บทที่ 4

วิธีการทดลอง

4.1 การเตรียมสารละลาย

4.1.1 สารละลายสำหรับหาอัลคาไลน์โปรติเอสแอคติวิตี

- สารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 10.5

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 21.2 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1 ลิตร และโซเดียมไบคาร์บอเนต 16.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บเป็น stock solution ผสมสารละลายของโซเดียมคาร์บอเนต 202.5 มิลลิลิตร กับโซเดียมไบคาร์บอเนต 47.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงในสารละลายบัฟเฟอร์จนครบ 1 ลิตร นำไปปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 10.5

- สารละลายเคซีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ pH 10.5

ชั่งเคซีนแฮมเมอร์สเตน 0.5 กรัม ละลายในสารละลาย คาร์บอเนต – ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 10.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คนจนเคซีนละลายหมด นำไปปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 10.5 เก็บรักษาในตู้เย็นก่อนนำไปใช้

- สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก 10 เปอร์เซ็นต์

ชั่งกรดไตรคลอโรอะซิติก 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในขวดสีชา เก็บในตู้เย็นก่อนนำไปใช้

- สารละลายไทโรซีนมาตรฐาน 200 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร

ชั่ง L- tyrosine 0.020 กรัม ละลายในสารละลายคาร์บอเนต – ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ คนจนละลายหมด ถ่ายใส่ขวดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ จนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4.1.2 สารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของลอวรี (Lowry method)

สารละลาย A : สารละลายคอปเปอร์ (II) ซัลเฟต 1.0 เปอร์เซ็นต์

ชั่ง คอปเปอร์ (II) ซัลเฟต 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย B : สารละลายโซเดียมโพแตสเซียมทาร์เทรต 2.0 เปอร์เซ็นต์

ชั่งโซเดียมโพแตสเซียมทาร์เทรต 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย C : สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมลาร์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 8.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

สารละลาย D : สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 4.0 เปอร์เซนต์

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 4 กรัม นำไปละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย E : สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์

ประกอบด้วยสารละลาย C 49 มิลลิลิตร สารละลาย D 49 มิลลิลิตร สารละลาย A 1 มิลลิลิตร และสารละลาย B 1 มิลลิลิตร โดยผสมใหม่ทุกครั้งก่อนจะนำไปใช้

สารละลาย F : สารละลาย Folin-Ciocalteu 10 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (Standard Protein solution)

ละลาย Bovine serum albumin (BSA) 10 มิลลิกรัม ด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.1.3 สารละลายสำหรับทดสอบโปรตีนโดยวิธีไบยูเร็ต (Biuret test)

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 กรัม ละลายน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

- สารละลายไบยูเร็ต (Biuret reagent)

ชั่ง คอปเปอร์ (II) ซัลเฟต 1.5 กรัม โซเดียมโพแตสเซียมทาร์เทรต 6 กรัม และ โพแตสเซียมไอโอไดด์ (KI) 1.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ จำนวน 300มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บรักษาสารละลายไว้ในขวดพลาสติกทึบแสง

4.1.4 สารละลายสำหรับหาปริมาณไนโตรเจนโดยวิธี Kjeldahl (ASTM D 2868-70)

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 45 เปอร์เซ็นต์

ชั่ง โซเดียมไฮดรอกไซด์ 450 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1 ลิตร

- สารละลายกรดบอริก 4 เปอร์เซ็นต์

ชั่งกรดบอริก 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

- สารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต 80 กรัม ต่อลิตร

ชั่ง โซเดียมไธโอซัลเฟตเพนตะไฮเดรต 80 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

- สารละลายอินดิเคเตอร์ผสม (mixed indicator)

ชั่ง เมธิลเรด 0.060 กรัม และเมธิลีนบลู 0.040 กรัม นำไปละลายในเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล

ผสมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 45 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่นที่ต้มไล่ CO_2 ที่เย็นแล้ว 1 ลิตร หาความเข้มข้นที่แน่นอนโดยเทียบมาตรฐานกับสารมาตรฐานปฐมภูมิ Potasssium hydrogen phthalate (KHP) (ภาคผนวก ข)

- สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟุริก 0.1 นอร์มอล

ผสมกรดซัลฟุริกเข้มข้น 3 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 1 ลิตร หาความเข้มข้นที่แน่นอนโดยเทียบมาตรฐาน กับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล

4.1.5 สารละลายสำหรับหาปริมาณโครมิกออกไซด์ โดยวิธีเปอร์คลอริกแอซิดออกซิเดชั่น

- สารละลายโพแตสเซียมไอโอไดด์ 10 เปอร์เซ็นต์

ชั่งโพแตสเซียมไอโอไดด์ 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.1 นอร์มอล

ชั่งโซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3 . 5H_2O$) 24.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่นต้มแล้ว และเติมโซเดียมคาร์บอเนต 1 กรัม แล้วเจือจางให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร หาความเข้มข้นที่แน่นอนโดยเทียบมาตรฐานกับ Potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) (ภาคผนวก ข)

- สารละลายกรดฟอสฟอริก 40 เปอร์เซ็นต์

ตวงกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 45 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

- สารละลายน้ำแป้ง 2 เปอร์เซ็นต์

ชั่งแป้ง (soluble starch) 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ต้มจนเดือดนาน 3 นาที แล้วยกลง ถ่ายใส่ขวดสีชา เก็บในตู้เย็น

4.1.6 สารละลายสำหรับหาปริมาณโครเมียม แคลเซียม และแมกนีเซียม

- สารละลายมาตรฐาน โครเมียมไนเตรท 1,000 มิลลิกรัม ต่อลิตร
- สารละลายมาตรฐาน แคลเซียมไนเตรท 1,000 มิลลิกรัม ต่อลิตร
- สารละลายมาตรฐาน แมกนีเซียมไนเตรท 1,000 มิลลิกรัม ต่อลิตร
- สารละลายแลนทานัม 50 กรัม ต่อลิตร

ชั่งแลนทานัมออกไซด์ (La_2O_3) 5.865 กรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริก 25 มิลลิลิตร โดยค่อยๆ เติมกรดทีละน้อย แล้วเจือจางให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

4.2 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (Starter inoculum) (เกษม พงษ์มณี, 2536)

เขี่ยเชื้อที่เก็บไว้ใน NA-Slant นำมา streak บน Skim milk agar plate (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อจาก Skim milk agar plate 1-2 โคโลนี ใส่ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มด้วยเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ประมาณ 12-16 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างวัดความขุ่นของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ให้ได้ประมาณ 0.6

4.3 การผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสจาก *B. subtilis* TISTR 25 ระดับถังหมัก 5 ลิตร (วรรณวิมล, 2540)

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 4.2 ปริมาณ 35 มิลลิลิตร ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 3,500 มิลลิลิตร ควบคุมสภาวะการหมัก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm. ควบคุมความเป็นกรด – ด่าง ประมาณ 7.0 ด้วย 2 N NaOH ควบคุมการเกิดฟองด้วย Antifoam A ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:3 ใช้เวลาในการหมัก 84 ชั่วโมง กรองเอากากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันออกแล้ว แบ่งน้ำหมักจำนวน 20 มิลลิลิตร ไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออก นำส่วนที่เป็นน้ำใสไว้วัดอัลคาไลน์โปรติเอสแอคติวิตี

4.4 การเตรียมอัลคาไลน์โปรติเอสในรูปผงโดยวิธีการระเหิดแห้ง (Lyophilization) (ดัดแปลงจากวิธีของจันทิมา, 2539)

นำน้ำหมักจากข้อ 4.3 ไปเหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ ด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เอาส่วนน้ำใส (crude enzyme) มาแช่ในอ่างน้ำแข็ง ตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยค่อยๆ เติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียด ทีละน้อย ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 70 เปอร์เซ็นต์ (472 กรัมต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร) คนเบาๆ ตลอดเวลาจนแอมโมเนียมซัลเฟตละลายหมดแล้วจึงนำไปตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็น 1 คืน เหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอนมาละลายในคาร์บอเนต–ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 10.5 แล้วกำจัดเกลือส่วนเกินออกโดยการทำ dialysis ในสารละลายคาร์บอเนต–ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่ได้ มาทำให้แห้งโดยวิธีการระเหิดแห้ง (Lyophilization) เก็บรักษาผงอัลคาไลน์โปรติเอสที่ได้ ในภาชนะปิดสนิทเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.5 การวัดแอคติวิตีของอัลคาไลน์โปรติเอส (วรรณวิมล , 2540)

