านไร่ ในปี 2557 เป็น 8.714 ล้านไร่ ในปี 2560 ในขณะที่ผลผลิตขยายตัวเพิ่มขึ้นร้อยละ 0.09 ต่อปี โดยเพิ่มขึ้นจาก 30.022 ล้านตันในปี 2557 เป็น 30.495 ล้านตัน ในปี 2560 โดยส่วนใหญ่ผลผลิตมันสำปะหลังของไทยเข้าสู่กระบวนการแปรรูปทั้งหมด แปรรูปเป็นมันเส้น มันอัดเม็ด แป้งมันสำปะหลัง และเอทานอล เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมต่อเนื่อง เช่น อาหาร อาหารสัตว์ สารความหวาน ผงชูรส กระดาษ สิ่งทอ เป็นต้น (www.oae.go.th รายละเอียดภาวะเศรษฐกิจการเกษตร/28232/TH กองเศรษฐกิจการเกษตรระหว่างประเทศ และสำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร) ทั้งนี้ไทยถือได้ว่าเป็นผู้ผลิตและผู้ส่งออกหลักของอาเซียนและตลาดโลก โดยเป็นผู้ส่งออกมันสำปะหลังอันดับ 1 ของโลก และยังเป็นผู้ผลิตมันสำปะหลังอันดับ 1 ของอาเซียน อุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลัง เป็นอุตสาหกรรมที่มีการใช้น้ำเป็นจำนวนมาก ในการผลิตแป้งมันสำปะหลัง 1 ตัน จะก่อให้เกิดน้ำทิ้งประมาณ 10–20 ลูกบาศก์เมตร โดยมีปริมาณบีโอดี ประมาณ 55–200 กิโลกรัม ปริมาณซีโอดีประมาณ 130– 400 กิโลกรัม ปริมาณสารแขวนลอย ประมาณ 40–140 กิโลกรัม ฟอสฟอรัสทั้งหมด ประมาณ 0.2–0.6 กิโลกรัม และไนโตรเจนทั้งหมด ประมาณ 3–10 กิโลกรัม (กรมโรงงานอุตสาหกรรม. 2549: 6) นอกจากนี้ยังพบวัสดุเหลือทิ้งในรูปของแข็ง ได้แก่ เปลือก ราก และกากมันสาปะหลังอีกด้วย แนวทางหนึ่งที่สามารถแก้ปัญหามลพิษทางน้ำ จากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลัง ได้คือ การนำน้ำทิ้งจากโรงงานแป้งมันสำปะหลังที่มีสารอินทรีย์และแร่ ธาตุต่างๆ ไปเป็นอาหารของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลาย หรือใช้ประโยชน์จากสารอินทรีย์และแร่ธาตุเหล่านั้นได้และนำจุลินทรีย์นั้นไปใช้ประโยชน์อีกต่อหนึ่ง โดยอาศัยกระบวนการหมักแบบไร้อากาศ เป็นการย่อยสลาย สารอินทรีย์เพื่อให้ได้กรดอินทรีย์ ผลที่ได้จากกระบวนการหมักดังกล่าวจะให้เอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้ง ซึ่งแนวทางนี้เป็นการฟื้นฟูสภาพแวดล้อมโดยชีววิธี

น้ำเสียจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังมีค่าความเข้มข้นของสารอินทรียค่อนข้างสูง ซึ่งหากขาดการบำบัดที่ดีก็จะก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมได้ การย่อยด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) เพื่อเปลี่ยนแป้งและเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส โดยเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยทั่วไปจะผลิตจากเชื้อราและแบคทีเรีย การย่อยหรือไฮโดรไลซิสเป็นกระบวนการเปลี่ยนโพลีแซคคาไรด์ (แป้งและเซลลูโลส) เป็นน้ำตาล โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยอย่างสมบูรณ์คือ กลูโคส เอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่สิ่งมีชีวิตสร้างขึ้นเพื่อ ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาภายในเซลล์และมีความจำเพาะต่อสับสเตรท จึงทำให้มีผลข้างเคียงน้อย ทำให้ผลิตภัณฑ์ ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงและไม่ทำให้เกิดการผุกร่อนของเครื่องมือ (สิริวรรณ แก้วชิงดวง, 2554) จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดแยกจากดินตะกอนป่าชายเลน โดยเฉพาะ PL1-4, CP58-9-20, NS56-4-6 และ CP58-4-20 มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส NS56-4-6, CP58-4-20 และ CP58-9-16 มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส การนำเชื้อเหล่านี้มาพัฒนาเพื่อการบำบัดน้ำแบบชีววิธี แอคติโนมัยซีทเป็นผู้ย่อยสลายทางชีวภาพ

การบำบัดน้ำเสียโรงงานน้ำปลา

จากการทดลองบำบัดน้ำเสียของโรงงานน้ำปลา โดยใช้เชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ซึ่งน้ำเสียโรงงานน้ำปลามีค่า COD 53,066 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า ณ วันที่ 15 ของการทดลองสามารถลดค่า COD ลงได้ร้อยละ 56.28±6.03 ในชุดควบคุม และ 54.05±3.35 ในชุดการทดลอง

แสดงให้เห็นว่าแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ไม่เหมาะสมกับการนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ ของเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส และเอนไซม์เซลลูเลส มากกว่าที่มีความสำคัญในการย่อยแป้ง และเส้นใย โดยค่าความเป็นกรด – ด่าง ปริมาณโปรตีนมีค่าลดลง น้ำหนักตะกอนคงที่, ความเค็มมีค่าสูงขึ้น, อุณหภูมิไม่เปลี่ยนแปลง และค่าออกซิเจนละลายน้ำสูงขึ้น และจากการศึกษาอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อแอคติโนมัยซีท CP15-9-2, CP58-9-18 และ CP15-6-9 ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส และเอสเทอเรส ควรเลี้ยงด้วยอาหารสูตร OYC แต่ในการศึกษาครั้งนี้เชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร ISP2 จึงทำให้การบำบัดน้ำเสียจากโรงงานน้ำปลาได้ผลการบำบัดที่ไม่ดีเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ดังนั้นควรมีการศึกษาต่อไปเพื่อการใช้ประโยชน์ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานน้ำปลาที่มีประสิทธิภาพจากเชื้อ CP15-9-2, CP58-9-18 และ CP15-6-9

ในปัจจุบันแอคติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียที่กำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากจากนักวิจัยในหลากหลายด้าน ทั้งงานทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ งานทางด้านพันธุศาสตร์ รวมถึงงานทางด้านนิเวศวิทยา ซึ่งนอกจากความหลากหลายและสามารถทนอุณหภูมิสูงได้ดีกว่าแบคทีเรียทั่วไปแล้ว ยังสามารถสร้างสารเมตาโบไลท์ที่สำคัญหลายชนิด อีกทั้งสามารถหลั่งเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzymes) ได้ โดยในธรรมชาตินั้นพบว่าแอคติโนมัยซีทสามารถสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด อาทิเช่น เซลลูเลส ไคติเนส และอะไมเลส เป็นต้น เพื่อใช้ในการย่อยสายโพลิเมอร์ของซากพืช ซากสัตว์ เชื้อราที่ตายแล้ว หรือย่อยสลายวัสดุทางการเกษตร (จามจุรี และคณะ 2555) เนื่องจากแอคติโนมัยซีทมีความหลากหลายของพันธุกรรม สามารถเจริญได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีสภาวะรุนแรง เช่น สภาวะที่มีความเค็มสูง ความเป็นกรด-ด่างสูง การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ และเจริญได้ในสภาวะแห้งแล้ง (Mohammadipanah & Wink, 2016) การเลี้ยงเชื้อในอาหารและสภาวะที่แตกต่างทำให้ได้สารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีความสามารถในการทำงานแตกต่างกัน (จันทร์จรัส และคณะ, 2560) ประเทศไทยมีการนำเอนไซม์มาใช้งานในอุตสาหกรรมทางด้านอาหารเป็นจำนวนมาก ซึ่งนำมาจากทั้งในประเทศและต่างประเทศ ดังนั้นการศึกษาการผลิตเอนไซม์จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตเอนไซม์ขึ้นมาใช้เองในประเทศ สำหรับอุตสาหกรรมแปรรูป ผลิตภัณฑ์อื่นๆ แหล่งผลิตเอนไซม์ที่สำคัญได้คือจุลินทรีย์ ดังนั้นการค้นหาแหล่งผลิตใหม่จึงยังคงมีความจำเป็นและน่าสนใจทั้งในภาครัฐและเอกชน เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์สำหรับใช้ในประเทศ ซึ่งในดินตะกอน บริเวณป่าชายเลนนั้นถือเป็นแหล่งของทรัพยากรธรรมชาติที่มีความอุดมสมบูรณ์ มีความหลายทางนิเวศวิทยารวมถึงธาตุอาหารที่สำคัญในตะกอนดิน จึงน่าจะมีโอกาสค้นพบจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการเจริญได้ในสภาวะที่หลากหลายรวมถึงมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์

บทที่ 4
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

1. จากการทดสอบค่ากิจกรรมเอมไซม์ ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ของชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต ที่เลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 ความเค็ม 17 ppt. ค่าความเป็นกรดด่าง 6.2 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน พบเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6, CP58-4-20 และ CP58-9-16 แสดงค่าการทำงานเอนไซม์ อะไมเลสดีที่สุด เชื้อแอคติโนมัยซีท CP58-9-20, NS56-4-6 และ PL1-4 แสดงค่าการทำงานเอนไซม์เซลลูเลสดีที่สุด และเชื้อแอคติโนมัยซีท CP15-9-2, CP58-9-18 และ CP15-6-9 แสดงค่าการทำงานเอนไซม์โปรติเอสดีที่สุด

2. เชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6, CP58-4-20, CP58-9-16, CP58-9-20 และ PL1-4 มีศักยภาพในการพัฒนาไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานแป้งมัน หรือโรงงานที่มีวัสดุเหลือทิ้งเป็นแป้งหรือเซลลูโลส เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส และเอนไซม์เซลลูเลสที่ดี ส่วนเชื้อแอคติโนมัยซีท CP15-9-2, CP58-9-18 และ CP15-6-9 เหมาะสำหรับนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมซักล้างและอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์นม เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสดีที่สุด

3. การเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ด้วยอาหาร 5 สูตรได้แก่ ISP2, ISP2+CMC, ISP2+SS และ OYC ความเค็ม 17 ppt. ค่าความเป็นกรดด่าง 6.2 เป็นเวลา 4 วัน พบว่าเชื้อ NS56-4-6 ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร ISP2 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส และไลโซไซม์มากที่สุด เชื้อ NS56-4-6 ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร OYC สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส และเอสเทอเรส มากที่สุด

4. เชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10 ความเค็ม 35 ppt. สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้ดีที่สุด

5. เชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ที่เลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4 และ 6 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีที่สุดโดยความเค็มไม่มีผลในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส และความเค็มและค่าความเป็นกรด-ด่างไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส เอนไซม์เอสเทอเรส และไลโซไซม์

6. เชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร ISP2 มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแป้งมันเป็นองค์ประกอบได้ โดยสามารถลดค่า COD ลงได้ร้อยละ 69.40±7.06 ในวันที่ 11

7. เชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร ISP2 ไม่มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานน้ำปลา พบว่า ณ วันที่ 15 ของการทดลองค่า COD ลงได้ร้อยละ 56.28±6.03 ในชุดควบคุม และ 54.05±3.35 ในชุดการทดลอง แสดงให้เห็นว่าแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ไม่เหมาะสมกับการนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียดังกล่าว

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาครั้งนี้ ศึกษาการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแป้งมันเป็นองค์ประกอบจึงคัดเลือกเชื้อ NS56-4-6 ที่มีกิจกรรมการทำงานเอนไซม์อะไมเลสที่ดี แต่ค่าการทำงานเอนไซม์

โปรติเอสไม่ดี จึงทำให้ไม่มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานน้ำปลา ในการศึกษาต่อไปจะนำเชื้อแอคติโนมัยซีท CP15-9-2, CP58-9-18 และ CP15-6-9 ที่แสดงค่าการทำงานเอนไซม์โปรติเอสดีที่สุดมาพัฒนาหาสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส เพื่อนำไปทดสอบการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานน้ำปลาต่อไป

ผลผลิต (Output)

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ วารสารแก่นเกษตรปีที่ 47 ฉบับพิเศษ 1

ประสิทธิภาพของแอคติโนมั ยซีททะเลในการลดค่าซีโอดี ในน้ำเสียสังเคราะห์แป้งมันสำปะหลัง

Efficiency of marine actinomycetes for COD treatment in synthetic cassava starch wastewater

ณิษา สิรนนท์ธนา[1], มะลิวัลย์ คุตะโค[2], พัฒน ศิลปชัย[1] และจันทร์จรัส วัฒนะโชติ[1*]

Nisa Siranonthana[1], Maliwan Kutako[2], Pattana Sillapachai[1] and Janjarus Watanachote[1*]

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีททะเลในการลดค่าซีโอดีในน้ำเสียสังเคราะห์แป้งมันสำปะหลัง ได้ทดลองคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลส โดยคัดเลือกเชื้อจาก 30 ไอโซเลต ในอาหารเหลว ISP2 ความเค็ม 17 ppt. ค่าความเป็นกรดด่าง 6.2 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 แสดงกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลสดีที่สุด สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อคือใช้อาหารสูตร ISP2 ความเค็มและค่าความเป็นกรด-ด่างไม่ส่งผลต่อกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส สภาวะที่เหมาะในการเลี้ยงเชื้อให้ได้กิจกรรมเซลลูเลสดีคือเลี้ยงด้วยอาหาร ISP2 ที่ความเค็ม 35 ppt และค่าความเป็นกรด-ด่าง 10 เมื่อนำเชื้อไปบำบัดซีโอดีน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นองค์ประกอบ พบว่าสามารถลดค่าซีโอดีลงได้ร้อยละ 69.40 ภายในเวลา 11 วัน ดังนั้นเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 จึงมีศักยภาพที่สามารถพัฒนาไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานที่มีแป้งหรือเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ

คำสำคัญ: แอคติโนมัยซีททะเล, ความต้องการออกซิเจนทางเคมี (COD), น้ำเสียสังเคราะห์แป้งมันสำปะหลัง

ABSTRACT: In this study, efficiency of marine actinomycetes for COD treatment in synthetic cassava starch wastewater was evaluated. Screening of acinomycetes producing enzymes amylase and cellulose was performed. Thirty isolates of actinomycetes were cultured in ISP2 medium. Salinity and pH of medium was 17 ppt and 6.2, respectively. Cultures were incubated at 30°C for 4 days. The results revealed that isolate NS56-4-6 had the maximum amylase and cellulose activities. The ISP2 medium was the optimized media for enhances amylase and cellulose activities in actinomycetes isolate NS56-4-6. Amylase activity was not affected by salinity and pH. The optimal condition for culture isolate NS56-4-6 to enhanced cellulase activity was using ISP2 medium (35 ppt) and adjusted pH to 10. Thereafter, treatment of COD in synthetic cassava starch wastewater was carried out by actinomycetes isolate NS56-4-6. It was founded that COD removal of 69.40% was obtained within 11 day. This result indicated that actinomycetes isolate NS56-4-6 could be use efficiently for treatment of wastewater which consists with cassava starch or cellulose.

