รายงานผลการวิจัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

เรื่อง

การสกัดโครเมียมออกจากเศษหนังฟอกโครม โดยวิธีการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เพื่อการนำโปรตีนกลับมาใช้ประโยชน์

โดย

668.636
น196ก

นภา ศิวรังสรรค์

เมษายน 2542

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การสกัดโครเมียมออกจากเศษหนังฟอกโครม โดยวิธีการย่อยสลายด้วยเอนไซม์
เพื่อการนำโปรตีนกลับมาใช้ประโยชน์

โดย

นภา ศิวรังสรรค์

เมษายน 2542

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมี ที่ใช้ในการวิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่าน และผู้ช่วยวิจัย น.ส. สุภาภรณ์ กิตติวโรดม

ท้ายนี้ ขอขอบคุณท่านคณะอนุกรรมการบริหารทุนวิจัยพิจารณาเงินทุนวิจัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ปีการเงิน 2541 (ครั้งที่2) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ให้โอกาสได้ทำงานวิจัยนี้ มา ณ ที่นี้ด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย : การสกัดโครเมียมออกจากเศษหนังฟอกโครมโดยวิธีการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพื่อการนำโปรตีนมาใช้ประโยชน์

ชื่อผู้วิจัย : ผศ. นภา ศิวรังสรรค์

ปีที่ทำวิจัยเสร็จ : เมษายน 2542

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

การกำจัดเศษหนังที่มีโครเมียมเป็นองค์ประกอบ ได้กลายมาเป็นปัญหาสำคัญของโรงงานฟอกหนัง การฝังกลบเศษหนังเหล่านี้ก็ไม่เป็นที่ยอมรับ เนื่องจากเป็นไปได้ที่โครเมียม(III) จะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นโครเมียม(VI) ซึ่งเป็นพิษ และสามารถปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

การย่อยสลายเศษหนังโดยใช้เอนไซม์เป็นทางเลือกที่น่าสนใจที่จะนำมาใช้ เพื่อการนำโปรตีนกลับมาใช้ประโยชน์ โดยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโครเมียมออกจากเศษหนังฟอกโครม โดยใช้อัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตโดย *B. subtilis* TISTR 25. เริ่มต้นโดยทำการต้มเศษหนังที่อุณหภูมิ 71°C ในสารละลายที่มีแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 6.5% เพื่อปรับให้มี pH 10.5 ตามด้วยการย่อยสลายด้วยอัลคาไลน์ โปรติเอส ปริมาณน้อยกว่า 1.0% ที่ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสม 45°C เมื่อปฏิกิริยาการย่อยสลายเกิดขึ้น pH ของของผสมจะลดลงเหลือประมาณ 8.5 ไฮโดรไลเสตโปรตีนที่ได้สามารถแยกออกจากตะกอนโครเมียมโดยวิธีการกรอง แล้วนำไประเหิดแห้ง เปอร์เซ็นต์ผลผลิตของโปรตีนผงที่นำกลับมาได้โดยเฉลี่ยประมาณ 60.9% ไฮโดรไลเสตโปรตีนที่ได้ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับสัตว์อยู่ 9 ชนิดจากทั้งหมด 10 ชนิด และมีโครเมียมอยู่เพียง 13 ส่วนในล้านส่วน ซึ่งเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้

ส่วนกากตะกอนโครเมียมสามารถนำมาสกัดโครเมียมออกโดยการละลายด้วยกรดซัลฟุริกในน้ำในอัตราส่วน 1:4 ได้เป็นสารละลายโครเมียมซัลเฟต ซึ่งอาจนำกลับไปใช้ในขั้นตอนการดองหนังหรือใช้ในการฟอกหนังได้ ในขณะที่กากตะกอนโปรตีนที่เหลือจากการสกัดโครเมียมด้วยกรดสามารถแยกออกจากสารละลายโครเมียม และอาจนำไปใช้เป็นปุ๋ยไนโตรเจน นอกจากนั้นตะกอนแคลเซียมซัลเฟต อาจใช้เป็นยิปซั่มในการผลิตปูนซิเมนต์

Project Title : CHROMIUM REMOVAL FROM CHROME-CONTAINING LEATHER WASTE BY ENZYMATIC HYDROLYSIS FOR PROTEIN RECOVERY

Name of investigator : Assist. Prof. Napa Siwarungson

Year : April ,1999

ABSTRACT

Disposal of chromium-containing leather waste has became a serious problem to the tanning industry. Landfills are disinclined to accept this leather waste because of the possibility of Cr(III) could be oxidized to toxic Cr(VI) and contaminating the environment.

Enzymatic hydrolysis of chrome shavings was an interesting alternative for protein recovery. The optimal conditions for chromium removal from chrome shavings by alkaline protease from *B.subtilis* TISTR 25 were studied. The shavings were pretreated at a temperature 71°C in the presence of 6.5% calcium hydroxide to adjust pH 10.5. The appropriate conditions for the enzyme hydrolysis with alkaline protease should be less than 1.0% at 45°C for 3 hours. As the hydrolysis proceeded the pH of mixture fell to about 8.5. The hydrolyzated protein obtained could be isolated from chrome cake by filtration and lyophilization. The yield recovery of lyophilized protein was 60.9%. The lyophilized protein hydrolyzate contained 9 of 10 essential amino acids together with 13 ppm chromium. This reveals the strong potential of using protein hydrolyzate as an animal feed.

Residual chrome caked was extracted with (1:4) sulfuric acid solution. The extracted chromium sulfate solution may be recycled into the pickling step or tanning process, whereas the protein residues separated from chromium solution and may be used as a nitrogen fertilizer. In addition, the calcium sulfate precipitate may be used as gypsum in cement production.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการตารางประกอบ	iv
รายการภาพประกอบ	vii
คำย่อ	viii
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์	17
บทที่ 4 วิธีการทดลอง	20
บทที่ 5 ผลการทดลอง	31
บทที่ 6 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	49
รายการอ้างอิง	56
ภาคผนวก	61

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

ตารางที่ หน้า

1. ปริมาณกากของเสียจากขั้นตอนต่างๆ ในกระบวนการฟอกหนัง..... 10
2. กรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับสัตว์..... 12
3. การทำให้อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์บางส่วน..... 31
4. องค์ประกอบทางเคมีของเศษหนังจากขั้นตอนการขูดบาง..... 33
5. ปริมาณ chrome cake และ pH ของสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีน เมื่อแปรผันปริมาณการใช้อัลคาไลน์โปรติเอส..... 35
6. ปริมาณ chrome cake เมื่อแปรผันปริมาณการใช้เอนไซม์ ที่ pH 8.5 และ 10.5..... 36
7. ปริมาณ chrome cake และความสามารถในการละลายโปรตีนในเศษหนังเมื่อแปรผันชนิดอัลคาไลน์-เอิร์ท..... 37
8. พารามิเตอร์บางตัวที่ใช้ในการตัดสินใจลดเวลาในการย่อยสลายด้วยอัลคาไลน์โปรติเอส..... 39
9. ปริมาณ chrome cake เมื่อแปรผันปริมาณการใช้อัลคาไลน์โปรติเอสในช่วง 0-16%... 40
10. ปริมาณ chrome cake และความสามารถในการละลายของเศษหนังเมื่อล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น..... 42
11. องค์ประกอบทางเคมีของ chrome cake ที่เหลือจากการย่อยสลายเศษหนังด้วยอัลคาไลน์โปรติเอส..... 43
12. องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีน..... 45
13. องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีนที่ทำแห้งโดยวิธีการระเหิดแห้ง..... 45
14. กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของไฮโดรไลเสตโปรตีน..... 48

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1.	ภาพตัดขวางของหนังสัตว์	6
2.	ตำแหน่งที่สารฟอกประเภทต่างๆ ทำปฏิกิริยากับคอลลาเจน	6
3.	การเชื่อมโยงระหว่างสารประกอบของโครเมียมกับคอลลาเจน	7
4.	ขั้นตอนการฟอกหนัง	9
5.	อัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25	32
6.	เศษหนังฟอกโครมจากขั้นตอนการขูดบาง	32
7.	ค่าความเป็นกรด-ด่างของของผสม เมื่อแปรผันชนิด และปริมาณเกลืออัลคาไลน์-เอิร์ท	34
8.	ค่าความเป็นกรด-ด่างของของผสม เมื่อแปรผันเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายเศษหนังด้วยอัลคาไลน์โปรติเอส	38
9.	เศษหนังที่ไม่ถูกย่อยสลายและตะกอนโครเมียม	41
10.	ผลการทดสอบสีของโปรตีนในน้ำล้างตะกอนกับสารละลายไบยูเร็ต	42
11.	การละลายตะกอน chrome cake ด้วยกรด ซัลฟุริกเจือจาง 5 เท่า	44
12.	สารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีน	46
13.	ผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังด้วยอัลคาไลน์โปรติเอส	46

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

°C	=	องศาเซลเซียส
ppm	=	ส่วนในล้านส่วน
vvm	=	ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที
rpm	=	รอบต่อนาที
%	=	เปอร์เซ็นต์
MFB	=	น้ำหนักปราศจากความชื้น
N	=	นอร์มอล
M	=	โมลาร์
w/v	=	น้ำหนักต่อปริมาตร
µg/ml	=	ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
mg/ml	=	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
pH	=	ค่าความเป็นกรด-ด่าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันปัญหามลพิษจากขยะและเศษวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ ซึ่งมีการปนเปื้อนของมลสารและโลหะหนัก ต้องอาศัยการจัดการขยะมูลฝอยที่ดี และไม่เพียงแต่เป็นการกำจัดขยะอย่างถูกต้องเหมาะสม แต่ยังต้องพยายามหลีกเลี่ยงหรือลดปริมาณขยะที่จะเกิดขึ้น ซึ่งเป็นการลดความเสี่ยงอันเกิดจากมลพิษเหล่านี้ โดยต้องเน้นที่การลดการเกิดขยะจากแหล่งกำเนิดแทนการแก้ปัญหาที่ปลายเหตุ หรือตามแนวเทคโนโลยีสะอาด (clean technology)

