นิพนธ์ต้นฉบับ

ปัจจัยที่มีผลต่อการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงบนกากปาล์ม

พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ [1] อรัญ หันพงศ์กิตติกูล[2] และ โสภา จันทภาโส[3]

Abstract

Prasertsan, P.[1], H-Kittikun, A.[2] and Chantaphaso, S.[3]

Factors affecting treatment of palm oil mill effluent using enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 6275

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2001, 23(Suppl.): 797-806

Powdered enzyme was produced by freeze-drying the enzyme solution extracted from 3 days culture of *Aspergillus niger* ATCC 6275 on palm cake with the addition of 0.2% glucose and 2% urea. The product yield was 38% by weight. The half-life of the enzyme was 9 months keeping at 4ºC. The enzyme was tested with decanter effluent with different characteristics from two palm oil mills. The decanter effluent possessing high suspended solid (SS) and low oil (9.5 g/l) content was selected for studying the factors affecting the separation of SS and oil as bulking solid. Results indicated that the effluent must contain oil not less than 15 g/l so that the bulking solid would occur from the reaction of the enzyme (with xylanase activity of 200 U/ml) after incubation at 40ºC for 6 h. Minimum concentrations of the enzyme from *A. niger* ATCC 6275 and

Department of Industrial Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand

[1]Ph.D.(Biotechnology), รองศาสตราจารย์, [2]Ph.D.(Biotechnology), ผู้ช่วยศาสตราจารย์, [3]วท.บ.(วิทยาศาสตร์สุขภาพสัตว์), นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: ppoonsuk@ratree.psu.ac.th

commercial xylanase (Meicellase) were 200 and 600 U/ml, respectively. The optimum pH was 4.5. Treatment of palm oil mill effluent by the enzyme from *A. niger* ATCC 6275 for 3 h under the optimum conditions resulted in 78% separation of suspended solids with oil & grease removal of 95% and COD reduction of 35%.

Key words : wastewater treatment, palm oil mill, enzyme, xylanase, palm cake

บทคัดย่อ

พูนสุข ประเสริฐสรรพ์[1] อรัญ หันพงศ์กิตติกูล[2] และ โสภา จันทภาโส[3]

ปัจจัยที่มีผลต่อการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงบนกากปาล์ม

ว.สงขลานครินทร์ วทท. 2544 23(ฉบับพิเศษ): 797-806

ผลิตเอนไซม์ผงโดยนำสารละลายเอนไซม์ที่สกัดจากการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 บนกากปาล์มที่เติมกลูโคส 0.2% และยูเรีย 2% เป็นเวลา 3 วัน มาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งได้ผลผลิตของเอนไซม์ผงปริมาณ 38% โดยน้ำหนัก เอนไซม์ผงมีแอคทิวิตี้ลดลงเหลือครึ่งหนึ่งหลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 9 เดือน ใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้ทดสอบกับน้ำทิ้งจากเครื่องแยกน้ำมันแบบดีแคนเตอร์ (decanter) ที่มีคุณลักษณะต่างกันจาก 2 โรงงาน ได้คัดเลือกน้ำทิ้งที่มีปริมาณสารแขวนลอยสูงและมีปริมาณน้ำมันต่ำ (9.5 กรัม/ลิตร) เพื่อศึกษาผลของปัจจัยต่าง ๆ ต่อการแยกสารแขวนลอยและน้ำมันในลักษณะตะกอนลอย ผลการทดลองพบว่าน้ำทิ้งต้องมีปริมาณน้ำมันไม่ต่ำกว่า 15 กรัม/ลิตร จึงจะทำให้เกิดตะกอนลอยจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ (มีค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส 200 ยูนิต/มล.) หลังการบ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ความเข้มข้นต่ำสุดของเอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 และเอนไซม์ไซลาเนสทางการค้า (Meicellase) คือ 200 และ 600 ยูนิต/มล. ตามลำดับ และระดับพีเอชที่เหมาะสมคือ 4.5 การบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสามารถแยกสารแขวนลอยลงได้ 78% แยกน้ำมันและกรีสได้ 95% และค่าซีโอดีลดลง 35%

ปริมาณวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มเพิ่มขึ้นตามปริมาณการผลิตน้ำมันปาล์มที่เพิ่มขึ้น ได้แก่ ทะลายปาล์มเปล่า เปลือกผลปาล์ม กะลาผลปาล์ม และน้ำทิ้ง ปริมาณน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่เกิดขึ้นในประเทศไทย มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.87 ลบ.เมตร/ตันทะลายปาล์มสด น้ำทิ้งมีสีน้ำตาลเข้ม มีปริมาณสารอินทรีย์สูง โดยมีค่าซีโอดี สารแขวนลอย และน้ำมันเท่ากับ 52.45, 12.48 และ 8.72 กก./ตันทะลายปาล์มสด ตามลำดับ ลักษณะเฉพาะของน้ำทิ้งจากการสกัดน้ำมันปาล์มคือ ลักษณะอิมัลชั่นซึ่งทำให้ของแข็งไม่เกิดการตกตะกอนเมื่อตั้งทิ้งไว้ รวมทั้งวิธีการทางกายภาพ (เช่น การใช้ความร้อน) และวิธีการทางเคมี (เช่น การใช้ $FeCl_3$, $Al_2(SO_4)_3$ และ $Ca(OH)_2$) (อรัญ และคณะ, 2537) สำหรับการใช้วิธีการทางชีวภาพนั้นมีงานวิจัยเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 และเอนไซม์ทางการค้าบำบัดน้ำทิ้งจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ซึ่งพบว่าเอนไซม์ทั้งสองแหล่งสามารถแยกสารแขวนลอยและน้ำมันออกจากน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในลักษณะตะกอนลอยหลังการบ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้ของเหลวส่วนที่เหลือมีปริมาณสารแขวนลอย น้ำมัน และค่าซีโอดีลดลง 99 และ 71% ตามลำดับ (Prasertsan *et al*., 1997)

