บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัสดุ

1. แบคทีเรียที่แยกได้จากดินคือ *Bacillus subtilis* A2 เป็นเชื้อที่คัดเลือกจากตัวอย่างดินข้างบ่อบำบัดน้ำเสียโรงงานสกัดน้ำมันพืชบริสุทธิ์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ CMC broth ซึ่งประกอบด้วย $CaCl_2$ 0.3 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.3 กรัม, KH_2PO_4 1.0 กรัม, K_2HPO_4 1.0 กรัม, พอลิเปปโตน 2.0 กรัม, ยีสต์สกัด 1.0 กรัม, NH_4NO_3 4.4 กรัม และ CMC 10 กรัม ในน้ำปริมาตร 1 ลิตร
3. สารละลายไซแลนเข้มข้นร้อยละ 1.0 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์
4. สารละลายคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลสเข้มข้นร้อยละ 1.0 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์
5. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0
6. สารละลาย Dinitrosalicylic acid (DNS)
7. แหล่งคาร์บอนประกอบด้วย โมลาส, น้ำตาลกลูโคส และ CMC
8. แหล่งไนโตรเจนประกอบด้วย NH_4NO_3, $NH_4H_2PO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, พอลิเปปโตน(polypeptone) และยีสต์สกัด (yeast extract)

2. อุปกรณ์

1. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ ยี่ห้อ Tomy รุ่น SS-325
2. ตู้อบลมร้อน ยี่ห้อ Sanyo รุ่น MOV 212
3. เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ A&D รุ่น HF-1200
4. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP210s
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ Orion รุ่น 420A
6. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert รุ่น W350
7. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Hitachi รุ่น SCR20B
8. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิแบบตั้งโต๊ะ ยี่ห้อ Eppendorf Centrifuge รุ่น 5415R
9. ตู้ปลอดเชื้อ ยี่ห้อ Hotpack รุ่น 527044

10. เครื่องเขย่า eppendrof ยี่ห้อ TAITEC รุ่น MBR-022UP

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส

1.1 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการ Dinitrosalicylic acid ของ Miller (1959) (Robertson *et al.*, 2001)

ดูดส่วนใสที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงเอาเซลล์ออก ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย CMC 1.0 เปอร์เซ็นต์ หรือ Xylan 1.0 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายใน PBS พีเอช 7.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรใส่ใน microcentrifuge tube จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 850 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเพื่อยับยั้งปฏิกิริยาเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดตัวอย่างที่ได้จากการทำปฏิกิริยาปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก จากนั้นเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน นำไปต้มที่น้ำเดือด เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำให้เย็นทันที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรแล้วนำค่าที่ได้มาแทนค่าในสมการมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและและเอนไซม์ไซลาเนส

1.2 การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเป็นหน่วยของเอนไซม์

กำหนดให้ 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นกลูโคสหรือไซโลส 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที โดยใช้สูตรดังนี้

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (Units/ml)} = \frac{CD}{MtV}$$

C คือ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสโดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน

D คือ ค่าการเจือจางตัวอย่างของเอนไซม์

M คือ น้ำหนักโมเลกุลของกลูโคสและไซโลส เท่ากับ 180.16 และ 150.13 กรัมต่อโมล

t คือ ระยะเวลาบ่ม (30 นาที)

V คือ ปริมาตรของเอนไซม์

2. การวัดการเจริญของเชื้อ

ตรวจวัดการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร สำหรับตัวอย่างที่มีสีเข้มจะใช้การเก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสเก็บไว้วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ละลายตะกอนก่อนนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์เป็นแบลงค์

3. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ใช้วิธี Lowry และคณะ (1951) โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

4. การหาปริมาณน้ำมันและกรีสในน้ำทิ้ง (ดัดแปลงจาก กรรณิการ์ สิริหิงห์, 2522)