อุตสาหกรรมฟอกหนังเป็นอุตสาหกรรมเกษตร (Agro-Industry) ประเภทหนึ่ง ซึ่งมีการนำหนังสัตว์มาใช้ประโยชน์ โดยผ่านกรรมวิธีฟอกหนัง หนังสัตว์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการฟอกหนังนั้นประมาณร้อยละ 90 เป็นหนังโค และกระบือ ซึ่งเป็นหนังจากภายในประเทศและหนังดิบ (Raw hide) ที่นำเข้าจากต่างประเทศ (จรินทร์,2537)

ในประเทศไทยมีโรงงานฟอกหนังอยู่ประมาณ 150 โรงงาน อุตสาหกรรมฟอกหนังกว่าร้อยละ 80 นิยมใช้วิธีฟอกโครม ในการฟอกหนังจะมีเศษวัสดุเหลือทิ้ง คือเศษหนัง ปริมาณโดยเฉลี่ยปีละ 18,000 ตัน โดยเป็นเศษหนังจากขั้นตอนต่างๆ ในกระบวนการฟอกหนัง และมีเศษหนังที่มีโครเมียมเป็นองค์ประกอบรวมอยู่ด้วย ซึ่งEnvironmental Protection Agency (EPA) จัดให้เป็นกากของเสียอันตรายหมายเลข K053 (EPA Harzardous Waste Number K053) ซึ่งทางโรงงานไม่ได้นำไปขายหรือใช้ประโยชน์อื่นๆ แต่จะให้เทศบาลนำไปกำจัด ทำให้เพิ่มปัญหากับพื้นที่ทิ้งขยะ และพื้นที่ฝังกลบ (landfill) เนื่องจากข้อจำกัดเรื่องพื้นที่รองรับขยะ มาตรการทางด้านสิ่งแวดล้อม และค่าใช้จ่ายในการขนย้ายและบำบัดกากของเสียเหล่านี้ ขยะที่มีโครเมียมเป็นองค์ประกอบ อาจจะทำให้เกิดปัญหามลพิษจากโครเมียมในสภาพแวดล้อม เช่น ปัญหาน้ำชะขยะ (leachate) ส่งผลต่อการแพร่กระจายของโลหะหนักลงสู่น้ำผิวดิน น้ำใต้ดิน การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของดิน ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช และเข้าสู่ระบบห่วงโซ่อาหารของสิ่งมีชีวิต อันจะมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพอนามัยของประชาชน จึงได้พยายามคิดค้นวิธีกำจัดและการใช้ประโยชน์เศษหนังดังกล่าว โดยการแก้ปัญหาในระยะแรกมุ่งเน้นที่การกำจัดเศษหนังและการนำกลับโครเมียมกลับมาใช้ประโยชน์เป็นหลัก

อย่างไรก็ตาม มีการนำเศษหนังที่มีโครเมียมนี้ไปใช้ประโยชน์โดยตรง โดยไม่ผ่านกระบวนการกำจัดโครเมียม เช่น นำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตฉนวนไฟฟ้า วัสดุก่อสร้าง และแผ่นไฟเบอร์ (fibrous sheet) หรือผสมกับไวนิลอะซิเตท เพื่อผลิตพื้นรองเท้า รวมทั้งใช้แทนเยื่อกระดาษ ในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ แต่ท้ายที่สุด ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำเศษหนังดังกล่าวไปใช้เป็นวัตถุดิบ ก็จะกลายเป็นขยะหลากหลายประเภทที่มีโครเมียมเป็นองค์ประกอบ

การนำโครเมียมกลับมาใช้ใหม่ โดยการเผาเศษหนังที่อุณหภูมิสูง ซึ่งจะทำให้ได้ขี้เถ้าของโครเมียมสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมเกลือไบโครเมต หรือเป็นแหล่งโครเมียม ในการเผาจะทำให้เกิดก๊าซพิษได้แก่ SO_2 และ NO_x รวมทั้งเขม่าควัน แม้ว่าจะสามารถกำจัด SO_2 ได้ แต่มีต้นทุนการกำจัดสูง การเผาจะใช้ความร้อนสูง สิ้นเปลืองพลังงาน และที่สำคัญไม่สามารถนำโปรตีนกลับมาใช้ประโยชน์ได้

การนำโครเมียมกลับมาใช้ใหม่ โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชั่นด้วยอากาศ โดยใช้ตัวออกซิไดซ์ที่แรง เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือใช้คลอรีน ในสภาวะที่เป็นด่างเล็กน้อย สามารถทำได้ ไม่สมบูรณ์ เป็นวิธีที่แพงมาก มีโปรตีนละลายผสมอยู่ในสารละลายโครเมียม และยังต้องเพิ่มขั้นตอนการรีดิวซ์โครเมียม(VI) ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา ให้เป็นโครเมียม (III) ด้วย

การย่อยสลายเศษหนังด้วยกรด เช่น กรดซัลฟุริก แม้ว่าจะเป็นวิธีที่ไม่แพง แต่มีข้อจำกัดคือมีโครเมียมเพียงบางส่วนเท่านั้นที่ละลายออกมาจากเศษหนัง และ ยังคงมีโปรตีนอยู่ในสารละลายโครเมียม สารละลายที่ได้สามารถใช้เป็นสารฟอกทับ (retanning agent) ส่วนกรดอะมิโนสามารถนำมาใช้เติมในอาหารสัตว์ได้ นอกจากนี้สารละลายที่ได้จากการย่อยสลาย จะสามารถใช้เป็น fat liquors , surfactants หรือ fillers ในกระบวนการผลิตหนังฟอกได้

การย่อยสลายเศษหนังด้วยด่าง เช่น แคลเซียมไฮดรอกไซด์จะมีประสิทธิภาพกว่า จะทำให้เกิดตะกอนโครเมียมไฮดรอกไซด์ ส่วนสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีนจะนำไปกำจัดเกลือโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ หรือใช้เรซินแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange resin)

การบำบัดเศษหนังที่มีโครเมียม โดยการใช้เอนไซม์ อัลคาไลน์โปรตีเอส มีข้อได้เปรียบคือจะใช้อุณหภูมิไม่สูง ใช้ระยะเวลาสั้นโดยให้ pH ของ ปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 8.3 –10.5 เพื่อป้องกันการละลายของโครเมียม โดยจะแยกโครเมียมไฮดรอกไซด์ ออกจากสารละลายโปรตีนโดยการกรอง ทั้งโครเมียมและโปรตีนสามารถนำกลับไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น นำกากตะกอนโครเมียม (chrome cake) ไปใช้ในกระบวนการฟอกหนัง โดยการละลายตะกอนด้วยกรดกรดซัลฟุริก ส่วนโปรตีนที่ได้สามารถนำไปทำ อาหารสัตว์หรือทำปุ๋ยก็ได้

หลักการบำบัดเศษหนังที่มีโครเมียมด้วยเอนไซม์ โดยอาศัยการเตรียมให้คอลลาเจนเสียสภาพทางธรรมชาติ (denature) ในสารละลายด่าง ที่อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสม ด่างที่ใช้ ได้แก่ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ หรือ แมกนีเซียมออกไซด์ ชนิดเดียวหรือร่วมกับด่างอื่น เพื่อปรับให้มี pH ที่เหมะสม ต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ แล้วจึงเติมเอนไซม์ลงไป ซึ่งเป็นการย่อยสลายเศษหนังแบบขั้นตอนเดียว (one step process) ต่อมาได้ทำการศึกษาเพื่อพัฒนาการนำกลับโปรตีนโดยการย่อยสลายแบบ 2 ขั้นตอน (two step process) ในขั้นตอนแรกเป็นการย่อยด้วยด่าง จะได้โปรตีนเจล (gelable protein) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูง แล้วแยกเอาเศษหนังส่วนที่ไม่ถูกย่อย มาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โปรติเอสในขั้นตอนที่ 2 ซึ่งจะได้โปรตีนโมเลกุลเล็ก

ปัจจุบันการเลี้ยงสัตว์ได้ขยายตัวสูงขึ้น วัตถุดิบที่จะนำมาทำอาหารสัตว์จึงหายากและไม่เพียงพอ เนื่องจากอาหารโปรตีนบางชนิด เช่น ปลาป่น และ กากถั่วเหลือง จะมีน้อยในบางฤดูกาล ทำให้ราคา

อาหารสัตว์สูงขึ้น จึงได้มีความพยายามที่จะหาแหล่งวัตถุดิบใหม่ๆ เป็นแหล่งโปรตีนสำหรับอาหารสัตว์ เศษหนังจากโรงงานฟอกหนังจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากเศษหนังมีปริมาณมากและสม่ำเสมอตลอดทั้งปี และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากปริมาณการบริโภคเนื้อสัตว์และความต้องการผลิตภัณฑ์เครื่องหนังเพิ่มขึ้น และที่สำคัญคือเศษหนังเป็นวัสดุเหลือทิ้งที่มีโปรตีนสูง หากสกัดแยกโครเมียมออกไปได้ จะสามารถนำโปรตีนนั้นกลับมาใช้ประโยชน์ได้ เช่น การนำไปเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์

โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการช่วยเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์สับสเตรตที่เป็นโพลีเปปไทด์สายใหญ่ให้เป็นโมเลกุลที่เล็กลง ซึ่งผลิตได้จาก พืช สัตว์ และจุลชีพ โดยประมาณ 50% เป็นโปรติเอสจากจุลชีพ ซึ่งมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมฟอกหนัง ผลิตผงซักฟอก เนื่องจากโปรติเอสที่ได้จากจุลชีพ เป็นเอนไซม์ที่สร้างและขับออกสู่นอกเซลล์ (extracellular enzyme) จึงง่ายต่อการแยกสกัดและสามารถผลิตได้ในปริมาณสูง (Ward,1983) โปรติเอสจากจุลชีพที่มีการใช้กันมากในอุตสาหกรรม ได้แก่ อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะ *Bacillus* spp. เช่น *B. subtilis* , *B. licheniformis* และ Alkalophilic *Bacillus*

ปกรณ์(2532) พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตได้ทั้งนิวทรัลโปรติเอสและอัลคาไลน์โปรติเอส ที่มีช่วงการทำงานได้ในระหว่าง pH 7-11 และมีแอคติวิตีสูงสุดที่ pH 8.0 และ pH 10.5

ดังนั้นในการย่อยสลายโปรตีนในเศษหนัง จึงพิจารณาวิธีการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในสภาวะที่เป็นด่าง โดยจะใช้เอนไซม์โปรติเอส ที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ TISTR 25 และสามารถผลิตเอนไซม์ได้ภายใต้สภาวะควบคุมในห้องปฏิบัติการ หากสามารถนำเอนไซม์ที่ผลิตได้เองภายในประเทศ มาใช้ประโยชน์ดังกล่าว ก็จะสามารถแก้ปัญหาในกระบวนการผลิตอุตสาหกรรม ปัญหาสิ่งแวดล้อมและสาธารณสุข รวมทั้งสามารถใช้เทคโนโลยีของตนเองในการผลิตผลิตภัณฑ์ใหม่ได้อย่างครบวงจร เป็นการเพิ่มโอกาสในการตลาด นอกจากนี้การประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้เองในประเทศมาใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ ยังเป็นการลดต้นทุนการนำเข้าเอนไซม์จากต่างประเทศอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโครเมียม ออกจากเศษหนังวัวที่ผ่านการฟอกโครม โดยวิธีการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

2. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำโปรตีนจากเศษหนังวัวที่สกัดโครเมียมออกแล้ว ไปใช้ประโยชน์

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษานี้จะศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ในการสกัดโครเมียมออกจากเศษหนังวัวที่ผ่านการฟอกโครมโดยวิธีการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ อัลคาไลน์โปรติเอสแบบขั้นตอนเดียว (one step process) เศษหนังที่ใช้ในการวิจัยเป็นเศษหนังวัว จากขั้นตอนขูดบาง (Chrome shaving) จากโรงงานฟอกหนังขององค์การฟอกหนัง โดยจะศึกษาการตกตะกอนโครเมียมในสารละลายของเกลือแมกนีเซียมออกไซด์ (MgO) หรือเกลือแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ ($Mg(OH)_2$) หรือ เกลือแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($Ca(OH)_2$) ที่ pH 8.5 และ pH 10.5 และอุณหภูมิ 30, 37 และ 45°c ในการย่อยสลายโปรตีนที่ไม่ละลายในสารละลายด่างด้วยเอนไซม์โปรตีเอส ที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 และวิเคราะห์สัดส่วนของกรดอะมิโนที่จำเป็น(Essential amino acid) เพื่อประเมินความสามารถในการนำโปรตีนไปใช้ในการผลิตอาหารสัตว์

สมมติฐาน

1. เศษหนังวัวที่ผ่านการฟอกโครม สามารถนำมาสกัดโครเมียมออกได้ โดยการใช้เอนไซม์ ที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

2. โปรตีนจากเศษหนังวัวที่สกัดโครเมียมออกแล้วโดยวิธีการในข้อ1 มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ประโยชน์ หรือเป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์ได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถลดปริมาณเศษหนังที่มีโครเมียมเป็นองค์ประกอบ และลดความเสี่ยงจากพิษภัยของโครเมียม

2. เป็นแนวทางในการใช้โปรตีนจากเศษหนังสำหรับการผลิตอาหารสัตว์ หรือใช้ประโยชน์ด้านอื่นต่อไป

3. สามารถนำตะกอนโครเมียมที่สกัดออกมาจากเศษหนังไปใช้ประโยชน์ได้อีก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

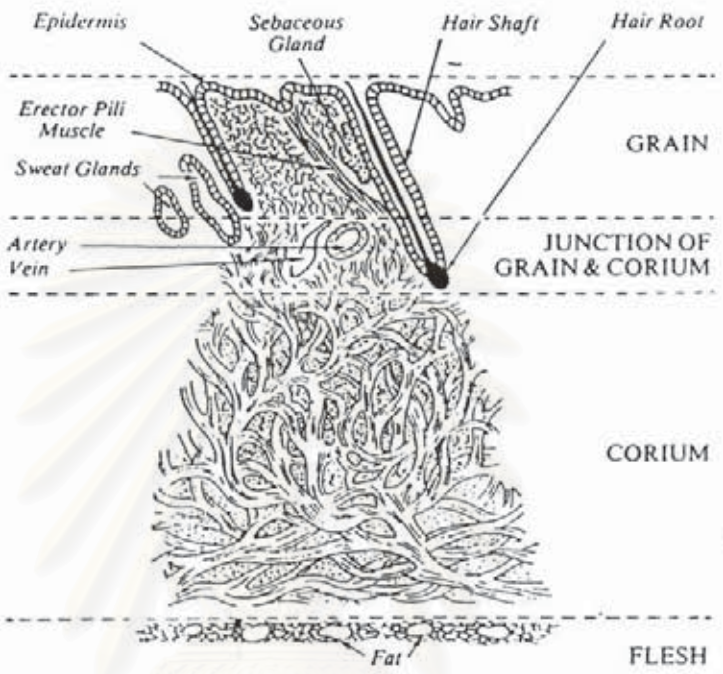
โครเมียม

โครเมียมเป็นโลหะทรานซิชั่น มีน้ำหนักโมเลกุล 51.9961 เลขอะตอม 24 จุดหลอมเหลว 1857°C ความหนาแน่น 7.19 g/cm^3 สัญลักษณ์ Cr สารประกอบโครเมียมมีเลขออกซิเดชั่นหลายค่า ตั้งแต่ +2 จนถึง +6 ที่สำคัญได้แก่ Cr^{3+} และ Cr^{6+} สารประกอบของโครเมียมส่วนใหญ่อยู่ในรูปออกไซด์ โครเมียมที่มีอยู่ในแหล่งธรรมชาติ เป็น Cr(III) อยู่ในรูปของแร่โครไมต์(Chromite; $FeO.Cr_2O_3$) มีการนำสารประกอบโครเมียมไปใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ อย่างกว้างขวาง ได้แก่ อุตสาหกรรมชุบโลหะ อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมก่อสร้าง อุตสาหกรรมสิ่งทอ และอุตสาหกรรมฟอกหนัง เป็นต้น แม้ว่าโครเมียมจะมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมต่างๆ อย่างมาก แต่ก็ไม่อาจมองข้ามความเป็นพิษของโครเมียม ซึ่งจะมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อม โดยจะมีผลกระทบต่อสุขภาพอนามัย ทั้งแบบเฉียบพลัน แบบเรื้อรัง และการกลายพันธุ์ รวมทั้งยังเป็นสารก่อมะเร็งอีกด้วย

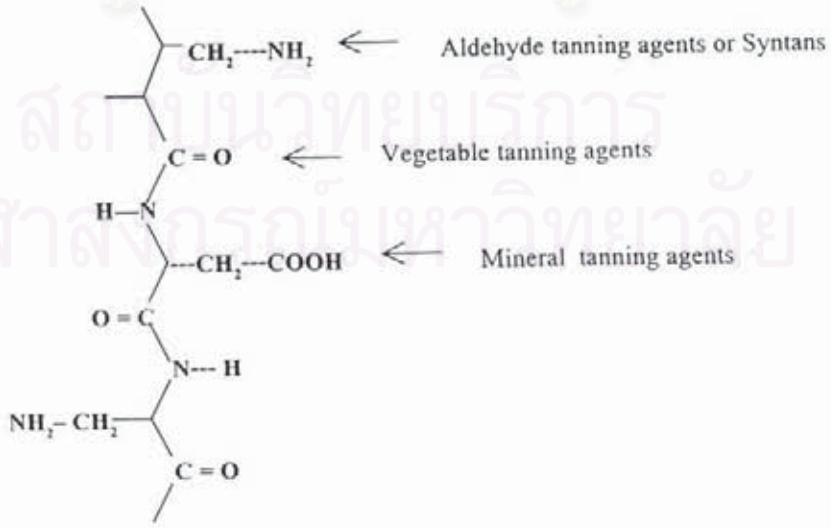
โครเมียม(VI) มีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิไดซ์ที่แรง และจะถูกรีดิวซ์ได้อย่างรวดเร็วในสภาพแวดล้อม ทั้งในดิน น้ำใต้ดิน ให้เป็นโครเมียม(III) โดยมีสารพวกเหล็กเฟอร์รัส(ferrous iron) ซัลไฟด์ที่ละลายอยู่ (dissolved sulfide) และพวกสารอินทรีย์ เป็นตัวรีดิวซ์ คุณสมบัติของโครเมียมจะขึ้นอยู่กับระดับ pH โดยสารประกอบของโครเมียม(VI) จะละลายและแพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อมได้ดี มีความเป็นพิษสูงกว่าโครเมียม(III) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาพแวดล้อมที่ค่อนข้างเป็นกรด (Rutland, 1991) และไม่มีหลักฐานยืนยันว่าโครเมียม(III) จะไม่เปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปอื่นที่ไม่เป็นพิษ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องพิจารณาถึงผลกระทบที่อาจจะเกิดขึ้น และการจัดการเศษวัสดุเหลือทิ้งที่มีโครเมียมเป็นองค์ประกอบ