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องเพื่อหาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการแยกสารแขวนลอยและน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม โดยใช้เอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 6275 บนกากปาล์มแบบอาหารแข็งเปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์ทางการค้า (Meicellase)

อุปกรณ์และวิธีการ

น้ำทิ้ง

น้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (decanter effluent) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทน้ำมันพืชบริสุทธิ์ จำกัด อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา และบริษัทเอเชียนน้ำมันปาล์ม จำกัด อ.อ่าวลึก จ.กระบี่

กากปาล์ม

กากปาล์มได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานรุ่งเรืองกิจน้ำมันพืช อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา บดกากปาล์มด้วยเครื่องบด และร่อนผ่านตะแกรงให้มีขนาดไม่เกิน 0.75 มม. (20 mesh) เก็บที่อุณหภูมิห้อง (30±2ºC)

จุลินทรีย์

Aspergillus niger ATCC 6275 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศาสตราจารย์ Susumu Oi มหาวิทยาลัยโอซาก้าซิตี้ ประเทศญี่ปุ่น

เอนไซม์

เอนไซม์ทางการค้าที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ Meicellase (Meiji Co.) ส่วนเอนไซม์ของ *A. niger* ATCC 6275 ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็งในกากปาล์มที่เติมกลูโคส 0.2% และยูเรีย 2% (Prasertsan *et al*., 1997)

การวิเคราะห์

1. การนับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา เจือจางตัวอย่างจากเชื้อเริ่มต้นด้วยน้ำกลั่นที่ผสม Tween 80 ความเข้มข้น 0.1% และผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หยดตัวอย่างบนฮีมาไซโตมิเตอร์ และนับจำนวนสปอร์จากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า ปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้ได้ 10^6 สปอร์/กรัมสับสเตรท

2. ซีโอดี ปริมาณน้ำมันและกรีส ปริมาณของแข็งทั้งหมด และปริมาณของแข็งแขวนลอย วิเคราะห์ตามวิธีที่ระบุใน APHA, AWWA and WPCF (1985)

3. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์

3.1 แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ Carboxymethylcellulase (CMCase) วิเคราะห์ตามวิธีการของ Mandel และ Weber (1969) โดยนำสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มล. ผสมกับ 0.5 มล. ของสารละลาย carboxymethylcellulose (CMC, BHD Chemical Ltd.) เข้มข้น 1.0% ในซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 บ่มที่อุณหภูมิ 50ºC เป็นเวลา 30 นาที วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี Nelson Somogyi (Nelson, 1944) ในการวิเคราะห์แอคทิวิตี้ของเอนไซม์จะมีชุดควบคุมซึ่งเติมสารละลายต่างๆ เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วแต่ไม่บ่ม นำค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุมไปหักออกจากค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากการใช้สารละลายเอนไซม์ก่อนการคำนวณหาแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ สำหรับการทดสอบไร้สิ่งตัวอย่าง (blank test) ใช้น้ำกลั่น 1 มล. แทนปริมาตรตัวอย่าง และสารละลาย CMC

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

3.2 แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส ตามวิธีการของ Tan และคณะ (1987) โดยนำสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มล. ผสมกับ 0.5 มล. ของสารละลายไซแลน (Oats spelt xylan, Sigma Chemical Ltd.) เข้มข้น 1.0% ในซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 บ่มที่อุณหภูมิ 50ºC เป็นเวลา 10 นาที แล้วหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี Nelson-Somogyi ในการวิเคราะห์มีชุดควบคุมและชุดการทดสอบไร้สิ่งตัวอย่าง (blank test) เช่นเดียวกับการหาแอคทิวิตี้ของ CMCase

1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นไซโลส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

วิธีการ

ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ผงที่เตรียมจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275