นำส่วนน้ำใส (crude enzyme) จากข้อ 4.3 หรือสารละลายของอัลคาไลน์โปรติเอส จากข้อ 4.4 มาหาแอคติวิตี โดยบ่มตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร กับสารละลายเคซีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในคาร์บอเนต ไบคาร์บอเนต บัฟเฟอร์ pH 10.5 จำนวน 0.9 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำขึ้นจากอ่างน้ำอุ่นแล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นทันที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเหวี่ยงตกตะกอน ด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนน้ำใสไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยเปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีน ที่เกิดจากการย่อยสลายเคซีน โดยเอนไซม์เทียบกับกราฟมาตรฐานของไทโรซีน ความเข้มข้น 0 – 140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค)

กำหนดให้ 1 ยูนิตเอนไซม์เท่ากับ ปริมาณของไทโรซีน 1 ไมโครกรัม ที่ได้จากการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์ที่ภาวะของการหาแอคติวิตี ภายในเวลา 1 นาที

ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ทุกตัวอย่างจะต้องทำหลอดควบคุมด้วยสำหรับเปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนที่ได้จากการย่อยสลายโดยเอนไซม์อย่างแท้จริง โดยทำการบ่มสารละลายเคซีนกับกรดไตรคลอโรอะซีติก เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 20 นาทีก่อน จากนั้นจึงเติมบัฟเฟอร์และตัวอย่างลงไป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และเหวี่ยงตกตะกอนแยกส่วนน้ำใสนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ค่าปริมาณการดูดกลืนแสงของปริมาณไทโรซีนที่เกิดจากการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์อย่างแท้จริงหาได้จากผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างกับค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม แล้วนำไปเปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนจากกราฟมาตรฐาน

4.6 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี (Lowry Method) (Bollag,1991)

สารละลายที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายแอลคาไลน์คอปเปอร์ 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เติมฟีนอลรีเอเจนต์ 0.25 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้อีก 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน (BSA) ที่ความเข้มข้น 0 – 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค)

4.7 การเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเศษหนัง

บดเศษหนังที่ได้จากขั้นตอนการขูดบาง (chrome shavings) ด้วยเครื่องตัดเฉือนความเร็วสูง (blender) แล้ววิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น เถ้า ไนโตรเจน ไขมัน โครเมียม แคลเซียม และแมกนีเซียม โดยใช้วิธีตาม ASTM (1993)

4.7.1 การหาค่าความเป็นกรด-ด่าง ของตัวอย่างเศษหนัง (ASTM D 2810-72)

ชั่งตัวอย่าง 2-5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น ปริมาณเป็น 20 เท่าของตัวอย่าง (หรือประมาณ 40-100 มิลลิลิตร) ปิดจุกขวดแล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4-18 ชั่วโมง หลังจากรินส่วนที่เป็นน้ำใส่บีกเกอร์ที่สะอาด นำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

4.7.2 การหาปริมาณความชื้น (ASTM D 3790-79)

ชั่งตัวอย่าง 2-5 กรัม ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ในถ้วยกระเบื้องที่อบแห้ง และ ชั่งน้ำหนักแล้ว นำไปอบไล่ความชื้น ในตู้อบที่ อุณหภูมิ 100 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 $\pm$ ½ ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccator) นำไปชั่งหาน้ำหนัก คำนวณหาปริมาณความชื้น จากสมการ

$$\text{ความชื้น (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักที่หายไป}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

4.7.3 การหาปริมาณเถ้าทั้งหมด (ASTM D 2617-69)