องค์ประกอบของหนังสัตว์

หนังสัตว์เป็นผลิตผลพลอยได้จากโรงฆ่าสัตว์ ส่วนใหญ่เป็นหนังของโค กระบือ ซึ่งได้ชำแหละหนังแยกออกจากส่วนที่เป็นเนื้อ และนำไปหมักเกลือเพื่อรักษาสภาพหนังไม่ให้เน่าเปื่อยก่อนส่งไปโรงงานฟอกหนัง โดยทั่วไปหนังสัตว์ประกอบด้วยน้ำ 64% โปรตีน 33% ไขมัน 2% เกลือแร่ 0.5% และสารอื่นๆ อีก 0.5% โดยโปรตีนในหนังสัตว์เกือบ 80-90% เป็นโปรตีนคอลลาเจน (collagen) เคอราติน (keratin) อิลาสติน (elastin) อัลบูมิน (albumin) โกลบูลิน (globulin) และมูโคโปรตีน (mucoprotein) ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของสัตว์ด้วย โปรตีนคอลลาเจนในหนังสัตว์เป็นคอลลาเจนชนิด I (type I) ประกอบด้วย โซ่โพลีเปปไทด์ชนิดวนซ้าย 3 โซ่ มาพันกันเป็นโครงสร้างเกลียวสาม (triple helix structure) แบบวนขวา (right handed super helix) ซึ่งมีความแข็งแรง ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถดูดน้ำเข้าไว้ในโมเลกุลได้ ทำให้ แผ่นหนังพองตัวขึ้น ถ้านำไปต้มให้ความร้อน โมเลกุลคอลลาเจนจะสลายตัวได้เป็น เจลาติน (gelatin)



ภาพที่ 1 ภาพตัดขวางของหนังสัตว์ (Sharphouse, 1989)

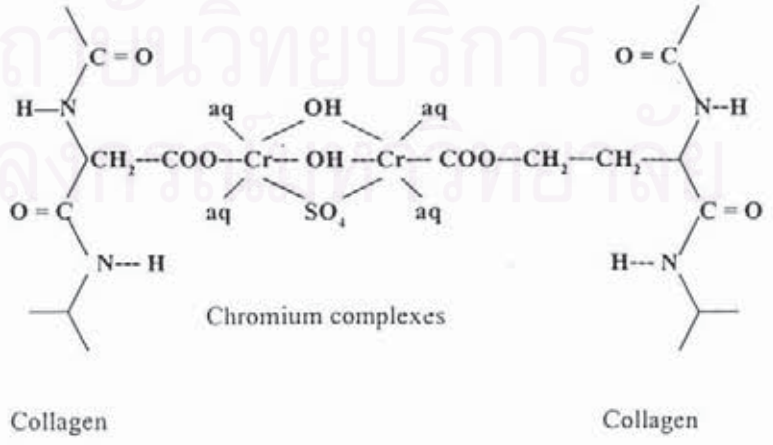


ภาพที่ 2 ตำแหน่งที่สารฟอกประเภทต่าง ๆ ทำปฏิกิริยากับคอลลาเจน (Germann , 1995)

ความรู้เกี่ยวกับการฟอกหนัง

หลักการของการฟอกหนังคือ การใช้ประโยชน์จากผิวหนังส่วนที่เรียกว่า คอเรี่ยม (corium) โดยใช้เคมีภัณฑ์ไปทำปฏิกิริยากับโปรตีนคอลลาเจน (collagen) ซึ่งเป็นสารประกอบที่สำคัญของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันคอเรี่ยม (connective tissue corium) โปรตีนคอลลาเจนมีลักษณะเป็นเส้นใย (fiber) สานกันเป็นโครงข่าย (network) เมื่อโปรตีนคอลลาเจนทำปฏิกิริยากับสารเคมีในกระบวนการฟอกหนัง จะสามารถเปลี่ยนหนังดิบ (hide) เป็นหนังฟอก (leather) ซึ่งสามารถเก็บได้นานและมีคุณสมบัติทางฟิสิกส์ดีขึ้น (สุวรงค์, 2536) การเก็บรักษาหนังสัตว์ (curing and preservation) เพื่อไม่ให้หนังเน่าเสียในระหว่างรอการขนส่งมายังโรงงานฟอกหนัง จะใช้วิธีหมักเกลือ (salt curing) โดยการแช่หนังในน้ำเกลือที่มีเกลืออยู่ร้อยละ 25-30 ของน้ำหนักหนังดิบ (Sharphouse, 1989)

การฟอกหนังมีหลายประเภทโดยสามารถแบ่งตามประเภทของสารที่ใช้ฟอกออกเป็น 4 ประเภทหลัก คือ 1) การฟอกด้วยฝาด (vegetable tannage) 2) การฟอกด้วยสารสังเคราะห์ " Syntan" (synthetic tannage) 3) การฟอกด้วยแร่ธาตุ (mineral tannage) และ 4) การฟอกด้วยอัลดีไฮด์ (aldehyde tannage) (Sharphouse,1989) ประเภทที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางคือการฟอกฝาดและการฟอกโครม(chrome tannage) ในการฟอกฝาดจะอาศัยสารสกัดแทนนินจากส่วนของพืช เช่น เปลือกไม้ ไปทำปฏิกิริยากับโปรตีนในหนังสัตว์ การฟอกฝาดจะใช้ในการผลิตหนังที่ใช้กับงานหนัก (heavy leather) เช่น ทำพื้นรองเท้า เข็มขัด เป็นต้น ส่วนการฟอกโครม จัดเป็นการฟอกด้วยแร่ประเภทหนึ่ง ซึ่งจะอาศัยการทำปฏิกิริยาของโปรตีนคอลลาเจนกับสารประกอบของโครเมียม (ภาพที่ 3) การฟอกโครมจะใช้เวลาสั้นกว่าการฟอกฝาด มักใช้ในการผลิตหนังที่ใช้กับงานเบาๆ (light leather) เช่น กระเป๋าถือ ถุงมือ ใช้หุ้มเบาะเก้าอี้ หนังที่ฟอกโครมจะนุ่ม และมีความยืดหยุ่นดีกว่า สามารถนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อื่นได้หลายประเภท (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2538)



ภาพที่ 3 การเชื่อมโยงระว่างสารประกอบของโครเมียมกับคอลลาเจน (Germann, 1995)

กรรมวิธีการฟอกหนังเริ่มจากขั้นตอนเตรียมการฟอก โดยจะนำหนังหมักเกลือมาล้างเกลือและสิ่งสกปรกออก(washing) แล้วคัดแยกหนัง(sorting and trimming) เพื่อคัดแยกเอาหนังส่วนที่ไม่ต้องการ เช่น หาง หู และหนังที่มีตำหนิออก แล้วนำไปล้างและแช่น้ำ (washing and soaking) เพื่อให้คืนสภาพธรรมชาติของหนังดิบ ต่อจากนั้นนำไปกำจัดขน โดยแช่น้ำปูนขาว (liming and unhairing) ในขั้นตอนนี้อาจจะมีการผสมโซเดียมซัลไฟด์(Na_2S) ไดเมทิลเอมีน(dimethylamine) เพื่อช่วยเร่งปฏิกิริยาด้วย หลังจากนั้นนำไปล้างและถากหนังปูน (lime fleshing) เพื่อกำจัดไขมัน และพังผืดออก แล้วนำไปตัดเพื่อให้ได้ความหนาตามต้องการ (lime splitting) และเล็ม (trimming) แล้วจึงนำไปล้างปูนออก และทำให้หนังนุ่มขึ้น (deliming and bating) ก่อนนำเข้าสู่กระบวนการฟอกหนังประเภทต่างๆต่อไป โดยหนังที่ล้างปูนแล้วจะนำไปดองกรด (pickling) เพื่อทำลายฤทธิ์ด่าง และปรับให้มี pH ตามต้องการ แล้วเติมสารฟอกโครม (chrome) เช่น chromic sulfate ($Cr_2(SO_4)_3$), potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) เพื่อเปลี่ยนสภาพหนังไม่ให้เน่าเปื่อย หนังที่ฟอกได้ในขั้นนี้จะมีสีฟ้า เรียกว่าหนัง "wet blue" หลังจากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนการตัดหนังและขั้นตอนการขูดบาง (shaving) เพื่อปรับให้หนังมีความหนาตามต้องการ แล้วจึงนำไปฟอกทับ (retanning) ย้อมสี (dyeing) ใส่น้ำมัน (fat liquoring) และนำไปอบแห้ง (drying) แล้วทำให้หนังนุ่ม (stacking) ทำการขัดผิว (buffing) และตกแต่ง (finishing) แล้วจะได้หนังฟอกสำเร็จรูป (leather) กรรมวิธีการผลิตหนังสำเร็จรูปแสดงในภาพที่ 4

กระบวนการฟอกหนังมีเศษวัสดุเหลือทิ้ง คือ เศษหนัง สามารถแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ 1) เศษหนังก่อนผ่านกระบวนการฟอก หรือ "เศษหนังกาว" และ 2) เศษหนังหลังผ่านกระบวนการฟอก ในส่วนของเศษหนังกาวสามารถนำไปผลิตอาหารสัตว์ ซึ่งมีโปรตีนสูงถึงร้อยละ 70 (อำพล, 2525) นอกจากนี้ยังสามารถนำไปผลิตกาวปุ๋ยหมัก และ เจลาตินได้

เศษหนังกาวแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่

1. เศษหนังกาวชั้น 1 หมายถึง เศษหนังที่ได้มาจากขั้นตอนการตัดหนัง (splitting) เป็นหนังท้องที่ถากเอาพังผืด ไขมันออกแล้ว เหลือแต่โปรตีนคอลลาเจนเท่านั้น สามารถนำไปผลิตเจลาตินได้ดี
2. เศษหนังกาวชั้น 2 หมายถึง เศษหนังที่ได้จากการเฉือนส่วนหู หัว หาง และเล็บออกก่อนนำเข้าสู่กระบวนการฟอก มักเรียกว่า "เศษหนังกาวดิบ"
3. เศษหนังกาวชั้น 3 หมายถึง เศษหนังที่ได้มาจากการถาก (fleshing) จะเป็นพวก adipose tissue และส่วนที่ติดกับ corium ซึ่งจะมีทั้งไขมันและโปรตีนผสมกันอยู่ เศษหนังกาวชั้นนี้ในต่างประเทศเรียก "glue stock"

สำหรับเศษหนังที่ผ่านการฟอกโครม ซึ่งมีกว่าร้อยละ 20 ของปริมาณหนังดิบทั้งหมด (Othmer, 1981) โดยได้มาจากขั้นตอนต่างๆ หลังฟอกโครม เช่น การขูดบาง (shaving) การเล็ม (trimming) การขัดผิว (buffing) โดยประมาณครึ่งหนึ่งของเศษหนังที่ผ่านการฟอกโครมนี้จะมาจากขั้นตอนการขูดบาง ที่เรียกว่า "chrome shavings" ซึ่งจัดเป็นขยะอันตราย เนื่องจากมีโครเมียมเป็นส่วนประกอบอยู่ถึง 1-8% ของน้ำหนักแห้ง (Zhuang, 1992) ซึ่งไม่สมควรนำไปทิ้งรวมกับขยะทั่วไป หรือนำไปใช้ประโยชน์โดยตรง ดังนั้นจึงควรหาวิธีที่เหมาะสมในการจัดการกับเศษหนังเหล่านี้ เช่น ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต (recycling) เช่น ผลิตแผ่นหนังไฟเบอร์(leather fiberboard) รวมทั้งการนำโครเมียมและโปรตีนกลับมาใช้ประโยชน์ในการฟอกหนัง จะมีเศษหนังเหลือทิ้งจากขั้นตอนต่างๆ เป็นจำนวนมาก แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณกากของเสียจากขั้นตอนต่างๆ ในกระบวนการฟอกหนัง (กิโลกรัมต่อ 1,000 กิโลกรัม หนังดิบหมักเกลือ)

Trimmings	120	
Fleshings	70-230	
Chrome shavings	99	
Chrome split waste	115	
Buffing dust	2	
Finished trimmings	32	
Solids in treatment sludge	120	(corresponding to 250-1,800 kg wet sludge resulting from 75 % removal efficiency)
Total	688-848	

ที่มา: Department of Environment , UK (UNEP-IE/PAC ,1994)

การใช้ประโยชน์จากเศษหนัง

เนื่องจากมาตรการในการลดผลกระทบด้านสิ่งแวดล้อม จึงได้พยายามคิดค้นวิธีกำจัดและการใช้ประโยชน์เศษหนังดังกล่าว โดยการกำจัดเศษหนัง การแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ตลอดจนการนำโครเมียมและโปรตีน กลับมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิต (recycle)

การใช้ประโยชน์จากเศษหนังโดยตรง โดยไม่ผ่านกระบวนการกำจัดโครเมียม เช่น การนำ leather scraps ไปทำปฏิกิริยากับ โพลีไอโซไซยาเนต เพื่อผลิตฉนวนไฟฟ้า และวัสดุก่อสร้าง การนำ shaving ไปผสมกับ hydrophilic acrylate เพื่อผลิตแผ่นไฟเบอร์(fibrous sheet) หรือผสมกับไวนิลอะซิเตท เพื่อผลิตพื้นรองเท้า รวมทั้งใช้แทนกระดาษ ในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ

การเผาเศษหนัง ที่อุณหภูมิสูง ซึ่งจะทำให้ได้ขี้เถ้าของโครเมียมสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมเกลือไบโครเมต หรือเป็นแหล่งโครเมียม

การนำกลับโครเมียมโดยอาศัย ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นด้วยอากาศ โดยใช้สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือใช้คลอรีน ในสภาวะที่เป็นด่างเล็กน้อยทำปฏิกิริยากับเศษหนัง เพื่อออกซิไดซ์ โครเมียม(III) ในรูป chromate ไปเป็นโครเมียม (VI) ในรูป peroxochromate แต่ข้อเสียก็คือ โครเมียม (VI) ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา ทำให้ต้องเพิ่มขั้นตอนการรีดิวซ์ (Cot และคณะ , 1991)

การย่อยสลายเศษหนังด้วยกรดซัลฟุริก จะได้สารละลายที่มีโครเมียมอยู่ ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นสารฟอกทับ (retanning agent) ส่วนกรดอะมิโนสามารถนำมาใช้เติมในอาหารสัตว์ได้ นอกจากนี้สารละลายที่ได้จากการย่อยสลาย จะสามารถใช้เป็น fat liquors , surfactants และใช้เป็น fillers ในกระบวนการผลิตหนังฟอก ส่วนการใช้กรดอินทรีย์ เช่น กรดอะคริลิก (acrylic acid) ในการเตรียม โอลิโกเปปไทด์ (Oligopeptides) โดยจะทำให้ไฮโดรไลเสตโปรตีนเกิดไดโพลิเมอร์ ของไวนิลโพลิเมอร์ เพื่อใช้เป็น fillers สำหรับแผ่นหนัง (leathers)

การย่อยสลายเศษหนังด้วยด่าง เพื่อแยกตะกอนโครเมียม ออกจากสารละลายโปรตีนโดยใช้การต้มกับ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ จะได้ตะกอนโครเมียมไฮดรอกไซด์ แต่ถ้าใช้ด่างเป็นแอมโมเนีย ตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตที่ได้จะสามารถใช้ทำปุ๋ยได้ เมื่อนำตะกอนโครเมียมไปละลายด้วยกรดซัลฟุริกจะได้สารละลายโครเมียมซัลเฟต นำไปใช้ในขั้นตอนการดองกรด (pickling)ได้

เศษหนังมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลักกว่าร้อยละ 70 หากสามารถนำโปรตีนกลับมาใช้ในการผลิตอาหารสัตว์ได้ จะเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญมากแหล่งหนึ่ง โดยปกติในการผลิตอาหารสัตว์ วัตถุดิบที่จะใช้เป็นแหล่งโปรตีนควรมีโปรตีนไม่น้อยกว่าร้อยละ 20 ในการใช้โปรตีนจากเศษหนัง เพื่อเป็นอาหารสัตว์ นอกจากจะต้องคำนึงถึงปริมาณโปรตีนแล้ว ยังต้องคำนึงถึงกรดอะมิโน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของโปรตีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดอะมิโนที่จำเป็น(essential amino acids) สำหรับสัตว์ด้วย กรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับสัตว์ มีอยู่ทั้งหมด 10 ตัว ซึ่งสัตว์กระเพาะเดี่ยว ไม่สามารถสังเคราะห์เองได้ จำเป็นต้องได้รับจากอาหาร ยกเว้นพวกสัตว์เคี้ยวเอื้องที่อาศัยจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารช่วยสังเคราะห์ (พันทิพา, 2538) กรดอะมิโนทั้ง 10 ตัว แสดงในตารางที่ 2

การไฮโดรไลซ์โปรตีน (protien hydrolysis) ด้วยกรดหรือด่าง (acid or alkali hydrolysis) หรือสภาวะที่รุนแรง หรือการใช้ความร้อนสูง จะมีผลต่อการนำไปใช้ได้ของโปรตีน (protein availability)ลดลง (อภิศักดิ์,2538) ดังนั้นการไฮโดรไลซ์โปรตีนในเศษหนัง เพื่อนำไปผลิตอาหารสัตว์ จึงพิจารณาการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) โดยจะใช้โปรติโอไลติกเอนไซม์ (proteolytic enzyme) หรือเอนไซม์โปรติเอส (protease) ซึ่งจะมีความจำเพาะ (specificity) ในการย่อยสลาย เพื่อสกัดโครเมียมออกไปโดยไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ (denature) ซึ่งจะทำให้ได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูง และอาจจะสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งโปรตีนสำหรับการผลิต หรือเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เช่น ปุ๋ย เครื่อง

สำอาง เป็นต้น นอกจากการใช้ประโยชน์จากโปรตีนแล้ว ตะกอนของโครเมียมยังสามารถนำกลับมาใช้ในกระบวนการฟอกหนังได้อีก เช่น ใช้ในการดองหนัง(pickling) หรือการฟอกโครม (tanning)

ตารางที่ 2 กรดอะมิโนที่จำเป็น (Essential amino acids) สำหรับสัตว์

กรดอะมิโน	ตัวย่อ
Threonine	Thr
Tryptophan	Trp
Valine	Val
Arginine	Arg
Histidine	His
Isoleucine	Ile
Leucine	Leu
Lysine	Lys
Phenylalanine	Phe
Methionine	Met

วัตถุดิบอาหารสัตว์

วัตถุดิบที่เป็นแหล่งของโปรตีนสำหรับการผลิตอาหารสัตว์ สามารถแบ่งเป็น 5 แหล่งใหญ่ๆ คือ

1) โปรตีนจากพืช ได้แก่ ธัญพืช เมล็ดพืช ใบพืชตระกูลถั่ว และเศษวัสดุการเกษตร เช่นกากถั่วเหลือง กากเมล็ดฝ้าย กากถั่วลิสง กากเมล็ดทานตะวัน มันสำปะหลัง ใบกระถิน ข้าวโพด
2) โปรตีนจากสัตว์ เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตของสัตว์ที่มนุษย์ไม่บริโภค เช่น หางนม ปลาป่น เลือดป่น กระดูกป่น เปลือกกุ้ง หอย และปู ขนไก่ป่น
3) โปรตีนจากสิ่งมีชีวิตเซลเดียว (single cell protein) เช่น ยีสต์
4) Nonprotein nitrogen (NPN) เช่น ยูเรีย
5) Synthetic amino acid (กรดอะมิโนสังเคราะห์) เช่น L-Lysine , DL-Methionine