เตรียมเอนไซม์โดยเลี้ยงเชื้อ *A. niger* ATCC 6275 แบบอาหารแข็งบนกากปาล์ม (300 กรัม) ที่มีการเติมสารอาหารคือ กลูโคส 0.2% และยูเรีย 2% บรรจุในถุงพลาสติกขนาดใหญ่ (20x28 นิ้ว) ในสภาวะที่เหมาะสมคือ ความชื้นเริ่มต้นของอาหาร 60% บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2ºC) เป็นเวลา 3 วัน (Prasertsan *et al*., 1997) สกัดเอนไซม์ด้วยน้ำกลั่นที่เติม Tween 80 0.1% ในปริมาตร 5 เท่าของน้ำหนักสับสเตรท วางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที แยกไมซีเลียมโดยกรองผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น แล้วนำสารละลายที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงเพื่อกำจัดตะกอนที่หลงเหลืออยู่ นำสารละลายส่วนใสมาทำบริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นอิ่มตัว 20-80% แยกตะกอนโปรตีนโดยนำเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 7500*xg* อุณหภูมิ 4ºC เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วยสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 โดยใช้ปริมาตร 1-2 เท่าของปริมาตรตะกอน นำมาผ่านการกำจัดเกลือโดยวิธีไดแอลิซิส (dialysis) ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำเอนไซม์ที่ได้ไปทำให้แห้งโดยการเยือกแข็ง (freeze dry) และวิเคราะห์หาแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส และ CMCase ก่อนและหลังการทำให้แห้งโดยการเยือกแข็ง เก็บเอนไซม์ที่ได้ที่อุณหภูมิ 4ºC ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ผง โดยสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์แอคทิวิตี้ของไซลาเนสและ CMCase ทุกเดือนเป็นเวลา 12 เดือน

ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกสารแขวนลอยและน้ำมันออกจากน้ำทิ้งโดยใช้เอนไซม์

ปัจจัยที่ศึกษามีดังนี้

1. ผลของคุณลักษณะน้ำทิ้ง

ใช้น้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ (decanter) สองแหล่งคือ จากบริษัทน้ำมันพืชบริสุทธิ์ จำกัด จ.สงขลา และบริษัทเอเชี่ยนน้ำมันปาล์ม จำกัด จ.กระบี่ วิเคราะห์คุณลักษณะของน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ดังนี้ ค่าพีเอช ซีโอดี น้ำมันและกรีส ของแข็งแขวนลอย และของแข็งทั้งหมด ทดลองนำน้ำทิ้งทั้งสองแหล่งมาแยกสารแขวนลอยและน้ำมันโดยเติมเอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 ที่มีแอคทิวิตี้ของไซลาเนส 200 ยูนิต/มล. ลงในน้ำทิ้งในอัตราส่วน 1:1 บ่มที่อุณหภูมิ 40ºC นาน 6 ชั่วโมง สังเกตการเกิดการแยกชั้นของสารละลายผสม วิเคราะห์หาสาเหตุกรณีน้ำทิ้งไม่เกิดการแยกชั้น และใช้น้ำทิ้งดังกล่าวเพื่อศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ต่อการเกิดการแยกชั้นจากการทำงานของเอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275

2. ผลของปริมาณน้ำมันในน้ำทิ้งและระยะเวลาในการบ่ม

เติมสารละลายเอนไซม์จาก *Aspergillus niger* ATCC 6275 (แอคทิวิตี้ของไซลาเนส 200 ยูนิต/มล.) ปริมาตร 25 มล. ผสมกับ 25 มล.ของน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ ที่มีการผสมน้ำมันปาล์มลงไปในน้ำทิ้งให้มีปริมาณน้ำมันเท่ากับ 10, 15, 20, 25 และ 30 กรัม/ลิตร บรรจุสารละลายผสมในกระบอกตวงขนาด 50 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 40ºC ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ บันทึกลักษณะและปริมาตรของตะกอนที่เกิดขึ้นหลังการบ่มเป็นเวลา 1, 2, 3, 6, 9, 12 และ 14 ชั่วโมง

3. ผลของปริมาณและแหล่งของเอนไซม์

เติมสารละลายเอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 และสารละลายเอนไซม์ทางการค้า (Meicellase) ที่มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส 200, 400, 600 และ 800 ยูนิต/มล. ลงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ ที่มีปริมาณน้ำมันที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 2) ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้างต้น คัดเลือกปริมาณเอนไซม์ต่ำสุดที่สามารถแยกสารละลายผสมเป็นตะกอนลอยและสารละลายส่วนใส

4. ผลของอุณหภูมิ

เติมสารละลายเอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 ที่มีแอคทิวิตี้ของไซลาเนสที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 3) ลงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ ที่มีปริมาณน้ำมันที่เหมาะสม ในอัตราส่วน 1:1 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 40, 50, 60 และ 65ºC เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และบันทึกผล

5. ผลของพีเอชเริ่มต้น

เตรียมน้ำทิ้งให้มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.5, 4.5,

5.0, 5.5 และ 6.5 โดยปรับด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 นอร์มัล หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 6 นอร์มัล เติมเอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 ที่มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนสที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 3) ในอัตราส่วน 1:1 บรรจุสารละลายผสมในกระบอกตวงขนาด 50 มล. บ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 4) บันทึกระยะเวลาที่เกิดตะกอนลอยทั้งหมดสุ่มตัวอย่างที่เวลาเริ่มต้นและเวลาที่ตะกอนลอยขึ้นด้านบนจนปรากฏสารละลายใสด้านล่าง เก็บตัวอย่างสารละลายใส เพื่อวิเคราะห์หาค่าน้ำมัน, สารแขวนลอย ซีโอดี และแอคทิวิตี้ของไซลาเนส

ผลและวิจารณ์

ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ผงที่เตรียมจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275