นำกระดาษกรองวางใน buchner funnel แล้วเทสาร Diatomaceous-silica filter ที่เตรียมไว้ 100 มิลลิลิตร ใช้เครื่องดูดสุญญากาศดูด ล้างด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร จนกระทั่งแห้ง กรองตัวอย่างที่เตรียมไว้ แล้วดูดให้แห้ง ใช้ปากคีบกระดาษกรองออกมา ม้วนกระดาษกรองเข้าด้วยกัน แล้วห่อด้วยผ้าขาวบาง นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ใส่ตัวอย่างลงในซอคเลต เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ ลงในขวดสกัดไขมัน 150 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตาประกอบอุปกรณ์สกัด พร้อมทั้งน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่น แล้วเปิดสวิทซ์ให้ความร้อน ใช้เวลาในการสกัด 4 ชั่วโมง เมื่อครบแล้ว กลั่นเก็บสารละลายจนเหลือสารละลายในขวดสกัดเพียงเล็กน้อย นำตัวอย่างที่ใส่ในหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอคเลต นำขวดสกัดนั้นไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส จนแห้งใช้เวลาประมาณ 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณของกรีสหรือน้ำมัน (มิลลิกรัม/ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักของสารที่สกัดได้} \times 1000}{\text{มิลลิกรัมของตัวอย่าง}}$$

วิธีการวิจัย

1. การหาสภาวะการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดย *Bacillus subtilis* A2 ในอาหารสังเคราะห์

1.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

นำเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 จากกลีเซอรอล 200 ไมโครลิตร มา streak บนอาหารแข็ง CMC และเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ มาเลี้ยงในอาหาร CMC broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวัดการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

1.2 การศึกษาการเจริญและการผลิตเซลลูเลสโดย *Bacillus subtilis* A2

นำเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 มาเลี้ยงใน CMC broth 50 มิลลิลิตร โดยมีเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ 0, 6, 12, 24 และ 36 ชั่วโมง วัดการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสโดยใช้ CMC เป็นสับสเตรท

1.3 ผลของแหล่งคาร์บอน

ใช้แหล่งคาร์บอน คือ CMC โมลาสและน้ำตาลกลูโคส 1.0 เปอร์เซ็นต์แทน CMC ในอาหาร CMC broth แล้วเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ในอาหารดังกล่าวปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นถ่ายเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 ลงในอาหารที่มี CMC โมลาสและน้ำตาลกลูโคส 1.0 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 24, และ36 ชั่วโมง แล้ววัดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร นำตัวอย่างที่เวลาต่างๆ ไปเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บส่วนใสไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

1.4 ผลของแหล่งไนโตรเจน

ใช้แหล่งคาร์บอนจากข้อ 1.3 และใช้แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นรวมปริมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์ คือ NH_4NO_3, $NH_4H_2PO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, พอลิเปปโตน, ยีสต์สกัด, ยีสต์สกัด+NH_4NO_3,

ยีสต์สกัด+$NH_4H_2PO_4$, ยีสต์สกัด+$(NH_4)_2SO_4$ และยีสต์สกัด+พอลิเปปโตน+NH_4NO_3 ในอาหาร CMC broth แล้วเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 แล้วเพาะเลี้ยง และติดตามการเจริญ และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเช่นเดียวกับข้อ 1.3

1.5 ผลของพีเอช

ใช้อาหารที่เลือกจากข้อ 1.4 เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ในอาหารดังกล่าวปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นถ่ายเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่ปรับพีเอชเป็น 4.5, 5.5, 7.5 และอาหารที่ไม่ปรับพีเอช (พีเอช 6) แล้วติดตามการเจริญ และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเช่นเดียวกับข้อ 1.3

1.6 ผลของอุณหภูมิ

ใช้อาหารที่เลือกจากข้อ 1.5 เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่คัดเลือกจากได้ข้อ 1.5 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30, 45 และ 55 องศาเซลเซียส แล้วติดตามการเจริญ และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเช่นเดียวกับข้อ 1.3

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานและความคงตัวของเอนไซม์หยาบ

2.1 การทำบริสุทธิ์ขั้นต้นของเอนไซม์เซลลูเลสหยาบ

การตกตะกอนน้ำหมักที่เป็นส่วนใสจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต, อะซิโตน และเอทานอล แล้วเก็บตะกอนไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส เลือกสารตกตะกอนที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดไปตกตะกอนเอนไซม์ได้เป็นเอนไซม์หยาบ (crude enzyme) เพื่อใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์