การนำเอาโปรตีนจากพืชมาใช้แม้ว่าราคาจะถูก แต่จะมีข้อจำกัด เนื่องจากพืชเหล่านั้นยังคงมีสารที่เป็น Anti-nutritional factors หรือ Toxic substances ซึ่งบางตัวจะยับยั้งการย่อยได้ของสัตว์ ทำให้สัตว์โตช้าแคระแกร็น ให้ผลผลิตลดลง และถ้าได้รับมากเกินไป อาจทำให้สัตว์ตายได้ การใช้ความร้อนอาจทำลายสารพิษเหล่านั้นได้แต่ก็จะมีผลต่อการนำไปใช้ได้ของโปรตีนลดลง นอกจากนี้การใช้โปรตีนจากพืชที่ให้พลังงานต่ำจะทำให้อัตราการแลกเนื้อเลวลง

การใช้เศษหนังเพื่อการผลิตอาหารสัตว์ พิจารณาในแง่แร่ธาตุที่จำเป็นสำหรับสัตว์ ซึ่งมีประมาณ 15- 16 ธาตุ (ทวี , 2527) แร่ธาตุเป็นสารอาหารที่สัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์เองได้ แร่ธาตุทั้งหมดจึงต้องได้รับจากอาหาร โดยทั่วไปจะแบ่งแร่ธาตุตามปริมาณที่มีอยู่ในร่างกายสัตว์ออกเป็น 2 พวก คือ

1. Macroelements คือแร่ธาตุที่มีอยู่มากในร่างกายสัตว์ ได้แก่ แคลเซียม ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม โซเดียม คลอรีน กำมะถัน และ แมกนีเซียม

2. Trace elements คือแร่ธาตุที่มีอยู่น้อยในร่างกายสัตว์ แต่ก็มีความจำเป็นต่อสัตว์เช่นกัน ได้แก่ ธาตุเหล็ก สังกะสี ทองแดง แมงกานีส ไอโอดีน โคบอลท์ โมลิบดินัม ซีลีเนียม และโครเมียม

แม้ว่าโครเมียมจะเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต แต่มีเอกสารรายงานว่า โครเมียมเป็นธาตุที่จำเป็นสำหรับหนู เพื่อให้มีการใช้ประโยชน์จากกลูโคสเป็นไปตามปกติ เนื่องจากโครเมียมทำหน้าที่เป็น cofactor ของฮอร์โมนอินซูลิน นอกจากนั้นโครเมียมอาจมีหน้าที่ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต และไขมันด้วย พบว่าถ้าอาหารหนูมีโครเมียม 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักสด) จะทำให้การเจริญเติบโตปกติ และถ้าเสริมโครเมียมอะซิเตต(chromium acetate) ลงไปอีก จะทำให้การเจริญเติบโตเร็วขึ้น (ศรีสกุล และรณชัย , 2539) แต่ถ้าให้โครเมียม ในอาหารในระดับ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักแห้ง) จะทำให้การเจริญเติบโตลดลง ตับและไตจะถูกทำลาย (McDonald และคณะ, 1981)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เศษหนังที่มีโครเมียมเป็นองค์ประกอบ(chrome-containing leather) สามารถนำไปสกัดโครเมียมออกได้ โดยอาศัยความสามารถในการละลาย(solubility)ของโปรตีน ในสารละลายของเกลืออัลคาไลน์-เอิร์ธ (alkaline-earth) และอาศัยคุณสมบัติการตกตะกอนของโครเมียม ในสภาวะด่าง เนื่องจากโปรตีนจะละลายได้ดีในสารละลายที่มีเกลือเล็กน้อย ที่เรียกว่าปรากฏการณ์ "salting in" ส่วนโครเมียม(III) สามารถตกตะกอนได้ที่สภาพเป็นกลางหรือเป็นด่างเล็กน้อย และจะละลายได้น้อยที่สุดคือ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ pH ประมาณ 8.5 (ศศิธร และคณะ, 2536) ในช่วง pH 9 - 11 โครเมียมจะยังคงสภาพเป็นของแข็งที่ไม่ละลาย ในรูปของโครเมียมไฮดรอกไซด์ ($Cr(OH)_3$) และที่ pH สูงกว่า 12 จะทำให้โครเมียมเปลี่ยนเป็นโครไมต์(CrO_2^-) ที่สามารถละลายน้ำได้เช่นกัน (Zhuang,1992)

เยาวนุช (2536) ศึกษาประสิทธิภาพการตกตะกอนโครเมียมจากน้ำเสียโรงงานฟอกหนัง โดยใช้สารเคมีประเภทด่าง 3 ชนิด คือแมกนีเซียมออกไซด์ (MgO) โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) และปูนขาว ร่วมกับแมกนีเซียมออกไซด์ pH ที่เหมาะสมคือ 8.6, 8.2 และ 7.5 ตามลำดับ พบว่าประสิทธิภาพการตกตะกอนโครเมียมใกล้เคียงกันคือ 98-100 % และการใช้ปูนขาวร่วมกับแมกนีเซียมออกไซด์จะเสียค่าใช้จ่ายน้อยที่สุดคือประมาณ 55 บาทต่อลูกบาศก์เมตร และเมื่อศึกษาการละลายของตะกอนผลึกโครเมียมที่ได้ด้วยกรดซัลฟุริก ให้เป็นสารละลายโครเมียม (III) ซัลเฟต เพื่อการนำกลับมาใช้ในการฟอกโครม โดยใช้สารละลายกรดซัลฟุริกเจือจาง 1:4 พบว่าตะกอนผลึกโครเมียมจะละลายได้ที่ pH ต่ำกว่า 3.5 และการเติมกรดมากขึ้น หรือเพิ่มอุณหภูมิ จะไม่ช่วยทำให้ประสิทธิภาพการนำกลับสูงขึ้น และยังทำให้มี pH ต่ำเกินไป

ด้วย การนำกลับโครเมียมจากการละลายตะกอนผลึกประเภทต่างๆ มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน อยู่ในช่วง 70-90%

ปกรณ์ (2532) ศึกษาคุณสมบัติและการทำให้บริสุทธิ์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย ที่สามารถผลิตได้ทั้งนิวทรัลโปรติเอส และอัลคาไลน์โปรติเอสโดยเปรียบเทียบกับ *Bacillus licheniformis* ATCC 21415 ซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐาน พบว่าเชื้อทั้งสองสามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้ไม่แตกต่างกัน และจากการศึกษาสมบัติทางกายภาพ เคมีจลศาสตร์ ความจำเพาะ ในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์เปรียบเทียบกับเอนไซม์มาตรฐานคือ Subtilin Carlberg และ Subtilin BPN พบว่ามีความจำเพาะในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์เหมือนกัน อัลคาไลน์โปรติเอสที่ได้สามารถทำงานได้ในช่วง pH 7-11 และมีแอคติวิตีสูงสุดที่ pH 10.5

เกษม (2536) ศึกษาการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส จาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในระดับขวดเขย่า โดยใช้แหล่งวัตถุดิบจากธรรมชาติเป็นแหล่งอาหาร พบว่ากากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสได้ และ pH ที่เหมาะสมสำหรับตรวจวัดการทำงานของอัลคาไลน์โปรตีเอส คือ pH 10.5 ที่อุณหภูมิ 45°C

ดวงหทัย (2539)ได้นำอัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตได้จาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 มาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงยางพาราแผ่นให้มีคุณภาพดีขึ้น โดยการลดปริมาณโปรตีนในน้ำยาง พบว่า อัลคาไลน์โปรติเอส สามารถนำมาใช้ลดโปรตีนในน้ำยางสดและน้ำยางข้น 60% ได้ โดยสามารถลดโปรตีนในน้ำยางข้นได้ดีกว่าในน้ำยางสดคิดเป็น 1.5 เท่า การปรับปรุงคุณภาพยางพารา โดยใช้เอนไซม์เทคโนโลยีเป็นวิธีการที่ช่วยรักษาสภาพน้ำยางให้มีสภาพปกติและไม่มีผลต่อโครงสร้างของยางพาราโดยส่วนรวม ซึ่งเป็นวิธีที่ได้เปรียบกว่าการกำจัดโปรตีนโดยใช้สารลดแรงตึงผิวหรือการใช้ด่าง

วรรณวิมล (2540) ศึกษาการขยายส่วนการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร เพื่อพัฒนาสู่การผลิตในเชิงการค้า พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดประมาณ 159,215 หน่วย ต่อปริมาตรทั้งหมด 3.5 ลิตร ในชั่วโมงที่ 84

อำพล และ โชติ (2525) ศึกษาการบีบอัดเศษหนังกาวชั้น 3 เพื่อกำจัดเกลือโซเดียม(Na_2S) และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($Ca(OH)_2$) ด้วยเครื่อง Thermal Hydraulic Press ภายใต้ความดันไอน้ำ 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (เกจ) จะสามารถนำกลับโปรตีนได้กว่า 70% เศษหนังที่ผ่านการบีบอัดจะนำไปอบแห้งแล้วบดให้ละเอียดสำหรับใช้เป็นอาหารโปรตีนสำหรับสัตว์ได้ ส่วนของเหลวที่ออกจากเครื่องบีบอัดจะมีไขมันสามารถแยกออกและนำไปใช้ในรูปไขมันดิบ (raw grease)