จากการเลี้ยงเชื้อ *A. niger* ATCC 6275 แบบอาหารแข็งในกากปาล์ม (300 กรัม) เป็นเวลา 3 วัน และสกัดเอนไซม์ พบว่าได้สารละลายเอนไซม์ ปริมาตรทั้งหมด 30,475 มล. มีค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส และ CMCase เท่ากับ 34.75 และ 2.42 ยูนิต/มล. ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับผลการทดลองของ Prasertsan และคณะ (1997) ที่ให้ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส และ CMCase จากเชื้อเดียวกัน เท่ากับ 32.99 และ 1.71 ยูนิต/มล. ตามลำดับ และเมื่อนำสารละลายเอนไซม์สกัดมาทำบริสุทธิ์บางส่วนได้สารละลายเอนไซม์ปริมาตร 895 มล. ให้ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส และ CMCase เท่ากับ 398.67 และ 7.17 ยูนิต/มล.ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการทดลองที่ผ่านมา (291.01 และ 2.35 ยูนิต/มล. ตามลำดับ) (Prasertsan e*t al*., 1997) จากนั้นนำเอนไซม์ที่ได้ไปทำให้แห้งโดยการเยือกแข็ง ได้เป็นเอนไซม์ผงปริมาณ 114 กรัมคิดเป็น 38% ของน้ำหนักกากปาล์ม มีค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไซลาเนส และ CMCase เท่ากับ 54,480 และ 269.33 ยูนิต/กรัม ตามลำดับ

เมื่อศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ผง โดยเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4ºC เป็นเวลา 12 เดือน (Figure 1) พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวดีมากในช่วง 2 เดือนแรก โดยไม่มีการสูญเสียแอคทิวิตี้ จากนั้นแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เริ่มลดลง แต่ยังคงมีแอคทิวิตี้เหลืออยู่ประมาณ 70% หลังการ

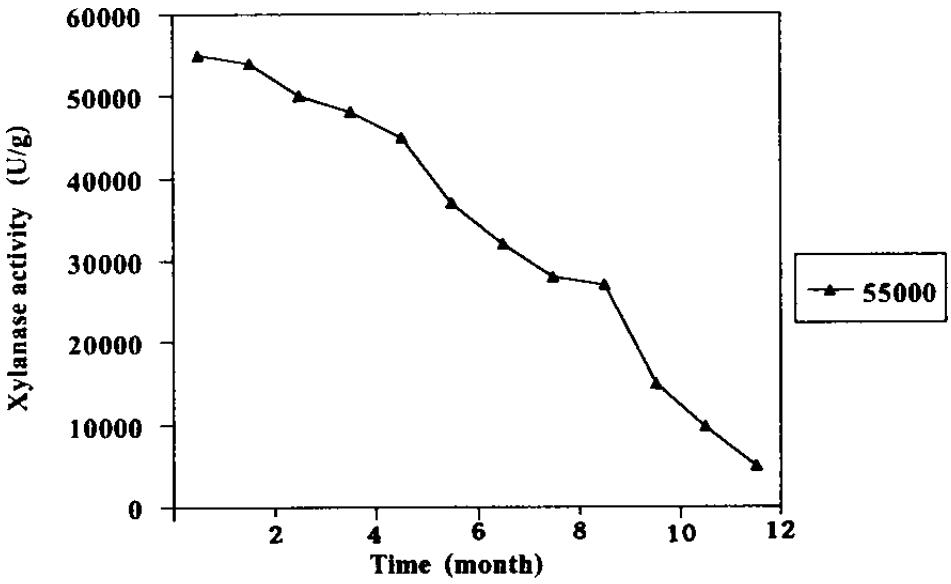

Figure 1 Stability of powdered enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 6275 during storage at 4ºC for 12 months

เก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน และเอนไซม์มีค่าแอคทิวิตี้ลดเหลือเพียงครึ่งหนึ่ง (50%) หลังการเก็บรักษาเป็นเวลา 9 เดือน และเหลือแอคทิวิตี้ประมาณ 5% เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (12 เดือน)

ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกสารแขวนลอยและน้ำมันจากน้ำทิ้งโดยใช้เอนไซม์

