

การประเมินกิจกรรมเอนไซม์ของจุลินทรีย์กลุ่มบาซิลลัสสำหรับการย่อยสลายของเสียจากกากไขมัน

Assessment of enzyme activity of *Bacillus* spp. for grease waste biodegradation

ทิพวรรณ ประพันธ์¹, เนธิยา กรีธาชาติ¹, พิลานี ไวยถนอมสตัย² และ ต่อบงส์ กรีธาชาติ^{1*}
Tippawan Prapan¹, Nathiya Kreetachat¹, Pilanee Vaithanomsat² and Torpong Kreetachat^{1*}

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาเพื่อประเมินกิจกรรมเอนไซม์ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่พบในธรรมชาติโดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* spp. ที่พบในธรรมชาติเพื่อหาแนวทางความเป็นไปได้และการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากความหลากหลายของสายพันธุ์จุลินทรีย์ในประเทศไทย โดยทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานแปรรูปอาหารซึ่งมีการปนเปื้อนไขมันและกากไขมันมาคัดแยกและหาความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ ผลการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยา พบว่า จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* spp. โดยมีทั้งหมด 4 ไอโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง ซึ่งเมื่อทดลองนำจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* spp. ที่คัดแยกได้มาใช้สำหรับการย่อยสลายกากไขมันผ่านกระบวนการหมักทำปุ๋ยแบบเติมอากาศ เมื่อควบคุมความชื้นภายในถังหมักแบบเติมอากาศเท่ากับ 60% ภายในถังหมักบรรจุวัสดุรวมหมัก (เศษกิ่งไม้ ใบไม้ และเศษผัก) ร่วมกับกากไขมันสัดส่วน 50:50 ที่อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 4.0 ชั่วโมงต่อวัน โดยไอโซเลท 7 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเกิดขึ้นสูงสุด ปริมาณ 295.20 หน่วยต่อมิลลิลิตร และประสิทธิภาพการกำจัดไขมันผ่านกระบวนการหมักทำปุ๋ยแบบเติมอากาศ มีค่าเท่ากับ 98.29% รองลงมาคือ ไอโซเลท 4 ไอโซเลท 6 และ ไอโซเลท 1 ซึ่งมีประสิทธิภาพการกำจัดไขมันเท่ากับ 97.95% 95.88% 95.84% ตามลำดับ

คำสำคัญ : บาซิลลัส, กากไขมัน, ปุ๋ยหมัก, ไลเปส

Abstract

The purpose of this study was to utilize the local isolates of microorganism for applying in grease waste treatment in Thailand. The soil samples beside the wastewater treatment plant of food industry were taken to laboratory for isolating and defining the biodiversity. The aerated composting experiment with *Bacillus* spp. application had been conducted by mixing ratio of co-composting (yard and vegetable wastes)

¹ วิทยาลัยพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา 56000

² สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

¹ School of Energy and Environment, University of Phayao, Phayao Province 56000

² Kasetsart Agricultural and Agro-Industrial Product Improvement Institute, Kasetsart University, Bangkok 10900

* Corresponding author e-mail: torpong.kr@up.ac.th, tor_envi@hotmail.com; Received: 13 January 2012; Accepted: 30 July 2013

(บทความวิจัยเรื่องนี้ได้นำเสนอการประชุมวิชาการพะเยาวิจัย ครั้งที่ 1 ในวันที่ 12-13 มกราคม 2555 ณ มหาวิทยาลัยพะเยา)

and grease waste at 50:50 and controlling 60% moisture content. The aeration rates were investigated at 4.0 hr/day for the optimum condition of grease removal. The experimental results showed that the highest lipase production was found at Isolate 7 revealed the highest enzyme lipase production of 295.20 U/ml. Grease removal efficiency also related to lipase production at 98.29%. Followed Isolate 4 Isolate 6 and Isolate 1 which has grease removal efficiency at 97.95% 95.88% 95.84%, respectively.