ชั่งตัวอย่าง 1-5 กรัม ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ในถ้วยกระเบื้องทนความร้อนสูง ที่อบและชั่งน้ำหนักแล้ว นำไปเผาในเตาเผา ตั้งอุณหภูมิในการเผา 600 $\pm$ 25 องศาเซลเซียส โดยเริ่มเผาตัวอย่างตั้งแต่เตาเผายังไม่ร้อน เมื่ออุณหภูมิถึง 600 องศาเซลเซียส แล้วให้เผาต่อไปอีก 30-45 นาที หรือจนน้ำหนักคงที่ เอาออกจากเตาเผา ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักหาปริมาณเถ้าทั้งหมด

$$\text{ปริมาณเถ้า(\%)} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้า}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

$$\text{ปริมาณเถ้า (\%ปราศจากความชื้น)} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้า}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบไล่ความชื้น}} \times 100$$

4.7.4 การหาปริมาณโครมิกออกไซด์ โดยวิธีเปอร์คลอริกแอซิดออกซิเดชัน (ASTM D 2807-93)

ชั่งตัวอย่าง 1-5 กรัม ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไปเผาหาปริมาณเถ้าตามวิธี ในข้อ 4.7.3 (ASTM D 2617) หลังจากนั้นถ่ายเถ้าที่ได้ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร หรือในหลอดย่อย ถ้าย่อยด้วยเครื่อง kjeldatherm เติมกรดไนตริก กรดเปอร์คลอริก และ กรดซัลฟุริก ปริมาตร 20, 15 และ 10 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 4:3:2) ตามลำดับ ใส่ลูกแก้ว (glass beads) 4-5 ลูก ต้มตัวอย่างบนเตาไฟฟ้าในตู้ดูดควัน ภายใต้สภาวะรีฟลักซ์ จนกระทั่งสารอินทรีย์ถูกย่อยสลาย และโครเมียมถูกออกซิไดซ์ จน

ได้สารละลายใสสีส้ม ต้มต่อไปอีก 2 นาที ยกออกจากเตา และทำให้เย็นลง ล้างด้านข้างของขวดย่อย และเจือจางให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปต้มต่ออีก 7 นาที แล้วทำให้เย็นลง หลังจากนั้นเติมสารละลาย 40 เปอร์เซ็นต์ กรดฟอสฟอริก 30 มิลลิลิตร และสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไอโอไดด์ 20 มิลลิลิตร ปิดขวดรูปชมพู่ด้วยจุกยาง นำไปตั้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 5 นาที แล้วไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1 นอร์มอล โซเดียมไธโอซัลเฟต จนสารละลายในขวดมีสีจางลง จนสีเหลืองเปลี่ยนเป็นเหลืองปนเขียว แล้วจึงเติมสารละลายน้ำแป้ง ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ 2 มิลลิลิตร ไตเตรทต่อไปจนสารละลายเปลี่ยนสี จากสีน้ำเงินเข้ม ไปเป็นสีเขียวใส บันทึกปริมาตรสารละลายมาตรฐาน 0.1 นอร์มอล โซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ คำนวณปริมาณโครมิกออกไซด์ เป็นเปอร์เซ็นต์ จากสูตร

$$\% Cr_2O_3 = A \times B \times 0.02533 \times 100/C$$

เมื่อ A = ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน 0.1 นอร์มอล โซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ (มิลลิลิตร)
B = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต ที่ใช้ (นอร์มอล)
C = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ (กรัม)

หรือคำนวณปริมาณ Cr_2O_3 เป็นเปอร์เซ็นต์ คิดจาก น้ำหนักปราศจากความชื้น (Moisture free basis, MFB)

$$\% Cr_2O_3 (MFB) = A \times B \times 0.02533 \times 100/C \times 1/(1-D/100)$$

เมื่อ D = ความชื้นของตัวอย่าง (เปอร์เซ็นต์)

4.7.5 การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธี Kjeldahl (ASTM D 2868-70)