1. ผลของคุณลักษณะน้ำทิ้ง

ผลการวิเคราะห์ลักษณะของน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานน้ำมันปาล์ม 2 โรงงาน เปรียบเทียบกับค่าที่เคยมีรายงานมาก่อน (Table 1) พบว่าน้ำทิ้งทั้ง 2 แหล่ง มีค่าพีเอชเท่ากับ 4.5 และซีโอดีใกล้เคียงกัน (112,813 และ 132,184 มก./ลิตร) แต่น้ำทิ้งที่ได้จากบริษัทน้ำมันพืชบริสุทธิ์มีปริมาณน้ำมันและกรีส (25,500 มก./ลิตร) สูงกว่าน้ำทิ้งของบริษัทเอเชียนน้ำมันปาล์ม (9,500 มก./ลิตร) แต่มีค่าของแข็งแขวนลอย (20,520 มก./ลิตร) และของแข็งทั้งหมด (44,677 มก./ลิตร) ต่ำกว่าค่าที่ได้จากน้ำทิ้งของบริษัทเอเชี่ยนน้ำมันปาล์ม (75,530 และ 121,175 มก./ลิตร ตามลำดับ) และมีลักษณะที่ข้นหนืดสูงกว่ามาก และมีสีน้ำตาลเข้มกว่า สาเหตุอาจเนื่องจากในกระบวนการสกัดแยกน้ำมันของบริษัทเอเชียนน้ำมันปาล์ม จำกัด ไม่มีถังลอยและถังตกจมในการดักน้ำมันออกขั้นหนึ่งก่อนโดยหลังจากเข้าเครื่องหีบแบบเกลียวอัดแล้ว ของเหลว (สลัดจ์) ที่ได้จะเข้าสู่ถังพักเพื่อป้อนเข้าเครื่องดีแคนเตอร์ทันที โดยเครื่องดีแคนเตอร์ทำหน้าที่แยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งและกากตะกอน ทำให้ได้ปริมาณน้ำทิ้งน้อย น้ำทิ้งจึงมีลักษณะข้นหนืดสูง และสีน้ำตาลเข้ม (อรัญ และคณะ, 2537) เมื่อพิจารณาลักษณะของน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มเดียวกันจากรายงานต่างๆ จะเห็นว่ามีความแตกต่างกัน เนื่องจากความแตกต่างในเรื่องคุณภาพวัตถุดิบ กระบวนการผลิต กำลังการผลิต ช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างน้ำทิ้ง วิธีการดักเก็บน้ำมันของโรงงาน เป็นต้น ตัวอย่างเช่น ประมาณปี พ.ศ. 2533 บริษัทเร็กซ์อออยล์ จำกัด (ปัจจุบันคือ บริษัทน้ำมันพืชบริสุทธิ์ จำกัด) มีบ่อดักน้ำมันที่หน้าหม้อฆ่าเชื้อ เพื่อรองรับน้ำนึ่งปาล์ม โรงงานจัดให้มีคนงานคอยตักน้ำมันที่ลอยอยู่ด้านบนของบ่อดักน้ำมันออกเป็นระยะๆ ก่อนปล่อยน้ำนึ่งปาล์มไปรวมกับน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ แล้วไหลเข้าสู่บ่อบำบัดน้ำเสียรวม ทำให้น้ำมันและกรีสของน้ำทิ้งมีค่าต่ำ 4,700 มก./ลิตร เมื่อกำลังการผลิตเพิ่มขึ้น วิธีการดักเก็บน้ำมันได้เปลี่ยนแปลงไป รวมทั้งระยะเวลาที่ปล่อยให้น้ำมันแยกตัวออกก็สั้นลงด้วย ทำให้น้ำมันที่ปนไปกับน้ำทิ้งมีปริมาณสูงขึ้น

เมื่อผสมสารละลายเอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 (แอคทิวิตี้ของไซลาเนส 200 ยูนิต/มล.) กับน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ 2 แหล่ง ในอัตราส่วน 1:1 บ่มที่อุณหภูมิ 40ºC เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ที่ได้จากบริษัทน้ำมันพืชบริสุทธิ์ จำกัด ซึ่งเป็นน้ำทิ้งที่มีปริมาณของแข็งแขวนลอยต่ำกว่าแต่มีปริมาณน้ำมันและกรีสสูงกว่า เกิดการแยกชั้นเป็นตะกอนลอย ทั้งในชุดการทดลองที่เติมสารละลายเอนไซม์และชุดควบคุม (เติมน้ำกลั่นแทนเอนไซม์) ส่วนการทดลองกับน้ำทิ้งจากบริษัทเอเชียนน้ำมันปาล์ม จำกัด ซึ่งเป็นน้ำทิ้งที่มีปริมาณ

Table 1 Characteristics of effluent from different palm oil mills

Parameter	Pure Oil Co., Ltd.			Asian Palm Oil Co., Ltd.		
	This work	Prasertsan *et al.* (1990)	Maneesri (1995)	Muneesri (1996)	This work	H-Kittikun *et al.* (1994)
pH	4.5	4.6	4.5	4.7	4.5	4.6
COD	112,813	38,250	229,680	35,500	132,184	113,960
Oil & grease	25,520	4,700	31,160	24,900	9,500	14,700
Suspended solids	20,520	11,600	-	33,100	75,530	26,300
Total solids	44,677	36,440	-	53,030	121,175	-

All parameters are in mg/l except pH

ของแข็งแขวนลอยสูงแต่มีปริมาณน้ำมันและกรีสต่ำ พบว่าหลังจากเติมสารละลายเอนไซม์แล้วตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง สารละลายผสมไม่เกิดการแยกชั้นทั้งชุดที่เติมสารละลายเอนไซม์และชุดควบคุม ทั้งนี้คาดว่าสาเหตุอาจเกิดจากน้ำทิ้งดังกล่าวมีปริมาณของแข็งแขวนลอยสูงเกินไปหรือมีน้ำมันและกรีสต่ำเกินไป จึงทำให้ไม่เกิดการลอยตัวของสารแขวนลอยและน้ำมัน ดังนั้นการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้น้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของบริษัทเอเชียนน้ำมันปาล์ม เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกสารแขวนลอยและน้ำมัน

