**ชื่อโครงการวิจัย** การใช้ *Bacillus subtilis* A2 ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสในการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

**ชื่อนักวิจัย** อรัญ หันพงศ์กิตติกูล, พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และฉวีวรรณ มลิวัลย์

**E-mail address** aran.h @ psu.ac.th

**ระยะเวลาโครงการ** 2550-2553

## บทคัดย่อ

239838

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 พบว่าอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมประกอบด้วย CMC 10 กรัม, $KH_2PO_4$ 1.0 กรัม , $K_2HPO_4$ 1.0 กรัม, ยีสต์สกัด 4.5 กรัม, $NH_4H_2PO_4$ 4.1 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.3 กรัม และ $CaCl_2$ 0.3 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับพีเอช 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เชื้อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมีกิจกรรมสูงสุด 0.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 6 ชั่วโมง การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ขั้นต้นโดยการตกตะกอนด้วยอะซิโตน ได้เอนไซม์เซลลูเลสหยาบ 44.05 เปอร์เซ็นต์ กิจกรรมจำเพาะ 0.84 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ความบริสุทธิ์ 3.39 เท่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ได้ดีที่สุดในบัพเฟอร์พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวดีที่พีเอช 5.0 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเช่นกัน

การแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้ส่วนใสที่มีเอนไซม์เซลลูเลสจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 มีการแยกน้ำมันออกจากน้ำทิ้งได้ปริมาณน้อย ไม่เห็นความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ส่วนการทดลองที่เติมเอนไซม์เซลลูเลสหยาบซึ่งผ่านการตกตะกอนด้วยอะซิโตนมาแยกน้ำมันในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ ปริมาณตะกอนจะลดลงจาก 24.00 กรัมต่อลิตรเป็น 20.33 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำมันในตะกอนลดลงจาก 2.45 กรัมต่อกิโลกรัม เป็น 1.8 กรัมต่อกิโลกรัม ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนการใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* A2 แยกน้ำมันในน้ำทิ้ง ในกระบอกตวง 50 มิลลิลิตร พบว่าไม่สามารถแยกน้ำมันในน้ำทิ้งดีแคนเตอร์ได้

การใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ในการเจริญและแยกน้ำมันในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ โดยการเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง ชุดที่มีการเติมเชื้อจะมีปริมาณตะกอนลดลงมากที่สุด และมีปริมาณน้ำมันในส่วนใสหลังจากปั่นเหวี่ยงแยกตะกอน 0.41 กรัมต่อปริมาณน้ำทิ้ง 50 มิลลิลิตร และการเจือจางน้ำทิ้งความเข้มข้นระดับ 1:1 ให้ผลการแยกน้ำมันออกจากตะกอนดีที่สุด แต่การเติมแหล่งคาร์บอน 1 เปอร์เซ็นต์หรือแหล่งไนโตรเจน (ยีสต์สกัดและ $NH_4H_2PO_4$ 0.1 เปอร์เซ็นต์ หรือเติมร่วมกัน) ทำให้การแยกน้ำมันในน้ำทิ้งลดลง และ

การใช้น้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อสามารถแยกน้ำมันออกจากตะกอนในน้ำทิ้งได้ดีกว่าน้ำทิ้งที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

**Research project** Application of *Bacillus subtilis* A2 producing cellulase and xylanase for oil separation from palm oil mill effluent

**Researcher** Aran H-Kittikun, Poonsuk Prasertsan and Chaveewan Malewan

**E-mail address** aran.h @ psu.ac.th

## Abstract

239838

The optimal condition and medium composition for growth and cellulase production by *Bacillus subtilis* A2 were CMC 10 g, $KH_2PO_4$ 1.0 g, $K_2HPO_4$ 1.0 g, yeast extract 4.5 g, $NH_4H_2PO_4$ 4.1 g, $MgSO_4.7H_2O$ 0.3 g, $CaCl_2$ 0.3 g adjusted pH to 6.0 in 1 L distilled water and incubated at 45°C by shaking at 200 rpm. At optimal condition the bacterium produced the highest cellulose activity (0.15 U/ml) at 6 h. The primary purification of cellulase from the culture broth by precipitation with chilled acetone could recover crude cellulase 44.05% with 0.84 U/ml specific activity (3.39 purification folds). The crude cellulase had the optimal activity at pH 5.0 and 55°C and retained 80% activity at these conditions and was stable at pH 4-5 and 45°C.

The oil separation from palm oil mill effluent (POME) by the supernatant of *Bacillus subtilis* A2 culture was low and was not different from the control. When the crude cellulase was used to separate oil from the wastewater of the decanter, the amount of dry sludge was decreased from 24.00 to 20.33 g/L and the oil in sludge was reduced from 2.45 to 1.9 g/L. However, when cell culture of *Bacillus subtilis* A2 was used for oil separation, there was no oil separation.

When *Bacillus subtilis* A2 was cultivated in the wastewater from the decanter for oil separation under shaking at 200 rpm, 45°C for 72 h, the sludge dry weight was decreased and the amount of the oil in supernatant after centrifugation was increased to 0.41 g/50 ml wastewater. The treatment of wastewater with dilution 1:1 exhibited the highest oil separation from sludge. The addition of carbon (1% CMC) or nitrogen (0.1% Yeast extract and $NH_4H_2PO_4$) or combined the carbon and nitrogen source to the wastewater did not increase oil separation. When the sterilized wastewater was used to cultivated *B. subtilis* A2 under shaking condition it gave better oil separation than non sterile wastewater.