ชั่งน้ำหนักแน่นอนของตัวอย่าง 0.2-0.5 กรัม บนกระดาษกรอง เบอร์ 1 ห่อให้สามารถใส่ในหลอดย่อยตัวอย่างได้ แล้วเติมคะตะลิสต์ (โพแทสเซียมซัลเฟต 95 กรัม คอปเปอร์ซัลเฟต 5 กรัม) 7 กรัม ใส่ลูกแก้ว 4-5 ลูก แล้วเติมกรดซัลฟุริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาหลุมจนได้สารละลายสีเขียวใส ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร โดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 45 เปอร์เซ็นต์ 50-100 มิลลิลิตร ขณะเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์นี้จะต้องนำขวดรูปชมพู่ที่บรรจุสารละลายกรดบอริกเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่เติมสารละลายอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด มารองรับสารละลาย โดยให้ปลายของหลอดนำก๊าซจุ่มอยู่ใต้สารละลายกรดบอริกตลอดเวลา เพื่อให้จับ NH_3 ที่กลั่นออกมา กลั่นจนกระทั่งสารละลายในขวดมีปริมาตรรวม 200 มิลลิลิตร หรือสีของสารละลายเปลี่ยนไปเป็นสีเขียว แล้วจึงนำไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟุริก ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน

ไตเตรทจนสีของสารละลายเป็นสีม่วงอ่อน ในกรณีสารละลายแบลงค์ (blank)เมื่อกลั่นครบ 200 มิลลิลิตร แล้วสารละลายอาจไม่เปลี่ยนเป็นสีเขียว แต่เป็นสีม่วง (เป็นกรด) ต้องไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์

การทำแบลงค์ : ชั่งซูโครส 1.0 กรัม ใส่ในกระดาษกรองเบอร์ 1 แทนตัวอย่าง เติมคะตะลิสต์และกรด แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกับตัวอย่าง

คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนจากสูตร

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (\%)} = [(A \pm B) \times N \times 0.014] / W \times 100$$

เมื่อ N = ความเข้มข้นที่แน่นอน ของสารละลายกรดซัลฟุริก (นอร์มอล)

A = ปริมาตรสารละลายกรดซัลฟุริกที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ (กรัม)

B = ปริมาตรสารละลายกรดซัลฟุริกที่ใช้ไตเตรท แบลงค์ (มิลลิลิตร)

ใช้ ค่า (--) B เมื่อสารละลายแบลงค์เป็นด่าง และต้องไตเตรทด้วยสารละลายกรดซัลฟุริก

(+) B เมื่อสารละลายแบลงค์เป็นกรด และต้องไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยจะต้องคำนวณปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้อยู่ในเทอมของปริมาณของกรดซัลฟุริกที่ใช้

คำนวณหาปริมาณไนโตรเจน คิดจากน้ำหนักแห้ง (MFB)

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (\%)} = \frac{C}{100 - M} \times 100$$

C = เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน คิดจาก น้ำหนักตัวอย่าง ก่อนอบไล่ความชื้น

M = เปอร์เซ็นต์ความชื้น

4.7.6 การหาปริมาณไขมัน โดยวิธีสกัดซอกฮ์เลต (Soxhlet Extraction)

อบขวดสกัดไขมัน ที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน (A) ชั่งตัวอย่าง 0.2-1.0 กรัม ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ถึงทศนิยม 4 ตำแหน่ง บนกระดาษกรองเบอร์ 1 ใส่ใน thimble เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ในขวดสกัด ประมาณ 50 มิลลิลิตร (หรือไม่ให้ thimble แช่อยู่ในปิโตรเลียมอีเทอร์ ขณะที่ทำการสกัด) นำขวดสกัดที่มีปิโตรเลียมอีเทอร์ และ thimble ที่ใส่ตัวอย่าง ไปประกอบกับเครื่อง Soxhlet Extraction เปิดสวิทซ์ของจานให้ความร้อน (hot plate) ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 150 องศาเซลเซียส โดยขณะให้ความร้อน จะต้องเปิดน้ำเข้า condenser เพื่อหล่อเย็นตลอดเวลา สกัดไขมันต่อเนื่องเป็นเวลา 6-10 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำขวดสกัดไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำขวดสกัดไปทิ้งให้เย็น ในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก (B)

คำนวณปริมาณไขมัน จากสมการ

$$\text{ไขมัน (\%)} = \frac{(B - A)}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

4.7.7 การหาปริมาณโครเมียม ,แคลเซียม และ แมกนีเซียม โดยวิธี Atomic Absorption Spectrophotometry