การตกตะกอนน้ำหมักโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ โดยนำน้ำหมักที่ได้ไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ละน้อยจนหมดและมีการกวน จากนั้นวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การตกตะกอนน้ำหมักโดยใช้อะซิโตนและเอทานอลโดยใช้น้ำหมักต่ออะซิโตนหรือเอทานอลในอัตราส่วน 1:3 นำอะซิโตนหรือเอทานอลไปวางไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนน้ำหมักนำไปวางไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำน้ำหมักและอะซิ

โตนหรือเอทานอลมาผสมให้เข้ากันโดยทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

นำตะกอนที่ได้จากตัวตกตะกอนทั้ง 3 วิธี ไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยอะซิโตนหรือเอทานอล วางทิ้งไว้เพื่อระเหยอะซิโตนหรือเอทานอลออกโดยวางที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ชะตะกอนที่ได้ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ โดยเจือจางเอนไซม์หยาบที่ได้ด้วยฟอสเฟตบัพเฟอร์ในอัตราส่วนที่เหมาะสม นำเอนไซม์หยาบที่เจือจางแล้วนำไปวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเพื่อยับยั้งปฏิกิริยาเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดตัวอย่างที่ได้จากการทำปฏิกิริยาปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน นำไปต้มที่น้ำเดือดเป็นเวลา 30 นาที แล้วทำให้เย็นทันที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

2.2 ศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสหยาบ

โดยวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมธิลเซลลูเลสในสารละลายบัฟเฟอร์ต่างชนิดกัน ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีพีเอชต่างๆ คือ พีเอช 4.0, 5.0 และ 6.0 โดยใช้ซิเตรตบัฟเฟอร์ และพีเอช 7.0 และ 8.0 โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ นำเอนไซม์หยาบที่ได้จากการตกตะกอนด้วยตัวตกตะกอนที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1 มาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ ในอัตราส่วนที่เหมาะสม จากนั้นนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

2.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสหยาบ

โดยวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ที่ย่อยคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส ที่อุณหภูมิ 37, 45, 55 และ 60 องศาเซลเซียส นำเอนไซม์หยาบที่มีค่ากิจกรรมสูงสุดที่พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 มาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 ในอัตราส่วนที่เหมาะสม จากนั้นนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

2.4 ศึกษาผลของความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์เซลลูเลสหยาบ

โดยบ่มเอนไซม์เซลลูเลสในสารละลายบัฟเฟอร์ต่างชนิดกัน ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีพีเอชต่างๆ คือ 4.0, 5.0 และ 6.0 โดยใช้ซิเตรตบัฟเฟอร์ และพีเอช 7.0 และ 8.0 โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ นำเอนไซม์หยาบที่ได้จากการตกตะกอนด้วยตัวตกตะกอนที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1 มาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ ในอัตราส่วนที่เหมาะสม นำเอนไซม์หยาบที่เจือจางแล้วไปบ่มที่

อุณหภูมิ 37 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

2.5 ศึกษาผลของความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์เซลลูเลสหยาบ

โดยบ่มเอนไซม์คาร์บอกซีเมธิลเซลลูเลสที่อุณหภูมิ 37, 45, 55, และ 60 องศาเซลเซียส นำเอนไซม์หยาบที่ได้จากการตกตะกอนด้วยตัวตกตะกอนที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1 มาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอช 5.0 ในอัตราส่วนที่เหมาะสม นำเอนไซม์หยาบที่เจือจางแล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 37, 45, 55 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 3 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส

3. การแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* A2

3.1 การแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากส่วนใส

นำน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 35 มิลลิลิตร เติมด้วยเอนไซม์เซลลูเลสจากส่วนใสของการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ซึ่งส่วนใสมีกิจกรรมเซลลูเลส 0.32 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 มิลลิตร (ชุดควบคุมเติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37, 45 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการณ์การแยกชั้นและการเกิดตะกอน แล้วเก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์หาน้ำหนักตะกอนและปริมาณน้ำมันในตะกอน โดยนำส่วนผสมที่ได้ไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสออก นำตะกอนที่ได้ไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักตะกอนแห้ง จากนั้นนำตะกอนแห้งไปหาปริมาณน้ำมันด้วยวิธีการสกัดโดยซอคเลต (ดัดแปลงจาก กรรณิการ์ สิริหิงห์, 2522)

3.2 การแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสหยาบ

นำน้ำทิ้งดีแคนเตอร์จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 5 มิลลิลิตร เติมด้วยเอนไซม์เซลลูเลสหยาบจากเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ซึ่งผ่านการตกตะกอนด้วยสารตกตะกอนที่เหมาะสม โดยเอนไซม์ที่มีกิจกรรม 15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิตร (ชุดควบคุมเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เก็บที่เวลา 0, 1 และ 2 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักตะกอนแห้ง จากนั้นนำตะกอนแห้งไปหาปริมาณน้ำมันด้วยวิธีการสกัดโดยซอคเลต (ดัดแปลงจาก กรรณิการ์ สิริหิงห์, 2522) นำไปชั่งหาน้ำหนักหาปริมาณน้ำมันในตะกอน

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.3 การแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งดีแคนเตอร์จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* A2

นำน้ำทิ้งดีแคนเตอร์จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 45 มิลลิลิตร โดยทำการทดลอง 3 ชุด ดังนี้ ชุดแรกเป็นชุดควบคุมโดยเติมอาหารที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ ชุดที่สองเติมส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 และชุดที่สามเติมอาหารที่มีเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในกระบอกตวงปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อเชื้อจุลินทรีย์ (45 องศาเซลเซียส) บ่มเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง สังเกตการแยกชั้นและการเกิดตะกอน แล้วเก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์หาน้ำหนักตะกอนและปริมาณน้ำมันในตะกอน โดยนำส่วนผสมที่ได้ไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสออก นำตะกอนที่ได้ไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักตะกอนแห้ง จากนั้นนำตะกอนที่แห้งแล้วมาใส่ในผ้าขาวบางเพื่อหาปริมาณน้ำมันด้วยวิธีการสกัดโดยซอคเลต(ดัดแปลงจาก กรรณิการ์ สิริหิงห์, 2522)

4. ศึกษาการใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ในการเจริญและแยกน้ำทิ้ง

4.1 ผลของเวลา

โดยเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสตามวิธีวิจัยข้อ 1 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นถ่ายเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในน้ำทิ้งจากเครื่องดีแคนเตอร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 6.0 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำไปวัดค่าพีเอช น้ำมันในน้ำทิ้ง น้ำหนักตะกอน และปริมาณน้ำมันในตะกอน โดยชุดควบคุมจะไม่เติมเชื้อ

4.2 ผลของการเจือจางน้ำต่อการแยกน้ำมันในน้ำทิ้ง ศึกษาการเลี้ยง *Bacillus subtilis* A2ในน้ำทิ้งที่ทำการเจือจางน้ำทิ้งต่อน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:0, 1:1, 1:2 และ 1:3

4.3 ผลของแหล่งคาร์บอน โดยเลี้ยงเชื้อในน้ำทิ้งที่ได้จากสภาวะในข้อที่ 4.2 โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดจากข้อ 1.3 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

4.4 ผลของแหล่งไนโตรเจน เลี้ยงเชื้อในน้ำทิ้งโดยใส่แหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดตามข้อ 1.4 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

4.5 ผลการฆ่าเชื้อ โดยเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อในน้ำทิ้งจากข้อ 4.4 โดยใช้น้ำทิ้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

5. ศึกษาการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งที่โรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

เลือกสภาวะที่เหมาะสมที่ดีสุดในการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโดยใช้เอนไซม์ตามข้อ 3.2 หรือการใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* A2 ข้อ 4.5 นำไปทดลองที่โรงงานในขนาด 20 ลิตร และ 100 ลิตร