Keyword: marine actinomycetes, COD, cassava wastewater treatment

---

[1] สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง ชลบุรี
Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi
[2] หน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อ. ท่าใหม่ จันทบุรี
Marine Biotechnology Research Unit, Faculty of Marine Technology, Burapha University, Chanthaburi
* **Corresponding author:** janjarus@buu.ac.th

บทนำ

ประเทศไทยมีโรงงานแป้งมันสำปะหลังจำนวนมากมีผลผลิตเป็นอันดับ 3 ของโลก ผลผลิตประมาณ 22.95 ล้านตัน ในปี 2554 มีผลผลิตเฉลี่ยรวมทั้งประเทศต่อไร่ 3.05 ตัน (สวลี และคณะ, 2555) ทำให้มีน้ำเสียจำนวนมากที่ต้องบำบัด โดยในกระบวนการผลิตแป้ง 1 ตัน จะมีน้ำเสียเกิดขึ้นประมาณ 20-35 ลบ.ม. ซึ่งเป็นน้ำเสียที่มีค่าบีโอดี (BOD: Biochemical Oxygen Demand) และซีโอดี (COD: Chemical Oxygen Demand) สูงมาก (เสวียน , 2554) การบำบัดน้ำเสียมีอยู่หลากหลายวิธีการ ซึ่งมีข้อดีข้อเสียต่างกันออกไป กระบวนการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความนิยมกันอย่างแพร่หลาย โดยมีปัจจัยสำคัญในการบำบัดคือจุลินทรีย์ซึ่งทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในระบบบำบัดน้ำเสียมักมีประสิทธิภาพไม่สูงพอที่จะบำบัดน้ำเสียได้อย่างมีประสิทธิภาพ หรือบางกรณีอาจจะมีปริมาณจุลินทรีย์ไม่เพียงพอที่จะบำบัดน้ำเสียเหล่านั้น จึงต้องเติมจุลินทรีย์ให้กับระบบ (พรชนก, 2553) โดยแอคติโนมัยซีทก็เป็นอีกตัวเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากแอคติโนมัยซีทเป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์ตามธรรมชาติ อีกทั้งยังมีการผลิตเอนไซม์ที่หลากหลาย ดังนั้นงานวิจัยนี้ต้องการหาสายพันธุ์แอคติโนมัยซีทที่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการย่อยสลายน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นองค์ประกอบหลักเพื่อต้องการปรับปรุงคุณภาพน้ำเสียให้อยู่ในสภาพที่สามารถปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติได้อย่างปลอดภัย และเพื่อเป็นข้อมูลในการพัฒนาศักยภาพการบำบัดน้ำเสียในอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังต่อไป

วิธีการศึกษา

การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติในการย่อยสับสเตรตได้ดี

นำเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 30 ไอโซเลต จากตะกอนดินป่าชายเลนที่เก็บรักษาในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา เกลี่ยกระจายบนอาหารแข็ง ISP2 (Atlas, 2010) ความเค็ม 17 พีพีที ค่าความเป็นกรด – ด่าง 6.2±0.5 ให้ทั่วจานเพาะเชื้อ บ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเจาะชิ้นอาหารเลี้ยงเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. เลี้ยงในอาหารเหลว ISP2 ปริมาตร 20 มล. ที่มีความเค็ม 17 พีพีที ค่าความเป็นกรด – ด่าง 6.2±0.5 บ่มในตู้บ่มเชื้อที่มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 110 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 วัน เมื่อครบกำหนดแยกส่วนของน้ำเลี้ยงออกจากเซลล์ นำน้ำเลี้ยงวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ โดยในการวัดกิจกรรมอะไมเลสและเซลลูเลส ใช้น้ำแป้งและ Carboxymethyl cellulose (CMC) เป็นสับสเตรต ตามลำดับ (พัฒน และคณะ, 2561)

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท

การศึกษาอาหารที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมเอนไซม์

นำสายพันธุ์แอคทีโนมันซีทที่มีประสิทธิภาพจากการทดลองข้างต้น มาขีด (streak) บนอาหารแข็ง ISP2 มาเจาะชิ้นวุ้นเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. เลี้ยงในอาหารเหลวแตกต่างกัน 4 ชนิด ได้แก่ ISP2, ISP2+Starch, ISP2+CMC (Carboxymethyl cellulose) และ OYC (Oat Yeat extract Carboxymethyl cellulose) ที่มีปริมาตร 100 มล. สภาวะเช่นเดียวกับการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทข้างต้น บ่มเป็นเวลา 10 วัน และเก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อตรวจหากิจกรรมเอนไซม์

ผลของค่าความเป็นกรด – ด่าง และความเค็มต่อกิจกรรมของเอนไซม์

นำสายพันธุ์แอคทีโนมันซีทที่มีประสิทธิภาพจากการทดลองข้างต้น เลี้ยงในอาหาร ISP2 ที่มีค่า ความเป็นกรด – ด่าง แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 4.0±0.5, 6.2±0.5 และ 10±0.5 ตามลำดับ ค่าความเค็มที่แตกต่างกัน 3 ระดับ 0, 17 และ 35 พีพีที โดยเจาะชิ้นวุ้นเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มล. สภาวะเดียวกับการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทข้างต้น เก็บส่วนน้ำเลี้ยงวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ทันที โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial design)

การศึกษาอัตราการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์แป้งมันสำปะหลังโดยวัดอัตราการลดลงของค่า COD

นำสายพันธุ์แอคทีโนมันซีทที่มีประสิทธิภาพจากการทดลองข้างต้นมาใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการบำบัดน้ำเสีย โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมเป็นกลุ่มที่ไม่ใส่หัวเชื้อ โดยมีปริมาตรน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 0.5 ดัดแปลงจากวิธีของ (สุภาพร, 2559) ซึ่งคุณสมบัติคล้ายน้ำเสียจากกระบวนการผลิตแป้ง

มันสำปะหลัง ปริมาตร 4,500 มล. และอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 ปริมาตร 500 มล. กลุ่มทดสอบจะเติมหัวเชื้อ ปริมาตร 500 มล. ลงในน้ำเสีย 4,500 มล. ซึ่งการเตรียมหัวเชื้อในกลุ่มทดสอบทำได้โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร ISP2 ที่ความเค็ม 17 พีพีที ค่าความเป็นกรด – ด่าง 6.2 ± 0.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน ทั้งนี้ในระหว่างการทดลองบำบัดน้ำเสียได้เติมอากาศตลอดระยะเวลา 18 วัน และเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อวัดค่า COD (มั่นสิน, 2540), ค่าความเป็นกรด – ด่าง, น้ำตาลรีดิวซ์ (Wood and Bhat, 1988), น้ำหนักตะกอนแขวนลอย (TSS), ความเค็ม, อุณหภูมิและค่าออกซิเจนละลายน้ำทุกวัน โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD)