Okamura (1976) ศึกษาการนำกลับโครเมียมจากเศษหนังที่ได้จากขั้นตอนการขูดบาง (chrome shaving) โดยวิธีออกซิไดซ์ด้วยอากาศในสภาวะที่ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ กรดซัลฟุริก โดยให้เศษหนังทำปฏิกิริยา กับโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 80% โดยน้ำหนักแห้งของเศษหนัง จะได้สารละลายโปรตีนที่มีโครเมียม(VI) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งสามารถแยกโครเมียม (VI) ออกได้ โดยการใช้เรซินแลก

เปลี่ยนประจุ (Ion exchange resin) และการออกซิไดซ์ด้วยกรดซัลฟุริก (H_2SO_4) 10-20 % จะได้ตะกอนโครเมียมซึ่งมีสีน้ำตาลเหมือนทราย และสามารถแยกออกโดยการกรอง

Zhuang (1992) ศึกษาการย่อยสลายโปรตีนที่อยู่ในเศษหนังที่ได้จากขั้นตอนการขูดบาง ด้วยสารละลายของปูนขาว หรือแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ที่ 100°C ในภาวะที่ใช้ปูนขาว (CaO)ในปริมาณที่แตกต่างกันในช่วง 0.6-1.6 กรัมต่อเศษหนัง 10 กรัม จะได้โปรตีนอยู่ในช่วง 60-70 % และมีโครเมียมอยู่ในช่วง 0.37 - 6.00 ppm ตะกอนที่เหลือจากการย่อยโปรตีนนี้ประกอบด้วยโครเมียมและโปรตีนที่ไม่ถูกย่อย ซึ่งจะนำไปสกัดโครเมียมต่อด้วยกรดซัลฟุริก 1:4 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จะได้ตะกอนโปรตีนสามารถนำไปใช้ทำปุ๋ย และส่วนสารละลายของโครเมียมซัลเฟตทำให้เป็นกลางได้ โดยเติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ซึ่งสามารถนำกลับไปใช้ในกระบวนการฟอกหนังได้อีก

Parvathi และ Nandy (1984) ศึกษาการไฮโดรไลซ์โปรตีนจากเศษหนังฟอกประเภทต่างๆ ด้วย Actinomycetes ในดิน พบว่าจะได้ผลดีที่สุดกับเศษหนังฟอกฝาด เนื่องจาก Actinomycetes จะไวต่อสารสังเคราะห์ Syntans และโครเมียม เมื่อใช้โปรติโอไลติคเอนไซม์ การไฮโดรไลซ์จะสมบูรณ์ขึ้น ไฮโดรไลเสตโปรตีนที่ได้จะประกอบด้วยกรดอะมิโนและแทนนิน ซึ่งสามารถบำบัดเพื่อนำไปใช้ทำปุ๋ย หรือส่วนผสมในอาหารเป็ดไก่ (poultry feed) ได้

Taylor และคณะ(1990) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายโปรตีนในเศษหนังจากขั้นตอนการขูดบางด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส เพื่อการนำกลับโครเมียมและโปรตีนโดยการแปรผันปริมาณปูนขาว ปริมาณเอนไซม์ อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ พบว่า การใช้ปูนขาว 5-6 % , เอนไซม์ ALKALASE™ 6 % ที่อุณหภูมิ 60-65 °C ใช้เวลา 120 นาที สามารถละลายโปรตีนในเศษหนังได้ 76 % แล้วกรองเพื่อแยกตะกอนโครเมียมออกจากไฮโดรไลเสตโปรตีน พบว่าไฮโดรไลเสตโปรตีนที่ได้มีโครเมียมอยู่น้อยกว่า 4.5 ppm และถ้าใช้เอนไซม์ลดลงเหลือเพียง 1 % จะทำให้โปรตีนละลายได้ถึง 65 % ในขณะที่การทดลองควบคุม (ไม่เติมเอนไซม์) จะละลายโปรตีนได้เพียง 20 %

Taylor และคณะ (1991) ศึกษาการแปรผันชนิดต่างที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เพื่อการปรับปรุงความสามารถในการละลายของเศษหนัง โดยพยายามลดปริมาณการใช้เอนไซม์ เพื่อความคุ้มทุน โดยศึกษาการใช้ MgO เพียงชนิดเดียว หรือใช้ร่วมกับ $Ca(OH)_2$, NaOH หรือ Na_2CO_3 พบว่าการใช้ MgO 5 % และใช้เอนไซม์เพียง 1 % จะทำให้โปรตีนละลายได้ถึง 80 % และการเติมเอนไซม์ 1-2 % แบบเติมหลายครั้ง (multiple feed) จะมีประสิทธิภาพดีกว่าการเติมเอนไซม์ 6 % แบบเติมครั้งเดียว (single feed) การใช้ MgO ร่วมกับ $Ca(OH)_2$ จะสามารถช่วยลดต้นทุน เนื่องจาก MgO มีราคาแพงกว่า $Ca(OH)_2$ ผลการใช้ MgO ร่วมกับ $Ca(OH)_2$ ไม่แตกต่างจากการใช้ MgO เพียงอย่างเดียว ทั้งในด้านความสามารถในการละลายโปรตีนและปริมาณการใช้เอนไซม์ ส่วนการใช้ MgO 1 %ร่วมกับ NaOH 4 % หรือการใช้MgO 1 % ร่วมกับ Na_2CO_3 10 % โดยใช้เอนไซม์ 3 % และ 1 % ตามลำดับ จะสามารถละลายโปรตีนได้ 84 %และ 81 % ตามลำดับ ในขณะที่การใช้ NaOH 4 % หรือ Na_2CO_3 10 % เพียงอย่างเดียวจะสามารถละลายโปรตีนได้

70 % และ 77 % ตามลำดับ แต่การใช้ NaOH จะลดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ ทำให้ต้องใช้เอนไซม์ปริมาณสูงขึ้น

Taylor และคณะ (1992) ศึกษาการย่อยสลายโปรตีนในเศษหนังด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส โดยการเตรียมตัวอย่างเศษหนังในน้ำปริมาณที่มากพอ ที่อุณหภูมิ 60-85°C และเติมเกลืออัลคาไลน์-เอิร์ธ และหรือเกลืออัลคาไลน์ เพื่อปรับสารละลายให้อยู่ในช่วง pH 8-12 และเติมALKALASE™ 3% โดยน้ำหนัก กวนของผสมเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ หลังจากนั้นแยกไฮโดรไลเซทโปรตีนออกจากตะกอนโครเมียม พบว่าไฮโดรไลเสตโปรตีนที่ได้มีโครเมียมอยู่น้อยกว่า 1 ppm. และไม่มีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของกรดอะมิโนเมื่อเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนของคอลลาเจน

Taylor และคณะ(1993)แสดงผลการสกัดโปรตีนเจลจากเศษหนังโดยใช้เอนไซม์ ALKALASE ™ 0.1 % โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 71 องศาเซลเซียส โดยการไฮโดรไลซ์ในสารละลายของเกลือ MgO ความเข้มข้น 6 % และ MgO ความเข้มข้น 3 % ร่วมกับ NaOH ความเข้มข้น 3 % จะสามารถนำโปรตีนกลับคืนมาได้ 47 % และ65 % ตามลำดับ

Taylor และคณะ(1994) แสดงผลการสกัดโปรตีนจากเศษหนังแบบ 2 ขั้นตอน (two step process) โดยใช้เอนไซม์ ALKALASE ™ 0.1 % โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 70-72 องศาเซลเซียส โดยการไฮโดรไลซ์ในสารละลายของเกลือ MgO ความเข้มข้น 6 % และ MgO ความเข้มข้น 4 % ร่วมกับ NaOH , KOH, Na_2CO_3 หรือ K_2CO_3 ความเข้มข้น 1 % หรือ MgO ความเข้มข้น 3 %ร่วมกับ NaOH , KOH, Na_2CO_3 หรือ K_2CO_3 ความเข้มข้น 2 % พบว่าโปรตีนเจลที่ได้จากขั้นตอนแรกเมื่อใช้ MgO 6% จะมีโครเมียม 55 ppm และปริมาณโครเมียมจะสูงขึ้นเมื่อใช้ NaOH หรือ KOH คือมีโครเมียม อยู่ในช่วง 67-126 ppm แต่การใช้ Na_2CO_3 หรือ K_2CO_3 ไม่ให้ผลแตกต่างจากการใช้ MgO เพียงอย่างเดียว และปริมาณโครเมียมในส่วนของไฮโดรไลเสตโปรตีน ที่ได้จากขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เมื่อใช้ MgO 6% มีค่า 5 ppm และ เมื่อใช้ MgO 3 % ร่วมกับ NaOH หรือ KOH 2 % จะมีโครเมียมอยู่ 14 และ 10 ppm ตามลำดับ และการใช้ MgO เพียงอย่างเดียว ให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้ MgO ร่วมกับ Na_2CO_3 หรือ K_2CO_3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์

3.1 ครุภัณฑ์

ครุภัณฑ์	รุ่นที่ผลิต	บริษัท/ประเทศที่ผลิต
1. เครื่องวัดและบันทึกการดูดกลืนแสง (U.V. Spectrophotometer)	DU 650	Beckman, U.S.A.
2. เครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Refrigerate centrifuge)	J-21C	Beckman, U.S.A.
3. เครื่องเหวี่ยงตกตะกอนแบบตั้งโต๊ะ (Bench-top centrifuge)	H-103 N Series	Kokusan, Japan
4. เครื่องเขย่าให้อากาศควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำ (Gyrotary water bath shaker)	G 76D	New Brunswick Scientific, U.S.A.
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-Meter)	PHM 83 Autocal	Radiometer, Denmark
6. เครื่องชั่งสารอย่างละเอียด	AE-200S	Mettler Instrument AG., Switzerland
7. เครื่องตัดเฉือนความเร็วสูง (Blender)	X13	Molinex, France
8. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน (Kjeldatherm)		Gerhardt, Germany
9. เครื่องระเหยน้ำอุณหภูมิต่ำ (Lyophilizer)	Lyph-Lock 1L	LABCONCO, U.S.A.
10. เครื่องสกัดซอกฮ์เลต (Soxlet extraction)		LABCONCO, U.S.A.
11. เครื่องอะตอมมิกแอบซอร์ปชั่น (Atomic absorption Spectrophotometer)	929 AA Spectrometer	UNICAM, England
12. เตาเผา (Muffle fumace)	Thermolyne Furnatrol II CP-13310	Sybron Corporation, U.S.A.
13. Thimble ขนาด 22 mm × 80 mm		Whatman, U.S.A.
14. Dialysis tubing		Sigma, U.S.A.