Key words : *Bacillus* spp., grease waste, compost, lipase

บทนำ

โรงงานแปรรูปอาหารที่กระจายตัวอยู่ทั่วไปในชุมชนต่างๆ ของประเทศไทย มักประสบปัญหาเกี่ยวกับการกำจัดกากของเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิต ปัจจุบันพื้นที่จังหวัดพะเยามีกลุ่มโรงงานแปรรูปอาหารขนาดเล็ก (ปลาสาม) เป็นจำนวนมาก เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ OTOP ของจังหวัดพะเยา ซึ่งกระบวนการผลิตจำเป็นต้องพิจารณาถึงแนวทางในการกำจัดกากของเสียที่เกิดขึ้นเพื่อไม่ให้ส่งผลกระทบต่อชุมชน สำหรับกากของเสียจากกระบวนการผลิตนั้นส่วนใหญ่เกิดจากวัตถุดิบในการผลิต ซึ่งจะมีองค์ประกอบเป็นสารอินทรีย์และปริมาณคาร์บอนอินทรีย์ (Organic carbon) ทำให้สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมักทำปุ๋ยหมักอินทรีย์ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

มีงานวิจัยหลายชิ้นทำการศึกษาการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* spp. ในการบำบัดของเสียที่มีการปนเปื้อนจากไขมันและกากไขมัน เช่น Backer et al. (1999) ศึกษากระบวนการย่อยสลายทางชีวภาพของน้ำมันมะกอกและการบำบัดน้ำเสียจาก Wool Scouring Wastewater ที่มีปริมาณไขมัน 15-20 กรัมต่อลิตร โดยใช้แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. IHI-91 จากการทดลองพบว่าที่อัตราการบรรจุสารอินทรีย์สูงสามารถกำจัดไขมันได้ 20-30% และซีโอดีได้ 15-20% ภายในเวลา 10-20 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่ากระบวนการย่อยสลายไขมันในน้ำเสียเกิดขึ้นได้ดีที่สภาวะอุณหภูมิสูง (thermophilic)

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะคัดเลือกเชื้อ *Bacillus* spp. จากตัวอย่างดินบริเวณระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานแปรรูปอาหารที่มีการปนเปื้อนของไขมันและกากไขมันที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก

เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการกำจัดไขมันในกระบวนการหมักทำปุ๋ยแบบเติมอากาศ (composting) โดยทำการศึกษากิจกรรมของจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* spp. ที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างดิน รูปแบบที่เหมาะสมในการบำบัดโดยผ่านกระบวนการหมักทำปุ๋ย เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการบำบัดกากไขมันสูงสุด

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

งานวิจัยนี้แบ่งการทดลองเพื่อให้บรรลุตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัยได้ดังนี้

1. การคัดเลือกสายพันธุ์ *Bacillus* spp. จากตัวอย่างดินบริเวณระบบบำบัดน้ำเสียด้วยวิธี Enrichment culture โดยบ่ม (Incubate) ที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบลักษณะโคโลนีด้วยการย้อมสีแกรมใช้เทคนิค Differential stain ศึกษาลักษณะโครงสร้างของแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และทดสอบสมบัติทางชีวเคมี (การสร้างสปอร์ การเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย และ Catalase test)

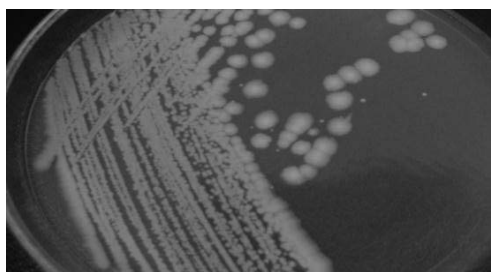
2. ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตโดยจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* spp. โดยการทดสอบเชื้อบนอาหาร Tributyrin agar เพื่อสังเกตการย่อยสลายไขมันโดยเอนไซม์ไลเปสที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น (สังเกตจาก Clear Zone) และศึกษากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* spp. ที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างดินด้วยวิธี Colorimetric method (Mohamed (2005)) ตลอดจนการย่อยสลายกากไขมันผ่านกระบวนการหมักทำปุ๋ยแบบเติมอากาศ โดยทำการเติมเชื้อแต่ละไอโซเลทที่คัดเลือกลงในถังหมัก เติมอากาศ 4.0 ชั่วโมง/วัน ความชื้น 60% และอัตราส่วนกากของเสียต่อวัสดุร่วนหมักที่ 50:50