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลจากการทดลองคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีท การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท (ความเค็มและความเป็นกรด-ด่าง) และอัตราการบำบัด COD มาวิเคราะห์ข้อมูลสถิติโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และทำการเปรียบพหุคูณโดยวิธี Duncan's multiple rang test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยโปรแกรม R version 3.3.1 (Ihaka and Gentleman, 1996)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลการคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มีคุณสมบัติในการย่อยสับสเตรตได้ดี

จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต ในอาหารเหลว ISP2 พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 มีกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส และเซลลูเลสดีที่สุด คือ $3.33\pm0.15x10^{-2}$ และ $2.50\pm0.45\ x10^{-2}$ ยูนิต/มล. (Figure 2) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแอคติโนมัยซีททั้ง 29 ไอโซเลต ($P<0.05$) ดังนั้นจึงได้เลือกเชื้อ NS56-4-6 มาใช้ทดลองการบำบัด COD ในน้ำเสียสังเคราะห์แป้งมันสำปะหลัง ซึ่งจากงานวิจัยของรัตนาภรณ์ (2558) ที่ได้ศึกษาลักษณะของเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 พบว่าคือ *Streptomyces indiensis* ที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ (Das, 1996) และเซลลูเลสได้ (Malfait et al., 1984)

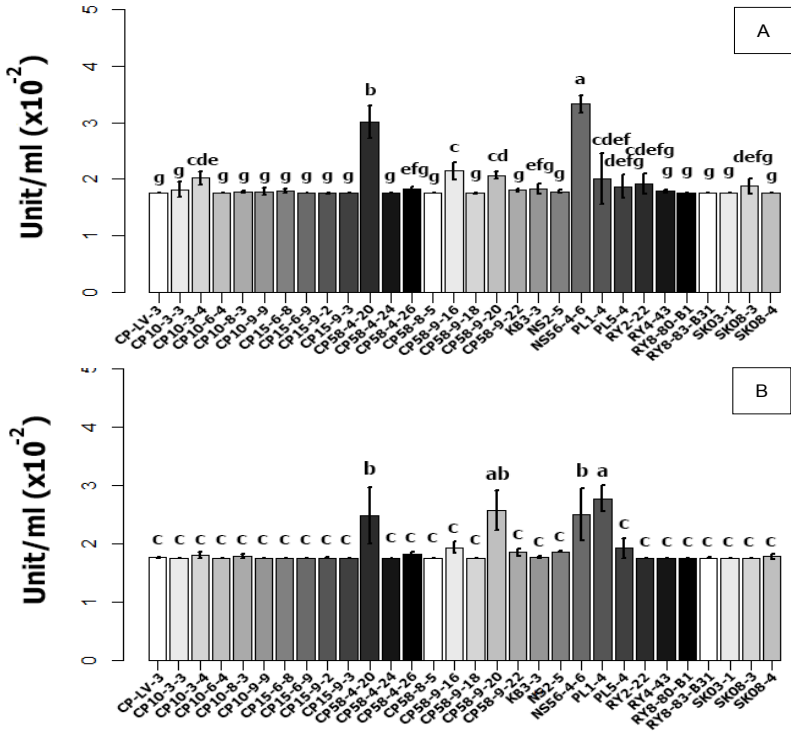
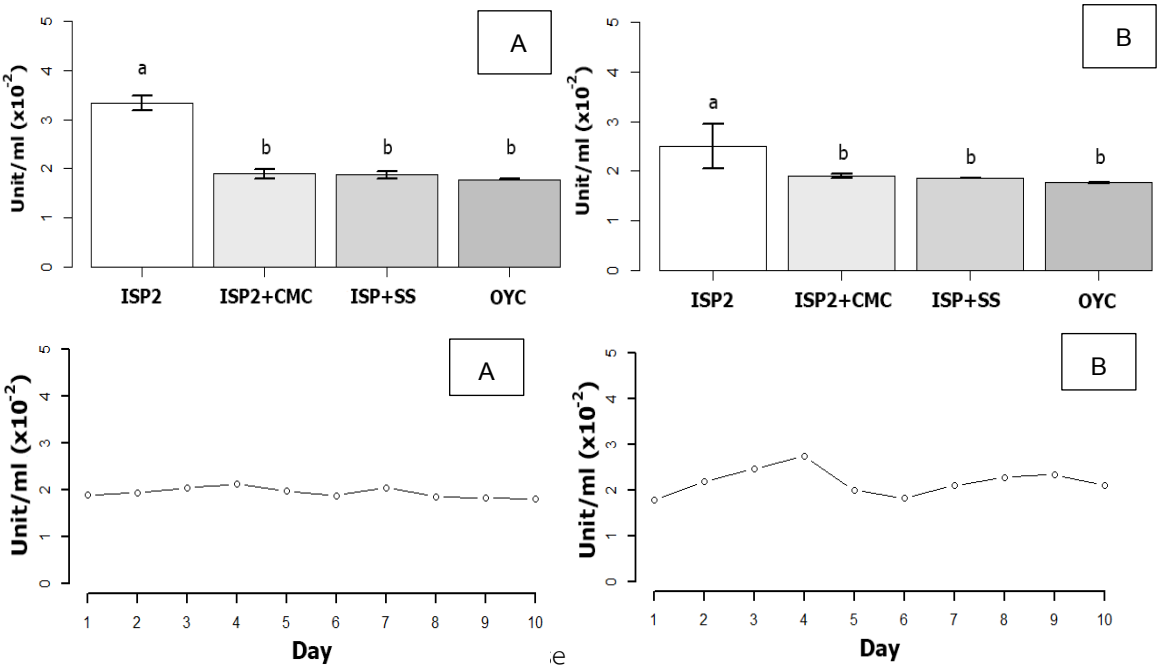


Figure 1 Amylase (A) and cellulose activities (B) from 30 isolates of actinomycetes

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6

จากการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันจำนวน 5 สูตร ได้แก่ ISP2, ISP2+CMC, ISP2+SS และ OYC เป็นเวลา 4 วัน เมื่อวัดกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลส พบว่าเชื้อแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 มีกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลส 3.33±0.15 x10^{-2} และ 2.50±0.45 x10^{-2}ยูนิต/มล. ตามลำดับ ซึ่งมีค่ามากที่สุดเมื่อใช้อาหารสูตร ISP2 (Figure 2) เนื่องจากแหล่งสับสเตรตของเอนไซม์ที่เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส และแหล่งไนโตรเจนที่สามารถช่วยกระตุ้นให้เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุด และจากการวัดกิจกรรมเอนไซม์เป็นเวลา 10 วัน พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสและเซลลูเลสมีค่าสูงสุดในวันที่ 4 (Figure 3) โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 2.13±0.02 x10^{-2} และ 2.74±0.02 x10^{-2} ยูนิต/มล. ตามลำดับ และพบว่าความเค็มและค่าความเป็นกรด-ด่างไม่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์อะไมเลส (Table 1) แต่มีผลต่อความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Table 2) โดยอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 10.0±0.5 และความเค็ม 35 พีพีที ส่งผลให้กิจกรรมเอนไซม์ดีที่สุดคือ 1.85±0.31 x10^{-2} ยูนิต/มล. ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



e

experiment

Table 1 Effects of salinity and pH on amylase activity (x10^{-2} Unit/ml) of NS56-4-6