2. ผลของปริมาณน้ำมันในน้ำทิ้งและเวลาในการบ่ม

จากการเติมสารละลายเอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 (แอคทิวิตี้ของไซลาเนส 200 ยูนิต/มล.) ลงในน้ำทิ้งจาก decanter ที่มีน้ำมันปริมาณต่างๆ ในช่วง 10-30 กรัม/ลิตร (Table 2) พบว่าปริมาณน้ำมันต่ำสุดที่สามารถทำให้น้ำทิ้งเกิดการแยกชั้นเป็นตะกอนลอยและสารละลายส่วนใส (ในสภาวะที่มีสารแขวนลอยปริมาณสูง) คือ 15 กรัม/ลิตร หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 40ºC เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะเห็นว่าปริมาตรของตะกอนลอยลดลงตามระยะเวลาการบ่มที่เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลจากการจับกลุ่มกันแน่นขึ้นของสารแขวนลอยส่วนน้ำทิ้งที่มีปริมาณน้ำมัน 30 กรัม/ลิตร สารละลายผสมสามารถเกิดการแยกชั้นดังกล่าวหลังการบ่มเพียง 3 ชั่วโมง แสดงว่าปริมาณน้ำมันที่สูงขึ้น 2 เท่าจากปริมาณน้ำมันต่ำสุด สามารถลดระยะการบ่มเหลือเพียงครึ่งหนึ่ง ดังนั้นปริมาณน้ำมันในน้ำทิ้งจึงมีส่วนช่วยให้น้ำทิ้งเกิดการแยกชั้นได้เร็วขึ้น และเมื่อบ่มนาน 14 ชั่วโมง สารละลายผสมเกิดการแยกชั้นเป็นตะกอนลอยและสารละลายส่วนใสได้ 70 และ 30% ตามลำดับ ปริมาตรตะกอนลอยที่ได้จากการทดลองนี้มีค่ามากกว่าในขณะที่สารละลายส่วนใสมีปริมาตรน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของ Prasertsan และคณะ (1997) ซึ่งทดลองเติมสารละลายเอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 ลงในน้ำทิ้งที่มีปริมาณน้ำมันและกรีส 31.16 มก/ลิตร (แต่มีปริมาณของแข็งแขวนลอยต่ำกว่าการทดลองนี้) บ่มที่อุณหภูมิ 40ºC นาน 19 ชั่วโมง สารละลายผสมเกิดการแยกชั้นเป็นตะกอนลอยและสารละลายส่วนใส 33 และ 67% ตามลำดับ ความแตกต่างนี้เนื่องจากน้ำทิ้งที่ใช้ในการทดลองนี้มีปริมาณสารแขวนลอยสูงมาก ทำให้มีความข้นหนืดสูง สารแขวนลอยจะใช้ระยะเวลามากกว่าในการแยกตัวออกจากน้ำทิ้ง แต่การทดลองนี้ใช้ระยะเวลาการบ่มน้อยกว่า จึงได้ปริมาตรของสารละลายส่วนใสต่ำกว่า

3. ผลของปริมาณและแหล่งของเอนไซม์

การเติมสารละลายเอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 และเอนไซม์ทางการค้า Meicellase ที่มีแอคทิวิตี้

Table 2 Effect of oil content in the decanter effluent on the occurrence of bulking solid after the addition of enzymes* from *Aspergillus niger* ATCC 6275 and incubation at 40ºC for 14 h

Oil content	Bulking solid (%)						
(g/l)	time (h) 1	2	3	6	9	12	14
Control**	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	96	86	82	74
20	0	0	0	98	90	88	78
25	0	0	0	96	88	85	78
30	0	0	96	84	78	76	70

* Xylanase activity of the enzyme solution was 200 U/ml
** initial mixture contained 50% decanter effluent and 50% enzyme solution or 50% distilled water (control).

ของเอนไซม์ไซลาเนส 200, 400, 600 และ 800 ยูนิต/มล. ลงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ที่มีปริมาณน้ำมันและกรีส 15 มก./ลิตร (Table 3) พบว่าระดับแอคทิวิตี้ต่ำสุดของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *A. niger* ที่ทำให้สารละลายผสมเกิดการแยกชั้นคือ 200 ยูนิต/มล. โดยเกิดการแยกชั้นเป็นตะกอนลอยและสารละลายส่วนใส 84 และ 16% ตามลำดับ หลังการบ่มที่อุณหภูมิ 40ºC นาน 14 ชั่วโมง โดยค่าที่ได้ไม่แตกต่างกับการใช้เอนไซม์ที่มีแอคทิวิตี้เท่ากับ 400, 600 และ 800 ยูนิต/มล. โดยมีค่าปริมาตรของตะกอนลอย 84, 86 และ 80% ตามลำดับ และสารละลายส่วนใส 16, 14 และ 20% ตามลำดับ

ส่วนการใช้เอนไซม์ Meicellase พบว่า ระดับแอคทิวิตี้ต่ำสุดที่ทำให้เกิดตะกอนลอยคือ 600 ยูนิต/มล. โดยเกิดการแยกชั้นเป็นตะกอนลอย และสารละลายส่วนใสและตะกอนด้านล่าง 32, 34 และ 34% ตามลำดับ หลังการบ่มที่อุณหภูมิ 40ºC นาน 14 ชั่วโมง ในขณะที่แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เท่ากับ 800 ยูนิต/มล. สารละลายผสมเกิดการแยกชั้นเป็นตะกอนลอย (32%) และสารละลายส่วนใส (68%) โดยไม่มีตะกอนด้านล่างเกิดขึ้น ส่วนที่ระดับแอคทิวิตี้ 200 และ 400 ยูนิต/มล. ไม่มีตะกอนลอยเกิดขึ้น เกิดการแยกชั้นเป็น 2 ส่วน คือ สารละลายส่วนใส และตะกอนด้านล่าง โดยมีปริมาตรประมาณ 50% (Figure 2)