ชั่งตัวอย่าง 0.1- 0.2 กรัม ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไปเผาเพื่อให้ได้เถ้าตามวิธี ASTM D 2617 นำเถ้าที่ได้ถ่ายใส่หลอดย่อยสำหรับเครื่อง Kjeldatherm เติมกรดไนตริก 5 มิลลิลิตร กรดเปอร์คลอริก 4 มิลลิลิตร และกรดซัลฟุริก 3 มิลลิลิตร ใส่ลูกแก้ว 4-5 ลูก นำไปย่อยบนเตาหลุม ที่อุณหภูมิ 250-300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง จนควันสีขาวของเปอร์คลอริกจางหายไปเกือบหมด หลังจากนั้นทิ้งให้เย็นลง แล้วเติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณธาตุ ด้วยเครื่อง อะตอมมิกแอบซอร์ปชั่นสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 357.9 , 422.7 และ 285.2 นาโนเมตร สำหรับวิเคราะห์โครเมียม แคลเซียม และแมกนีเซียม ตามลำดับ เทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

*ทุกตัวอย่างที่จะวัดปริมาณ Ca และ Mg ให้เติมสารละลาย La_2O_3 ให้มี La 10,000 ppm

4.8 ชนิดและปริมาณเกลืออัลคาไลน์-เอิร์ท ที่เหมาะสมในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้อยู่ในช่วงการทำงานของอัลคาไลน์โปรติเอส ที่ระดับ 8.5 และ 10.5

นำเศษหนัง 2.5 กรัม มาแช่ในน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมเกลืออัลคาไลน์-เอิร์ท โดยการแปรผันชนิด และปริมาณเกลืออัลคาไลน์-เอิร์ท 3 ชนิด ได้แก่ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($Ca(OH)_2$) แมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ ($Mg(OH)_2$) และ แมกนีเซียมออกไซด์ (MgO) ในปริมาณ 0-12 % โดยน้ำหนักของเศษหนัง นำของของผสมไปเขย่าและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 71°C ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำ (water bath shaker) ที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที แล้วยกออกจากเครื่องเขย่า ทิ้งให้เย็นลง นำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของของผสม

4.9 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโครเมียมออกจากเศษหนังโดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

4.9.1 ศึกษาปริมาณการใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส เพื่อหาปริมาณเอนไซม์ที่เพียงพอสำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่ผลิตโดย *B. subtilis* TISTR 25 ที่อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมต่อสภาวะการทำงานของเอนไซม์ (optimal activity)

นำเศษหนัง 2.5 กรัม มาแช่ในน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมเกลืออัลคาไลน์-เอิร์ท ที่เหมาะสม (จากข้อ 4.8) นำไปเขย่าและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 71°C ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (water bath shaker) ด้วยน้ำ ที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที ยกออกจากเครื่องเขย่า ทิ้งให้เย็นลง แล้วเติมเอนไซม์ โดยการแปรผันปริมาณเอนไซม์ ในช่วง 0-8 % โดยน้ำหนักของเศษหนัง นำไปเขย่าโดยควบคุมอุณหภูมิ ที่ 45 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ยกออกจากเครื่องเขย่า ตั้งทิ้งไว้ในห้องเย็น 1 คืน แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำไปอบไล่ความชื้น ชั่งน้ำหนักตะกอนโครเมียมและเศษหนังที่เหลืออยู่ (chrome cake)

4.9.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ โดยแปรผันอุณหภูมิเป็น 3 ระดับ คือ 30, 37 และ 45 °C

ชั่งเศษหนัง 2.5 กรัม แช่ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมเกลืออัลคาไลน์-เอิร์ทที่เหมาะสม (จาก ข้อ 4.8) นำไปเขย่าและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 71°C ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที หลังจากนั้นยกออก ทำให้ของผสมมีอุณหภูมิลดลง เติมอัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตโดย *B. subtills* TISTR 25 ในปริมาณที่เหมาะสม (จากข้อ 4.9.1) แล้วนำไปเขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 30, 37 และ 45°C แล้วยกออกจากเครื่องเขย่าเก็บของผสมไว้ 1 คืน ในตู้เย็น แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เพื่อแยกสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต ออกจากตะกอนโครเมียมที่มีโปรตีนซึ่งไม่ละลาย (chrome cake) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยทุกการทดลองจะเปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมซึ่งจะทำเหมือนกันแต่ไม่มีการใส่เอนไซม์