Salinity (ppt)	pH			Average of salinity
	4.0±0.5	6.2±0.5	10.0±0.5	
0	2.04±0.21^{a}	1.96±0.08^{ab}	1.90±0.21^{ab}	1.96±0.13^{a}
17	2.02±0.17^{a}	2.05±0.14^{a}	1.89±0.17^{ab}	1.99±0.16^{a}
35	2.04±0.07^{a}	1.96±0.06^{ab}	1.77±0.04^{b}	1.93±0.13^{a}
Average of pH	2.03±0.10^{a}	1.99±0.10^{a}	1.86±0.15^{b}	

Table 2 Effects of salinity and pH on cellulase activity ($x10^{-2}$ Unit/ml) of NS56-4-6

Salinity (ppt)	pH			Average of salinity
	4.0±0.5	**6.2±0.5**	**10.0±0.5**	
0	1.58±0.07^{c}	1.58±0.06^{c}	1.69±0.04^{abc}	1.61±0.07^{a}
17	1.64±0.04^{bc}	1.66±0.03^{bc}	1.77±0.07^{ab}	1.69±0.08^{a}
35	1.65±0.08^{bc}	1.63±0.10^{abc}	1.85±0.31^{a}	1.71±0.20^{a}
Average of pH	1.62±0.07^{b}	1.62±0.07^{b}	1.77±0.18^{a}	

ผลของอัตราการบำบัดน้ำเสียสังเคราะห์โดยวัดอัตราการลดลงของ COD

น้ำเสียสังเคราะห์ที่นำมาศึกษามีค่า COD เริ่มต้นเท่ากับ 94,400 มล./ล. ผลจากการเติมเชื้อ NS56-4-6 ลงในถังปฏิกิริยาเป็นเวลา 15 วัน พบว่า ณ วันที่ 11 และ 12 เชื้อ NS56-4-6 สามารถลดค่า COD ได้ร้อยละ 69.40±7.06 และ 69.40±7.06 ตามลำดับ (Figure 4A) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับในกลุ่มควบคุมที่สามารถลดค่า COD ได้เพียงร้อยละ 60.17±4.15 และ 64.97±7.92 ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อสามารถย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาลเพื่อใช้เป็นพลังงานในการเจริญได้ ผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง พบว่าทั้งสองกลุ่มการทดลองมีแนวโน้มเป็นด่างขึ้นเรื่อยๆ ณ วันที่ 15 ค่าความเป็นกรด-ด่างในชุดควบคุมอยู่ที่ 7.47±0.02 และชุดการทดลองอยู่ที่ 7.44±0.02 และพบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มสูงขึ้นในช่วงวันที่ 2-5 ของการทดลอง หลังจากนั้นจึงลดลงและคงที่อาจเนื่องมาจากเป็นช่วงที่เชื้อมีอัตราการย่อยสลายแป้งเป็นน้ำตาลและการใช้พลังงานจากน้ำตาลเท่ากันจึงทำให้เห็นว่าน้ำตาลคงที่แต่จากผลของค่า COD พบว่ามีปริมาณลดลงในวันที่ 11 ของการทดลอง ความเค็มมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ($P>0.05$) พบว่าอุณหภูมิมีแนวโน้มไปทางเดียวกัน ($P>0.05$) ณ วันที่ 1, 9 และ 15 พบว่ามีความค่าออกซิเจนละลายน้ำแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในส่วนของน้ำหนักตะกอนมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ณ วันที่ 15 โดยมีในชุดควบคุมมีน้ำหนักตะกอน 48.70±4.76 มก./มล. ซึ่งสูงกว่าชุดทดลองที่มีค่า 37.57±2.37 มก./มล. และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการบำบัดจะมีตะกอนเกิดสะสมมากขึ้น ซึ่งตะกอนดังกล่าวอาจจะนำไปเป็นปุ๋ยสำหรับพืชได้ (Mirjana et.al, 2006) เนื่องจากยังคงมีธาตุอาหารที่เกิดจากกระบวนการบำบัดหลงเหลืออยู่ และด้วยคุณสมบัติของแอคติโนมัยซีท NS56-4-6 (*Steptomyces indiensis*) เป็นผู้ย่อยสลายตามธรรมชาติอาจมีเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการย่อยสลายสารอินทรีย์ได้ดี เช่น โปรติเอส (กิ่งจันทร์, 2555) และสามารถเจริญได้ในความเค็ม จึงอาจนำไปประยุกต์ใช้บำบัดแหล่งน้ำเสียที่เป็นประเภทโปรตีน และมีความเค็มได้ดี เช่น โรงงานน้ำปลาและซีอิ๊ว เป็นต้น ซึ่งจะได้มีการวิจัยต่อไป

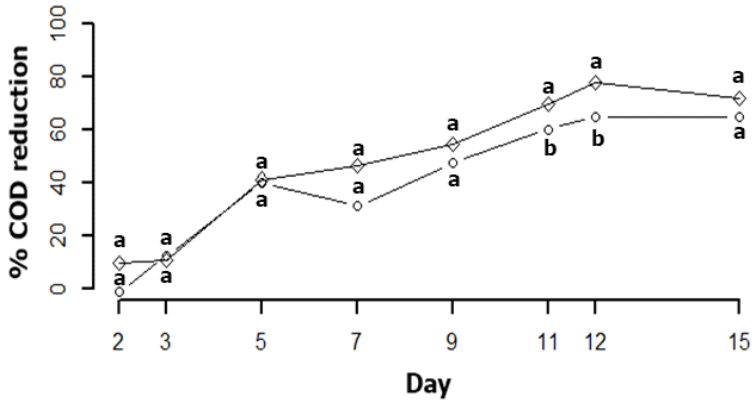


Figure 4 Percentage ...ıtrol, treatment 1

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการทดสอบค่ากิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส และเซลลูเลสของเชื้อแอคติโนมัยซีท 30 ไอโซเลต พบว่าแอคติโนมัยซีต NS56-4-6 มีกิจกรรมอะไมเลสและเซลลูเลสมากที่สุด ซึ่งกิจกรรมอะไมเลสมีค่าดีที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร ISP2 เป็นเวลา 4 วัน ความเค็มและค่าความเป็นกรด-ด่างไม่ส่งผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ และในขณะเดียวกันมีกิจกรรมเซลลูเลสดีที่สุดในอาหารสูตร ISP2 เป็นเวลา 4 วัน ความเค็ม 35 พีพีที และค่าความเป็นกรด-ด่าง 10 เมื่อนำมาใช้ในการบำบัด COD ในน้ำเสียเคราะห์แป้งมันสำปะหลัง พบว่าแอคติโนมัยซีต NS56-4-6 มีประสิทธิภาพบำบัดน้ำเสียได้ โดยสามารถลดค่า COD ลงได้ร้อยละ 69.40±7.06 ในวันที่ 11 แสดงให้เห็นว่าเชื้อนี้มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ในสภาวะที่มีความเค็มได้ และสามารถนำเชื้อดังกล่าวไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมที่ผลิตน้ำเสียที่มีความเค็มได้

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ งบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2561 สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านแผนงานวิจัย ประสิทธิภาพของแอคติโนมัยซีททะเลในการผลิตเอนไซม์เพื่อบำบัดน้ำเสีย สัญญาเลขที่ 124/2561

เอกสารอ้างอิง

กิ่งจันทร์ มะลิซ้อน. 2555. ความหลากหลายของแอคติโนแบคทีเรียในดิน. สาขาวิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.