ผลการทดลองและวิจารณ์

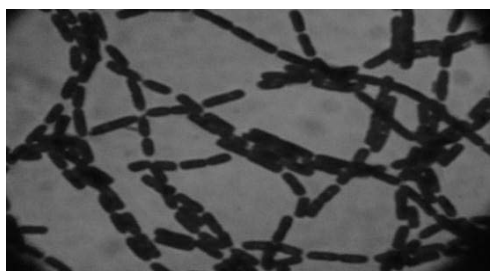
การคัดแยกสายพันธุ์ *Bacillus* spp.

ผลการคัดแยกสายพันธุ์จุลินทรีย์จากตัวอย่างดินบริเวณระบบบำบัดน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนไขมันและกากไขมันจากกระบวนการผลิต พบว่า สามารถคัดแยกสายพันธุ์จุลินทรีย์ได้ทั้งหมด 72 ไอโซเลท โดยเมื่อเทียบสมบัติตรวจสอบกับเอกสารอ้างอิงสามารถระบุได้ว่าจัดอยู่ในสกุล *Bacillus* spp. ทั้งหมด 9 ไอโซเลท ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* spp. และการย้อมติดสีม่วงน้ำเงินของ Crystal violet ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก ที่มีรูปร่างเป็นแบบท่อน (Rod shape) แสดงได้ดังภาพที่ 1(ก) และ 1(ข) ตามลำดับ

(ก)

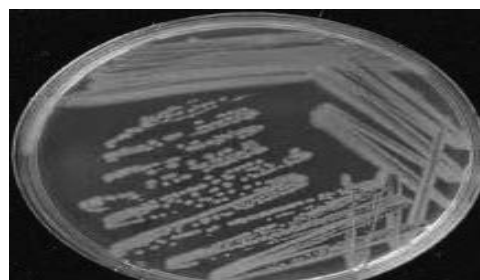


(ข)



ภาพที่ 1 (ก) ลักษณะโคโลนี และ (ข) รูปร่างเซลล์ของเชื้อ *Bacillus* spp. จากการย้อมสีแกรมจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินภายใต้กล้องจุลทรรศน์

(ก)



(ข)



ภาพที่ 2 (ก) ลักษณะโคโลนี และ (ข) รูปร่างเซลล์ของเชื้อสายพันธุ์ที่พบนอกเหนือจากเชื้อ *Bacillus* spp. จากตัวอย่างดินบริเวณที่ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นอกจากนี้ในการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินยังพบจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นนอกเหนือจากเชื้อ *Bacillus* spp. ซึ่งมีลักษณะโคโลนีกลมและมีรูปร่างเซลล์เป็นรูปท่อนสั้น ติดสีแดงของ Safranin O ซึ่งเป็นการติดสีของแบคทีเรียแกรมลบ แสดงได้ดังภาพที่ 2(ก) และ 2(ข) ตามลำดับ และสมบัติทางชีวเคมีของ *Bacillus* spp. ทั้ง 9 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณระบบบำบัดน้ำเสียที่ศึกษาได้แก่ การสร้างสปอร์ การเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย และ Catalase test แสดงได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สมบัติทางชีวเคมีของ *Bacillus* spp. ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณระบบบำบัดน้ำเสียที่ศึกษา

สายพันธุ์	รูปร่าง	Gram's Strain	Spore Strain	Motility Test	Catalase Reaction
Isolate 1	Rod	G+	-	+	+
Isolate 2	Rod	G+	-	+	+
Isolate 3	Rod	G+	+	+	+
Isolate 4	Rod	G+	-	+	+
Isolate 5	Rod	G+	-	+	+
Isolate 6	Rod	G+	+	+	+
Isolate 7	Rod	G+	-	+	+
Isolate 8	Rod	G+	-	+	+
Isolate 9	Rod	G+	+	+	+

กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* spp.

จากการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* spp. บนอาหารจำเพาะสูตร tributyrin agar โดยเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้บนอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 45 °C เวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลาง (d) ของวงใสที่ปรากฏบนผิวหน้าของอาหาร พบว่า มีจุลินทรีย์จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ *Bacillus* spp. ไอโซเลต 7 ไอโซเลต 6 ไอโซเลต 4 และ ไอโซเลต 1 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุด วัด d วงใสได้ 9.0 7.0 6.0 และ 6.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ (แสดงดังตารางที่ 2) ลักษณะวงใสที่ปรากฏบนผิวหน้าของอาหาร tributyrin agar แสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ลักษณะความกว้างของ Clear Zone ที่เกิดจากการย่อยสลายไขมันโดยเอนไซม์ไลเปสที่เชื้อ *Bacillus* spp. สร้างขึ้นบนอาหาร Tributyrin Agar

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบความกว้างของวงใสที่เกิดจากการสร้างเอนไซม์ไลเปสบนอาหาร Tributyrin Agar

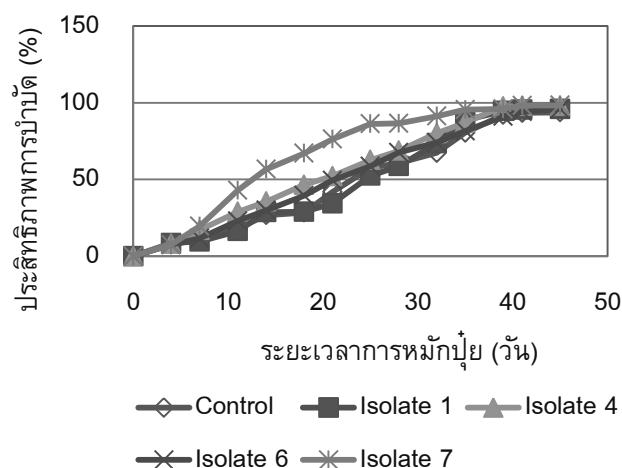
<i>Bacillus</i> spp.	ความกว้างของวงใส (มิลลิเมตร)
Isolate 1	6.0
Isolate 2	2.0
Isolate 3	4.0
Isolate 4	6.0
Isolate 5	2.0
Isolate 6	7.0
Isolate 7	9.0
Isolate 8	4.0
Isolate 9	5.0

เมื่อนำ *Bacillus* spp. ไอโซเลต 7 ไอโซเลต 6 ไอโซเลต 4 และ ไอโซเลต 1 มาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี Colorimetric method พบว่า เอนไซม์ไลเปสมีค่าเท่ากับ 295.20 Unit/mL 251.50 Unit/mL 220.10 Unit/mL และ 163.90 Unit/mL ตามลำดับ

ประสิทธิภาพการย่อยสลายของเสียจากไขมันโดย *Bacillus* spp.

การย่อยสลายกากไขมันผ่านกระบวนการหมักทำปุ๋ยแบบเติมอากาศ ทำการทดลองโดยทำการเติมเชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลต 7 ไอโซเลต 6 ไอโซเลต 4 และ ไอโซเลต 1 ในถังหมักแบบใช้ออกซิเจน โดยควบคุมการเติมอากาศ 4.0 ชั่วโมงต่อวัน ความชื้น 60% และอัตราส่วนกากของเสียต่อวัสดุรุ่มหมักที่ 50:50 พบว่า พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดไขมันที่เวลาการหมัก 45 วัน มีค่าเท่ากับ 95.84% 97.95% 95.88% และ 98.29% ตามลำดับ (แสดงดังภาพที่ 4)

โดยภายหลังกระบวนการหมักแบบเติมอากาศจะได้ปุ๋ยหมักอินทรีย์เกิดขึ้น ซึ่งจากการศึกษาธาตุอาหารหลักของปุ๋ยหมักอินทรีย์ดังกล่าวพบว่ามีปริมาณธาตุอาหารหลักเทียบเคียงได้กับค่ามาตรฐานของปุ๋ยหมักอินทรีย์ โดยสามารถวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและ โพแทสเซียม เท่ากับ 1.70 1.62 และ 1.00% ตามลำดับ