4.9.3 เปรียบเทียบการใช้เกลืออัลคาไลน์-เอิร์ท (ในข้อ 4.8) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายด้วยอัลคาไลน์โปรติเอส จากข้อ 4.9.1, 4.9.2

โดยการแปรผันชนิดเกลืออัลคาไลน์-เอิร์ท 3 ชนิด คือ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($Ca(OH)_2$) แมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ ($Mg(OH)_2$) และแมกนีเซียมออกไซด์ (MgO) ในปริมาณ 6.5 % โดยน้ำหนักของเศษหนัง

4.9.4 เวลาที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.9.1 โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม (จากข้อ 4.9.1) ติดตามวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของของผสม หลังการเติมเอนไซม์ ทุกๆ 1 ชั่วโมง จนกระทั่งค่าความเป็นกรด-ด่างของของผสมเริ่มคงที่ จะเป็นเวลาที่เพียงพอสำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในการทดลองต่อๆ ไป

4.9.5 นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และ T-test

4.10 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของ chrome cake ได้แก่ ความชื้น เถ้า โครมิกออกไซด์ ไนโตรเจน ไขมัน โดยใช้วิธี ในข้อ 4.7.2 ,4.7.3 ,4.7.4 ,4.7.5 ,4.7.6 ตามลำดับ

4.11 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต ได้แก่ pH และ ปริมาณของแข็งทั้งหมด โดยใช้วิธี ASTM (D 4906-95)

4.11.1 การหาปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS)

ปิเปตตัวอย่างสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต (protein hydrolysate solution) 10-50 มิลลิลิตร ใส่ในถ้วยกระเบื้องที่อบและชั่งหาน้ำหนักแน่นอนแล้ว อบตัวอย่างในตู้อบที่ตั้งอุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นอบที่อุณหภูมิ 93 องศาเซลเซียส ต่อไปอีกเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเอาออกจากตู้อบ ทิ้งให้เย็น ในโถดูดความชื้น นาน 1 ชั่วโมง จนอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนัก แล้วนำไปอบต่อที่อุณหภูมิ 93 องศาเซลเซียส อีกครั้งละ 1 ชั่วโมง จนได้น้ำหนักคงที่ หรือน้ำหนักเปลี่ยนแปลงไม่เกิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ คำนวณปริมาณของแข็งทั้งหมด

$$\text{ปริมาณ ของแข็งทั้งหมด (mg/ml)} = \frac{\text{น้ำหนักของแข็งที่เหลือหลังอบ (mg)}}{\text{ปริมาตรตัวอย่างเริ่มต้น (ml)}}$$

4.11.2 การหาปริมาณเถ้า

นำตัวอย่างที่หาปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) แล้วจากข้อ 4.11.1 ไปเผาที่อุณหภูมิ 600 $\pm$ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักหาปริมาณเถ้า

$$\text{ปริมาณ เถ้าทั้งหมด (mg/ml)} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้าที่เหลือหลังเผา (mg)}}{\text{ปริมาตรตัวอย่างเริ่มต้น (ml)}}$$

4.12 ทำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตให้เป็นผงแห้ง โดยวิธีระเหิดแห้ง (Lyophilization)

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผงโปรตีน ได้แก่ เถ้า ไนโตรเจน ไขมัน และ โครเมียม ตามวิธีในข้อ 4.7.3 ,4.7.5 , 4.7.6 และ 4.7.7 ตามลำดับ

4.13 วิเคราะห์สัดส่วนกรดอะมิโนแต่ละชนิด (Amino acid composition)

นำโปรตีนไฮโดรไลเสตผงแห้ง จากข้อ 4.12 ไปวิเคราะห์สัดส่วนกรดอะมิโนแต่ละชนิด ด้วยเครื่อง Amino acid analyzer เปรียบเทียบกับกรดอะมิโนของคอลลาเจน (collagen profile) โดยส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ บริษัท กรุงเทพอาหารสัตว์ จ.สมุทรปราการ