พรชนก วงศ์ผดุงเกียรติ. 2553. จุลินทรีย์ทางการค้าในกระบวนการบำบัดน้ำเสียโรงงานปลาป่น. ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต. คณะวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พัฒน ศิลปชัย, จิรัชญา วิเศษสุทธิ์, และจันทร์จรัส วัฒนะโชติ. 2561. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์จากเชื้อแอคติโนมัยซีท BPG2-1 ที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลนเพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสีย. รายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ทางทะเล ครั้งที่ 6. 421-429.

มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์. 2540. คู่มือวิเคราะห์คุณภาพน้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์ และจันทร์จรัส วัฒนะโชติ. 2558. การพัฒนาการผลิตสารออกฤทธิ์ชีวภาพจากแอคติโนมัยซีทและการผลิตเซลล์ปริมาณมาก. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล. มหาวิทยาลัยบูรพา.

สวลี ดีประเสริฐ, ศุภชัย บุญนำมา, วิทยา บุตรทองมูล, บุปผา ชินเชิดวงศ์ และวีระ โลหะ. 2555. การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเป็นน้ำตาล. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ.3: 39-46.

สุภาพร สอาดวงศ์. 2559. การบำบัดซีโอดีในน้ำเสียสังเคราะห์โดยแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีทางทะเล, คณะเทคโนโลยีทางทะเล, มหาวิทยาลัยบูรพา.

เสวียน เปรมประสิทธิ์. 2544. การใช้ประโยชน์วัสดุเหลือใช้จากโรงงานแป้งมันสำปะหลังเพื่อผลิตปุ๋ยน้ำชีวภาพ. รายงานการวิจัย สาขาวิชาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร.

Atlas, R. M. 2010. Handbook of microbiological media fourth edition. Taylor and Francis Group, LLC.

Ihaka, R. and R. Gentleman. 1996. "R: A Language for Data Analysis and Graphics". J Comput Graph Stat. 5: 299–314.

Malfait, M., B. Godden and M.J. Penninckx. 1984. Growth and cellulose production of *Micromonospora chalcae* and *Pseudonocardia thermophile*. Ann. Inst. Pasteur. Mic. 135: 79 – 89.

Mirjana, J., R. Protic., S. Jankovic., J. Colo. 2006. Response of wheat to Azotobacter – Actinomycetes inoculation and nitrogen fertilizers. Romagric. Res. 23: 37- 42.

Wood, T. M. and K. M. Bhat. 1988. Methods for measuring cellulose activity. Method Enzymol. 160: 87 – 112.

เอกสารอ้างอิง

กรมโรงงานอุตสาหกรรม. (2549). *คู่มือการประยุกต์ใช้ ระบบสารสนเทศ เพื่อการพัฒนาประสิทธิภาพ เชิงเศรษฐนิเวศน์อุตสาหกรรมผลิตแป้งมันสำปะหลัง.* กรุงเทพฯ: กรมโรงงานอุตสาหกรรม.

กนกพร บุญนำมา. (2532). *การศึกษาการสกัดกรดฮิวมิคจากดินอินทรีย์ และการนำไปใช้ประโยชน์ในแปลงนาข้าว*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีการจัดการสิ่งแวดล้อม, คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล.

กุลยา โรจน์พานิช, นิพนธ์ ตังคณานุรักษ์ และคณิตา ตังคณานุรักษ์. (2560). การบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังด้วยแบคทีเรียท้องถิ่นที่มีประสิทธิภาพที่คัดเลือกได้จากน้ำเสีย. *Thai Journal of Science and Technology, 6*(2), 141-151.

จีรานันท์ อินทร์โพธิ์ และวชิรภัทร แคนยุกต์. (2555). *การแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทในดินที่ผลิตเอนไซม์ ในกลุ่มเซลลูเลสและเฮมิเซลูเลส*. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีวิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

จามจุรี เกตุบัวขาว และคณะ. (2555). *การคัดแยกแอคติโนมัยซีทจากมูลสัตว์เพื่อใช้ในการย่อยสลายวัสดุทางการเกษตรเบื้องต้น*ปทุมธานี . รายงานปัญหาพิเศษหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

จันทร์จรัส วัฒนะโชติ, ณิษา สิรนนท์ธนา, รวิวรรณ วัฒนดิลก และภูมิภัทร ภักดี. (2560). สภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากเชื้อ *Streptomyces parvulus* ที่แยกได้จากดินตะกอนป่าชายเลน. *แก่นเกษตร, 45*(1), 865-871.

จีรพรรณ์ ใจอินผล. (2550). *การคัดแยกแอคติโนมัยซีทจากดินในถ้ำน้ำลอดที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของฟังใจ*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ชนิกานต์ คุ้มนก. (2544). *การแยกและคัดเลือกแอคติโนมัยซีทที่สร้างสารปฏิชีวนะ.* วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม.

ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. (2555). *การควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของพริกที่มีสาเหตุจากเชื้อรา Sclerotium Rolfsii ด้วยเชื้อแอคติโนมัยซีท Streptomyces hygroscopicus PACCH24 ที่สร้างเอนไซม์ไคติเนส.* รายงานวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี.

พรเทพ ถนนแก้ว. (2538). *ภาวะเหมาะสมของการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราที่คัดแยกจากบริเวณ ปลูกปุานศรนารายณ์* . วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบันฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย . กรุงเทพมหานคร.

พิมล จำนงค์ กนก รัตนะกนกชัย และคิน เลย์ คู. (2547). การศึกษาอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก alkalotolerant *Bacillus* sp. เพื่อประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมสารซักล้าง. *วารสารวิจัยและพัฒนา มธจ., 27*(2), 227-243.

เบญจพร บัวบาน. (2542). *การผลิตและสมบัติของเอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งดิบจากเชื้อยีสต์ Saccharomycopsis* sp. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์กรุงเทพฯ.

สิริวรรณ แก้วชิงดวง. (2554). *การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จากกากมันสำ ปะหลังโดยการบำบัดขั้นต้น.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศิราภรณ์ สุขวโรทัย. (2550). *การคัดแยกแอคติโนมัยซีทที่สามารถผลิตเซลลูเลสและสารปฏิชีวนะ.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มั่นสิน ตัณฑุลเวศม์. (2540). *คู่มือวิเคราะห์คุณภาพน้ำ* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รัตนาภรณ์ ศรีวิบูลย์ และมรกต สุกโชติรัตน์. (2549). ส่วนสัดชีวภาพของแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากดินชายฝั่ง: แหล่งใหม่ของแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างสารต้านจุลินทรีย์. *วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 28*(3), 493-499.

รัชดาภรณ์ ศรีปรางค์ โคบายาชิ. (2556). *เอนไซม์และการประยุกต์ใช้.* ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.