จากการทดลองจะเห็นว่า เอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 มีประสิทธิภาพดีกว่าเอนไซม์ทางการค้าที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 200 ยูนิต/มล. การที่เอนไซม์สามารถทำให้เกิดการแยกชั้นได้ เนื่องจากเอนไซม์ย่อยสลายสารแขวนลอย ซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่ล้อมรอบเม็ดน้ำมัน จึงทำให้เกิดการปลดปล่อยเม็ดน้ำมันออกมา ขณะเดียวกันการลอยตัวของเม็ดน้ำมันก็ทำให้สารแขวนลอยเกิดการลอยตัวขึ้นไปด้วย

4. ผลของอุณหภูมิ

การเติมสารละลายเอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 ที่มีระดับแอคทิวิตี้ของไซลาเนส 200 ยูนิต/มล. ในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีปริมาณน้ำมันและกรีส 15 กรัม/ลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30ºC) 40, 50, 55, 60 และ 65ºC โดยใช้เวลา

Table 3 Effect of concentration and source of enzyme for treatment of decanter effluent from palm oil mill after incubation at 40ºC for 14 h

Enzyme activity (Unit/ml)	Volume (%)		
	top layer (bulking solid)	bottom layer (sediment)	middle layer (liquid)
Enzyme from *A. niger* ATCC 6275			
Control	0	0	0
200	84	0	16
400	84	0	16
600	86	0	14
800	80	0	20
Meicellase			
Control	0	0	0
200	0	49	51
400	0	45	55
600	32	34	34
800	32	0	68

* initial mixture contained 50% decanter effluent and 50% enzyme solution or 50% distilled water (control).

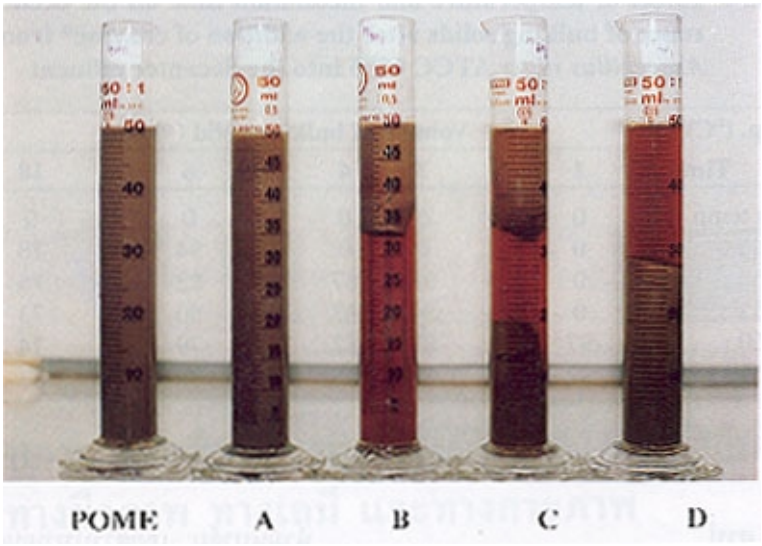

Figure 2 Effect of enzyme Meicellase on the separation of suspension of suspended solids and oil from the palm oil mill effluent (POME, 9.5 g/l oil) after incubation at 40ºC for 14 h.
A, B, C, D: POME with 15 g/l oil and mixed with distilled water, enzyme solution possessing xylanase activity of 800, 600 and 400 U/ml, respectively.

ในการบ่ม 18 ชั่วโมง พบว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 40-60ºC สารละลายผสมเกิดการแยกชั้นได้ปริมาตรของตะกอนลอยในช่วง 73-78% และสารละลายส่วนใส 22-27% ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และดีกว่าค่าที่ได้จากการบ่มที่อุณหภูมิ 65ºC ซึ่งมีค่าเท่ากับ 83 และ 17% ตามลำดับ จากการทดลองนี้อุณหภูมิที่ใช้ในช่วง 40-60ºC มีค่าใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของไซลานสคือ 55ºC (สมรักษ์, 2537) ส่วนการบ่มที่อุณหภูมิห้องซึ่งจัดเป็นชุดควบคุม พบว่าสารละลายผสมไม่เกิดการแยกชั้นแม้ว่าจะใช้เวลาในการบ่มนาน 18 ชั่วโมง