ภาพที่ 4 ประสิทธิภาพในการบำบัดกากไขมันโดยเชื้อ *Bacillus* spp. ไอโซเลต 7 ไอโซเลต 6 ไอโซเลต 4 และ ไอโซเลต 1 ในถังหมักแบบใช้ออกซิเจน

การเปรียบเทียบปริมาณธาตุอาหารของปุ๋ยอินทรีย์ภายหลังจากผ่านกระบวนการหมักแบบเติมอากาศด้วยจุลินทรีย์ *Bacillus* spp. เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของปุ๋ยอินทรีย์ทั่วไปแสดงได้ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ธาตุอาหารหลักของปุ๋ยหมักอินทรีย์ภายหลังจากกระบวนการหมักแบบเติมอากาศ

ธาตุอาหารหลัก	วัสดุ	
	ค่ามาตรฐาน	ปุ๋ยหมักอินทรีย์
ไนโตรเจน (%)	1.0	1.7
ฟอสฟอรัส (%)	0.5	1.6
โพแทสเซียม (%)	0.5	1.0
แคลเซียม (%)	ไม่กำหนด	8.2
แมกนีเซียม (%)	ไม่กำหนด	2.5
อินทรีย์คาร์บอน (%)	ไม่กำหนด	32
อินทรีย์วัตถุ (%)	30.0	55.1
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	5.5 – 8.5	6.3
ค่าการนำไฟฟ้า	6.0	5.6
C:N ratio	20:1	18.8:1

สรุปผล

จุลินทรีย์ *Bacillus* spp. ที่คัดแยกได้ทั้ง 9 ไอโซเลท พบทั้งหมด 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 7 ไอโซเลท 6 ไอโซเลท 4 และ ไอโซเลท 1 ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการย่อยสลายกากไขมันผ่านกระบวนการหมักทำปุ๋ยแบบเติมอากาศ โดยพบว่าสภาวะที่เหมาะสมได้แก่ อัตราส่วนระหว่างกากของเสียและวัสดุรวมหมักเท่ากับ 50:50 อัตราการเติมอากาศ 4.0 ชั่วโมงต่อวัน และควบคุมความชื้นที่ 60% ซึ่งในสภาวะดังกล่าว *Bacillus* spp. จะผลิตไลเปสได้สูงสุดและทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดกากไขมันเกิดขึ้นสูงสุดอีกด้วย โดยจากสภาวะดังกล่าว พบว่า *Bacillus* spp. ไอโซเลท 7 มีประสิทธิภาพการกำจัดไขมันสูงสุด มีค่าเท่ากับ 98.29% ที่ไขมันเริ่มต้น 73.60% ลดลงเหลือ 1.25% และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 295.20 Unit/mL

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณการสนับสนุนด้านงบประมาณการศึกษาจากมหาวิทยาลัยพะเยา โรงงานปลาสมัศรีทน์ บ้านสันเวียงใหม่ ตำบลบ้านสา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา สำหรับความร่วมมือในด้านข้อมูลของสถานประกอบการ และ วิทยาลัยพลังงานและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยพะเยา สำหรับเครื่องมือ-อุปกรณ์ในการศึกษาวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Castro-Ochoa, Rodríguez-Gómez C, Valerio-Alfaro G, Ros RO. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme and Microbial Technology* 2005; 37(6).
2. Eltaweel MA, RNZ, Salleh AB, Basri M. An organic solvent-stable lipase from *Bacillus* sp. strain 42. *Annals of Microbiology* 2005; 55(3): 187-192.
3. Faille C, Lequette Y, Ronse A, Slomianny C, Garénaux E, Guerardel Y. Morphology and physico-chemical properties of *Bacillus* spores surrounded or not with an exosporium: Consequences on their ability to adhere to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology*. 2010 October; 143(3): 125-135.
4. Park H-W, Delécluse A, Brian A. Federici Construction and Characterization of a Recombinant *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis strain that produces Cry11B. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2001 July; 78(1): 37-44.
5. Pinsirodom P, Parkin KL. Current Protocols in Food Analytical Chemistry C3.1.1-C3.1.; 2001.