ศศิธร ไกรฤทธิชัย. (2552). *การคัดแยกและการคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อการย่อสลายใบไม้.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, ภาควิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Aihua Liu a. (2017). Sensitive detection of maltose and glucose based on dual enzyme-displayed bacteria electrochemical biosensor. Biosensors and Bioelectronics. 25-30.

Ailton Cesar Lemes, Yanina Pavón, SandraL azzaroni, SergioRozycki, Adriano Brandelli and Susana JulianoKali. (2016). A new milk-clotting enzyme produced by *Bacillus* sp. P45 applied in cream cheese development. Food Science and Technology 66, p. 217-224.

Alpay P. (2015). Usage of immobilized papain for enzymatic hydrolysis of proteins. Journal of Molecular Catalysis B.: 56-63.

Alexander, M. (1997). Introduction to soil microbiology. Singapore: Toppan Printing Press.

Atlas, R. M. (2010). Handbook of microbiological media fourth edition. Taylor and Francis Group, LLC.

Behnood, M., Nasernejada, B., & Nikazar, M. (2014). *Biodegradation of crude oil from saline waste water using white rot fungus Phanerochaete chrysosporium*. Iran: Tehran Press.

Benimeli, C. S., Fuentes, M. S., Abate, C. M., & Amoroso, M. J. (2008). Bioremediation of lindane-contaminated soil by Streptomyces sp. M7 and its effects on Zea mays growth. *International Biodeterioration & Biodegradation, 61*, 233-239.

Berdy, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *Journal of Anitibiotics (Tokyo), 58*, 1-26.

Bitton, G. (2005). *Wastewater Microbiology*. USA.: Wiley–Liss.

Bradford, M. M. (1976). A dye binding assay for protein. *Anal. Biochem. 72*, 248-254.

Carrasco, M., P. Villarreal, S. Barahona, J. Alcaíno, V. Cifuentes and M. Baeza. (2016). Screening and characterization of amylase and cellulase activities in psychrotolerant yeasts. Microbiology. 1-9.

Castillo, M.A., Felis, N., Arago, P.G., Cuesta., & Sabater, C. (2006). Biodegradation of the herbicide diuron by streptomycetes isolated from soil. *International Biodeterioration & Biodegradation, 58*, 196-202.

Chowdhury P., Viraraghavan T., Srinivasan, A. (2010). Biological treatment processes for fish processing wastewater. *Bioresour. Technol., 101*: 439-449.

Czoch, W. P., & Mordarski, M. (1988). Actinomycete Enzymes. In: M. Goodfellow, S. T. Williams and M. Mordarski, Actinomycetes in Biotechnology. Academic Prees. San Diego. P. 219 – 283.

Dahiya N, Tewari R, Hoondal, G. S. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol, 71*, 773–782.

Dashtban M., Schraft H., & Qin W. (2009). Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *Int. J. Biol. Sci., 5*, 578–595.

Das, K., Doley, R., & Mukherjee, A. K. (2004). Purification and biochemical characterization of thermostable, alkaliphilic, extracellular α-amylase from Bacillus subtilis DM-03, a strain isolated from the traditional food of India. *Biotechnol Appl Biochem, 40*, 291–298.

Demers, N. E., & Bayne, C. J. (1997). The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Developmental and Comparative Immunology, 21*(3), 63–73.

Domingues, C. M., & Peralta, R. M. (1993). Production of amylase by soil fungi and partial biochemical characterization of amylase of selected strain (Aspergillus fumigates Fresennius). *Canadain Journal of Microbiology. 39*, 681-685.

Duan, J., Fang, H., Bing, S., Chen, J. & Jinmei, L. (2015). Simultaneous heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by bacterium Rhodococcus sp. CPZ24. *Bioresource Technology, 116*, 266–270.

Emad, M. (2011). Prospects of effective microorganisms technology in wastes treatment in Egypt. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 5*, 243-248

Goodfellow, M. (1985). The actinomycetes, In N. A. Logan (Ed), Bacterial Systematics (pp. 211-231). London: Blackwell Scientific Publications Press.

Gunnarsson. (2003). Production of the glycopeptide antibiotic A40926 by Nonomuraea sp. ATCC 39727: influence of medium composition in batch fermentation. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 150-156.

Hozzein. N., Ahmed, M., & Tawab, M. (2012). *Efficiency of some actinomycete isolates in biological treatment and removal of heavy metals from wastewater*. Saudi: Riyadh Press.

Ihaka, R. & Gentleman, R. (1996). A Language for Data Analysis and Graphics. *J Comput Graph Stat, 5*, 299–314.

Jarerat, A., & Tokiwa, Y. (2001). Degradation of poly (tetramethylene succinate) by thermophilic actinomycetes. *Biotechnology Letters, 23*, 647-651.

Jensen, P. R., Dwight, R., & Fenical, W. (1991). Distribution of actinomycetes in near-Shore tropical marine sediment. Applied and environmental Microbiology, 57, 1102-1108.

Jitesh, D. Kawedia. (2014). Asparaginase in Acute Lymphoblastic Leukemia. Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia. S14-S17.

Kyungmin, J. (2016). Pathomimetic cancer avatars for live-cell imaging of protease activity. Biochimie. 68-76.

Lazzarini A., L. Cavaletti, G. Toppo and F. Marinelli. (2000). Rare genera of Actinomycetes as Potential Producers of New Antibiotics. *Antoine van Leeuwenhoek, 78*, 399 - 405.

Mac Kenzie, C. R., Bilous, D., & Johnson, K. G. (1984). Purification and Characterization of an exo-glucanase from Streptomycs favogriseus. *Can. Journal of Microbiol, 30*, 1171 - 1178.

Mohammadipanah, F. & Wink, J. (2016). Actinobacteria from Arid and Desert Habitats: Diversity and Biological Activity. *Front Microbiol, 6*, 1-10.

Oeser, T., Wei, R., Baumgarten, T, Billig, S, Follner, C., & Zimmermann, W. (2010). High level expression of a hydrophobic poly (ethylene terephthalate)-hydrolyzing carboxylesterase from Thermobifida fusca KW3 in Escherichia coli BL21(DE3). *Journal of Biotechnology, 146*(3), 100-104.

Parales, R. E., Adamus, J. E., White, N., & May, H. D. (1994). Degradation of 1,4-dioxane by an actinomycete in pure culture. *Applied and Environmental Microbiology, 60*, 4527-4530.

Piazza Ornella. (2016). The effect of liver esterases and temperature on remifentanil degradation in vitro. International Journal of Pharmaceutics. 359-364.

Sette, L. D., de Oliveira, V. M. & Manfio, G. P. (2005). Isolation and characterization of alachlor-degrading actinomycetes from soil. *Antonie van Leeuwenhoek, 87* (2), 81-89.

Smith, H. L., & Goodner, K. (1958). DetectioIn of bacterial gelatinases by gelatin-agar plate methods. *J. Bacteriol., 76*, 662-665.

Suryanarayana, R.S.V., Saraswathi, C.R., & Dwarakanath, C.T. (1998). Studies on the utilization of fishery wastes for the production of microbiological media. In *Proceeding of the 18th symposium on fish utilization technology and marketing in the IPFC region* (Vol.62, pp. 597-635). Philippines: Indo-Pacific Fishery Commission.