5. ผลของพีเอชเริ่มต้น

จากการเติมสารละลายเอนไซม์จาก *A. niger* ATCC 6275 ที่มีแอคทิวิตี้ 200 ยูนิต/มล. ลงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ที่มีน้ำมันและกรีส 15,000 มก./ลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นของน้ำทิ้งให้เท่ากับ 3.5, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 60ºC เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (Table 4) พบว่าน้ำทิ้งที่มีพีเอชเริ่มต้นในช่วง 4.5-5.5 เกิดการแยกชั้นได้ดีที่สุด (ได้ตะกอนลอย 78%) รองลงมาคือ ที่พีเอช 6.5 (82%) ที่พีเอชเริ่มต้น 3.5 และ 4.5 ปริมาณน้ำมันและกรีสลดลงมากที่สุดคือ 95% รองลงมาคือ ที่พีเอช 5.0 (94%) ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ Prasertsan และคณะ (1997) (99%) ส่วนการลดลงของค่าซีโอดี พบว่าที่พีเอช 4.5 ซีโอดีของน้ำทิ้งลดลงสูงสุด 35% ซึ่งต่ำกว่าค่า 71% ที่เคยมีรายงานมาก่อน (Prasertsan, *et al*., 1997) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการทดลองนี้ใช้อุณหภูมิ 60ºC ซึ่งเอนไซม์ไซลาเนสมีแอคทิวิตี้ลดลงเหลือเพียงครึ่งหนึ่งหลังการบ่มเป็นเวลา 120 นาที (สมรักษ์, 2537) จากการสังเกตพบว่าการปรับพีเอชมีผลต่อสีของน้ำทิ้ง โดยที่พีเอชสูงกว่า 5.5 น้ำทิ้งเปลี่ยนจากสีน้ำตาลเป็นน้ำตาลดำ เนื่องจากเกิดการทำปฏิกริยาของโซเดียมไฮดรอกไซด์กับเกลือของโลหะ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และทองแดงที่มีอยู่ในน้ำทิ้ง (Salunkhe and Desai, 1986)

Table 4 Effect of temperature and incubation time on the occurrence of bulking solids after the addition of enzyme* from *Aspergillus niger* ATCC 6275 into the decanter effluent

Temp. (ºC)	Volume of bulking solid (%)							
Time (h)	1	2	3	4	5	6	9	18
room temp.	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	94	87	78
50	0	98	93	87	85	83	80	75
55	0	90	84	82	80	80	78	73
60	97	87	83	82	80	79	78	74
65	97	87	86	85	84	84	84	83

* Xylanase activity was 200 unit/ml

สรุป

การผลิตเอนไซม์ผงจาก *A. niger* ATCC 6275 ที่เลี้ยงบนกากปาล์ม ได้ผลผลิต 38% (โดยน้ำหนัก) เอนไซม์ผงที่ได้มีแอคทิวิตี้ลดลงเหลือครึ่งหนึ่งหลังเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4ºC เป็นเวลา 9 เดือน ส่วนปัจจัยและค่าที่เหมาะสมต่อการแยกสารแขวนลอยและน้ำมันออกจากน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มที่มีคุณลักษณะสารแขวนลอยสูงและน้ำมันต่ำ ได้แก่ ปริมาณน้ำมัน (ค่าต่ำสุดที่ต้องการเท่ากับ 15 กรัม/ลิตร) แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ (ค่าต่ำสุดของไซลาเนส 200 ยูนิต/มล.) อุณหภูมิในการบ่ม (40-60ºC) และพีเอชเริ่มต้นของน้ำทิ้ง (พีเอช 4.5) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเหล่านี้ และที่ระยะเวลาการบ่ม 3 ชั่วโมง สามารถแยกสารแขวนลอยได้ปริมาตรของตะกอนลอย 78% แยกน้ำมันและกรีสได้ 95% ทำให้ค่าซีโอดีลดลง 35%

เอกสารอ้างอิง

สมรักษ์ พันธ์ผล. 2537. การทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสจาก *Aspergillus niger* ATCC 6275. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อรัญ หันพงศ์กิตติกูล, พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, กัลยา ศรีสุวรรณ, เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล และ วีรศักดิ์ ทองลิมป์. 2537 การศึกษาการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม: เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาการลดการสูญเสียน้ำมันในอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม วันที่ 7 เมษายน 2537 ณ ห้องเทพธานี โรงแรมสยามธานี สุราษฎร์ธานี. จัดโดย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

APHA, AWWA and WPCF. 1985. Standard Method for the Examination of Water and Wastewater. 16th ed. American Public Health Association Washington, D. C.

Mandels, W.L. and Weber, J. 1969. The production of cellulase. *In* Cellulases and Their Applications. (ed. R.E. Gould) Adv. Chem. Ser. 95. Pp. 391-398. Washington, D.C.: American Chemistry Society.

Nelson, N. 1944. A photometric adaptaion of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Bio. Chem. 153: 375-380.

Prasertsan, P., H-Kittikul, A., Kunghae, A., Maneesri and Oi, S. 1997. Optimization for xylanase and cellulase production from *Aspergillus niger* ATCC 6275 in palm oil mill wastes and its application. World J. Microbiol. Biotechnol. 13: 555-559.

Salunkhe, D.K. and Desai, B.B. 1986. Oil Palm In Post Harvest Biotechnology of Oil Seed. CRC. Press., Inc. Florida. pp 147-158.

Tan, L.U.L., Yu, E.K.C., Louis-Seize, G.W. and Saddler, J.N. 1987. Inexpensive rapid procedure for bulk puification of cellulase-free beta, 1-4, D-xylanase for high specific activity. Biotechnol. Bioeng. 30: 96-100.