Takizawa, M., Yamakawa, M., Oka, S., Tanaka, Y., Hoshino, Y., Mikami, Y., Sato, A., Fujiwara, H., Ohizumi, Y. & Kobayashi. (2005). Brasilibactin A, a cytotoxic compound from actinomycete Nocardia Brasiliensis. *Journal of Natural Products, 68*, 462-464.

Tchobanoglous, G., Theisen, H. (2004). Actinomycetes. Engineering Principles and Management Issues. McGraw Hill. 13, 19-28.

Waksman, S. A., & Lechevalier, M.A. (1967). *The Actinomycetes: A Summary of Current Knowledge.* New York: The Ronald Press Company.

William, P. (2014). Glutaminase regulation in cancer cells. a druggable chain of events. 450-457.

Wood, T. M. & Bhat, K. M. (1988). Methods for measuring cellulose activity. *Method Enzymol, 160*, 87 – 112.

Zhao, Y., Zhao, Y., Zhang, Z., Wei, Y., Wang, H., Lu, Q., Li, Y., & Wei, Z. (2017). Effect of thermo-tolerant actinomycetes inoculation on cellulose degradation and the formation of humic substances during composting. Retrieved from http://www.lib.ku.ac.th/KUCONF/KC4105020.pdf

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรอาหาร

1. สูตรอาหาร Carboxymethyl cellulose Agar (CMC Agar) ต่อปริมาตรน้ำ 1 ลิตร

(จามจุรี เกตุบัวขาว, 2555)

Carboxymethyl cellulose	5	กรัม
Yeast Extract	1	กรัม
K_2HPO_4	0.7	กรัม
KH_2HPO_4	0.3	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	กรัม
$ZnSO_4$	0.001	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับความเป็นกรด – ด่างให้เท่ากับ 7

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. สูตรอาหาร Carboxymethyl cellulose Broth (CMC Broth) ต่อปริมาตรน้ำ 1 ลิตร
(จามจุรี เกตุบัวขาว, 2555)

Carboxymethyl cellulose	5	กรัม
Yeast Extract	1	กรัม
K_2HPO_4	0.7	กรัม
KH_2HPO_4	0.3	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	กรัม
$ZnSO_4$	0.001	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับความเป็นกรด – ด่างให้เท่ากับ 7

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. สูตรอาหาร International Streptomyces Project Agar (ISP2) (มธุรส ชัยหาญ, 2557)

Malt Extract	10	กรัม
Yeast Extract	4	กรัม
Glucose	4	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
pH	7.0	

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

ภาคผนวก ข
น้ำเสีย

การเตรียมน้ำเสียสังเคราะห์ต่อปริมาตรน้ำ1 ลิตร (Duan *et al*., 2015)

กลูโคส	5.00	กรัม/ลิตร
เปปโตน	5.00	กรัม/ลิตร
$CH_3COONa \cdot 3H_2O$	7.50	กรัม/ลิตร
NH_4Cl	0.50	กรัม/ลิตร
KH_2PO_4	3.90	กรัม/ลิตร
โซเดียมคลอไรด์	5.00	กรัม/ลิตร
$CaCl_2$	5.50	กรัม/ลิตร
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5.00	กรัม/ลิตร
Na_2EDTA	63.70	กรัม/ลิตร
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	3.90	กรัม/ลิตร
$CuSO_4$	1.01	กรัม/ลิตร
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	5.06	กรัม/ลิตร
$COCl_2 \cdot 6H_2O$	1.61	กรัม/ลิตร
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	1.00	กรัม/ลิตร

ลักษณะของน้ำเสียคือ COD 643.2-1107.3 มิลลิกรัม/ลิตร;TN 29.2-36.0 มิลลิกรัม/ลิตร; NH^{4+} -N 28.1-35.1; TP 6.23-9.24 มิลลิกรัม/ลิตร; ความเค็ม 0-3% และค่า pH 7.0-7.5

ภาคผนวก ค
Standard Protein

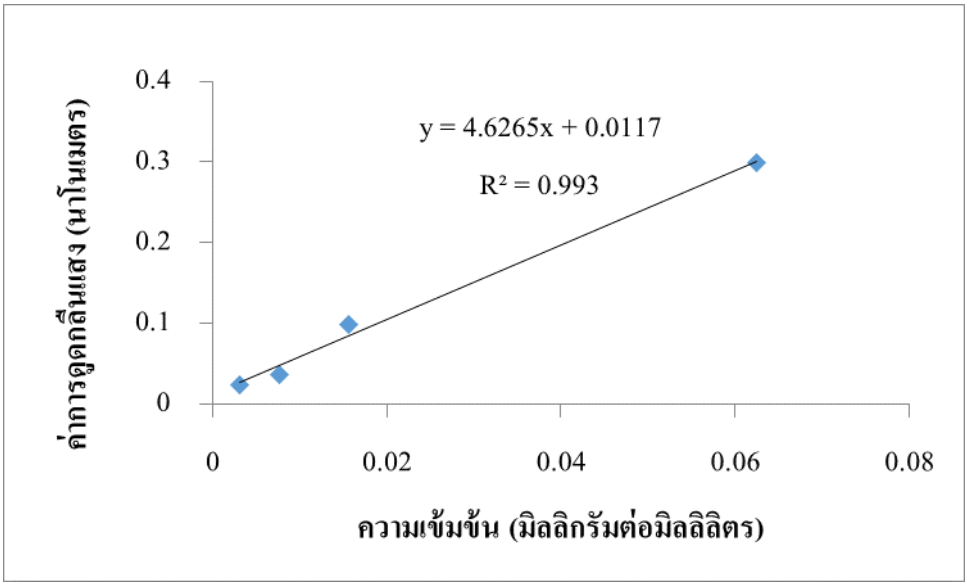
1. ความเข้มข้น 40 ไมโครลิตร

ตารางที่ ค-1 ความเข้มข้น Standard Protein 40 ไมโครลิตร

ความเข้มข้น 40 ไมโครลิตร	Average	SD	Absorbance 595		
			1	2	3
Blank	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.003	0.02	0.00	0.02	0.02	0.02
0.008	0.04	0.00	0.04	0.04	0.04
0.016	0.10	0.00	0.10	0.10	0.10
0.031	0.20	0.00	0.20	0.20	0.20
0.063	0.30	0.00	0.30	0.30	0.30
0.125	0.47	0.00	0.47	0.47	0.47
0.250	1.75	0.00	1.75	1.75	1.75
0.500	1.86	0.00	1.86	1.86	1.86

การคำนวณหาความเข้มข้นโปรตีน

ความเข้มข้นของโปรตีน= (ค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วง 595 นาโนเมตร-a)/bx



2. ความเข้มข้น 50 ไมโครลิตร

ตารางที่ ค-2 ความเข้มข้น Standard Protein 50 ไมโครลิตร

ความเข้มข้น 50 ไมโครลิตร	Average	SD	Absorbance 595		
			1	2	3
Blank	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.003	0.03	0.00	0.03	0.03	0.03
0.008	0.05	0.00	0.05	0.05	0.05
0.016	0.11	0.00	0.11	0.11	0.11
0.031	0.21	0.00	0.21	0.21	0.21
0.063	0.32	0.00	0.32	0.32	0.32
0.125	0.53	0.00	0.53	0.53	0.53
0.250	1.87	0.00	1.87	1.87	1.87
0.500	1.94	0.00	1.94	1.94	1.94

การคำนวณหาความเข้มข้นโปรตีน

ความเข้มข้นของโปรตีน= (ค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วง 595 นาโนเมตร-a)/bx