3.2 เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัท / ประเทศ
Boric acid	Merck, Germany
Potassium hydrogen phthalate	
Potassium dichromate	
Perchloric acid	
Sodium potassium tartrate	
Calcium hydroxide	
Calcium standard solution	
Chromium standard solution	
Magnesium standard solution	
Lantanum oxide	
Sodium thiosulphate pentahydrate	
Magnesium hydroxide	Carlo Erba Codex , Italy
Ammonium sulfate	
Copper sulfate pentahydrate	
Potassium sulfate	
Sodium carbonate	
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	
Petroleum ether	Mallinckrodt , U.S.A.
Phosphoric acid	
Sodium hydrogen carbonate	BDH Chemicals Ltd., England
Starch soluble	
Nitric acid	
Hydrochloric acid	
Casein Hammarsten	
L-tyrosine	
Magnesium oxide	Riedel -de Haen , Germany
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma Chemical Co,Ltd., U.S.A.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมี	บริษัท / ประเทศ
Sulfuric acid	J.T. Baker Chemicals, U.S.A.
Trichloroacetic acid (TCA)	Fluka AG. Buch , Switzerland
Sodium hydroxide	Eka Nobel , Sweden
Potassium iodide	AJAX Chemicals , Australia
Phenolphthalene	May & Baker Ltd., England

3.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

เศษหนังวัวที่ผ่านการฟอกโครม จากขั้นตอนการขูดบาง (chrome shaving) ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานฟอกหนังของ องค์การฟอกหนัง กล้วยน้ำไท กรุงเทพ

3.4 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

Bacillus subtilis TISTR 25 ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย TISTR (Thailand Institute of Scientific and Technological Research) Culture Collection เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

- สารละลายกรดไตรครอโรอะซิติก 10 เปอร์เซ็นต์

ชั่งกรดไตรครอโรอะซิติก 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

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลาย E : สารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์

ประกอบด้วยสารละลาย A 100 มิลลิลิตร สารละลาย B 1 มิลลิลิตร และสารละลาย C 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 เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 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 โครเมียม 1,000 มิลลิกรัม ต่อลิตร
- สารละลายมาตรฐาน แคลเซียม 1,000 มิลลิกรัม ต่อลิตร
- สารละลายมาตรฐาน แมกนีเซียม 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 แล้วจึงนำไปเปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนจากกราฟมาตรฐาน

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 เปิดสวิทช์ของจานให้ความร้อน (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 เพื่อหาปริมาณเอนไซม์ที่เพียงพอสำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อ *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 เติมอัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตโดยเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 ในปริมาณที่เหมาะสม (จากข้อ 4.9.1) แล้วนำไปเขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 30, 37 และ 45°C แล้วยกออกจากเครื่องเขย่าเก็บของผสมไว้ 1 คืน ในตู้เย็น แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เพื่อแยกสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีน 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 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีน ได้แก่ pH และ ปริมาณของแข็งทั้งหมด โดยใช้วิธี ASTM (D 4906-95)

4.11.1 การหาปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS)

ปิเปตตัวอย่างสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีน (hydrolysate protein 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 ทำสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีนให้เป็นผงแห้ง 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)

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

บทที่ 5

ผลการทดลอง

5.1 การเตรียมอัลคาไลน์โปรติเอสให้บริสุทธิ์บางส่วน

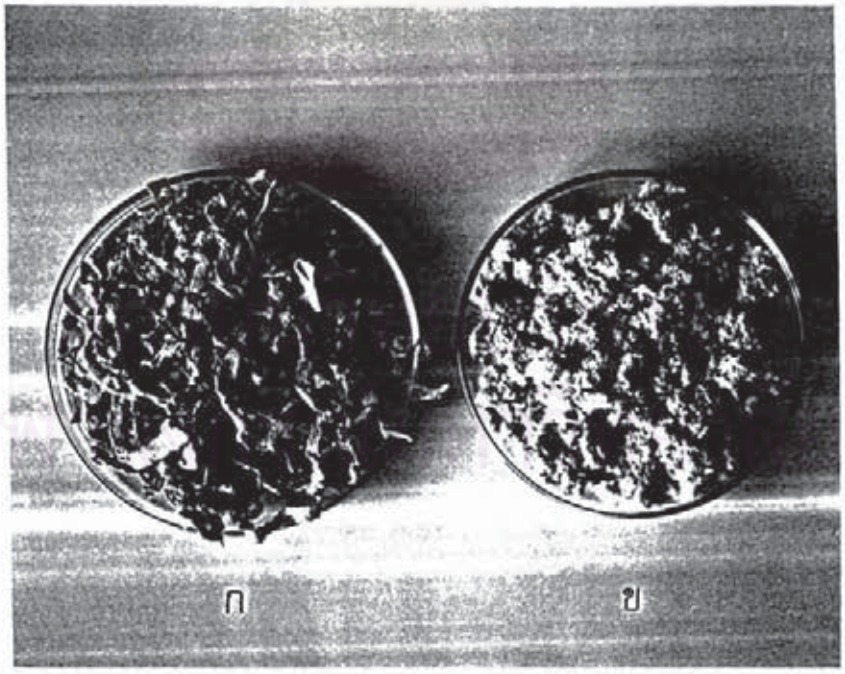
การแยกอัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่ชั่วโมงที่ 84 โดยการปั่นแยกเอาเฉพาะส่วนน้ำใส ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่เรียก "crude enzyme" มาหาค่าแอคติวิตี ของอัลคาไลน์โปรติเอส ได้ 366.21 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1.94 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 188.77 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นนำ crude enzyme มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยการตกตะกอนด้วย 70% แอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำไปปั่นตกตะกอน ละลายตะกอนด้วยสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 10.5 แล้วทำ dialyzed ในสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 10.5 เพื่อเอาเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออก นำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นไปทำให้เป็นผงแห้ง โดยวิธีการระเหิดแห้ง (Lyophilization) ปริมาณเอนไซม์ผงที่ได้เท่ากับ 10.3 กรัม ต่อปริมาตรน้ำหมัก 3 ลิตร หลังจากนั้นนำเอนไซม์ผงแห้งมาหาค่าแอคติวิตี ได้ค่าแอคติวิตีประมาณ 254.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณโปรตีนลดลงเหลือ 0.5871 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 432.68 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เปอร์เซนต์ผลผลิตที่ได้เท่ากับ 69.37 % และเอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.29 เท่า ผลการหาค่าแอคติวิตีและการทำให้อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์บางส่วน แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การทำให้อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์บางส่วนตามขั้นตอนต่างๆ

ขั้นตอน	แอคติวิตีรวม (ยูนิต/ลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/ลิตร)	แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)	ผลผลิต (%)	ความบริสุทธิ์
crude enzyme	366,210	1,940	188.77	100	1.00
ตกตะกอนด้วย 70% แอมโมเนียมซัลเฟต	254,025	587.1	432.68	69.37	2.29

ภาพที่ 5 อัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตโดยเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25

(ก) crude enzyme (ข) lyophilized enzyme



ภาพที่ 6 เศษหนังฟอกโครมจากขั้นตอนการชุดบาง

(ก) ก่อนบด (ข) หลังบด

5.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเศษหนัง

เศษหนังที่ได้จากขั้นตอนการขูดบางมีลักษณะ และองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ การนำเศษหนังมาบดสับด้วยเครื่องตัดเฉือนความเร็วสูง (blender) จะทำให้เศษหนังมีขนาดสม่ำเสมอใกล้เคียงกัน และเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารเคมี และเอนไซม์ นอกจากนี้เศษหนังที่มีอายุแตกต่างกัน จะมีปริมาณความชื้นแตกต่างกันด้วย โดยเศษหนังที่ได้จากเครื่องขูดบางใหม่ๆ จะมีความชื้นกว่าร้อยละ 50 ดังนั้นในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเศษหนัง จึงต้องหาปริมาณความชื้น และทดสอบค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างเพื่อให้สามารถแปรผันการเติมด่างได้อย่างเหมาะสม ผลการวิเคราะห์แสดงเป็นค่าร้อยละโดยน้ำหนักของเศษหนังที่ปราศจากความชื้น (moisture free basis) ตารางที่ 4

ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีของเศษหนังจากขั้นตอนการขูดบาง

องค์ประกอบ	ค่าเฉลี่ย[1] ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
pH	3.67
Moisture	32.22 ± 0.41
Ash[1]	17.80 ± 0.30
Chromic oxide[2]	4.90 ± 0.0058
Chromium[2,5]	3.35 ± 0.0058
Calcium[2]	0.45 ± 0.031
Magnesium[2]	0.17 ± 0.015
TKN[2,3,4]	12.35 ± 0.015
Fat[2]	0.55 ± 0.04

[1]ค่าเฉลี่ยจากจำนวนตัวอย่าง 3 ซ้ำ

[2]เปอร์เซ็นต์ ปราศจากความชื้น (moisture free basis)

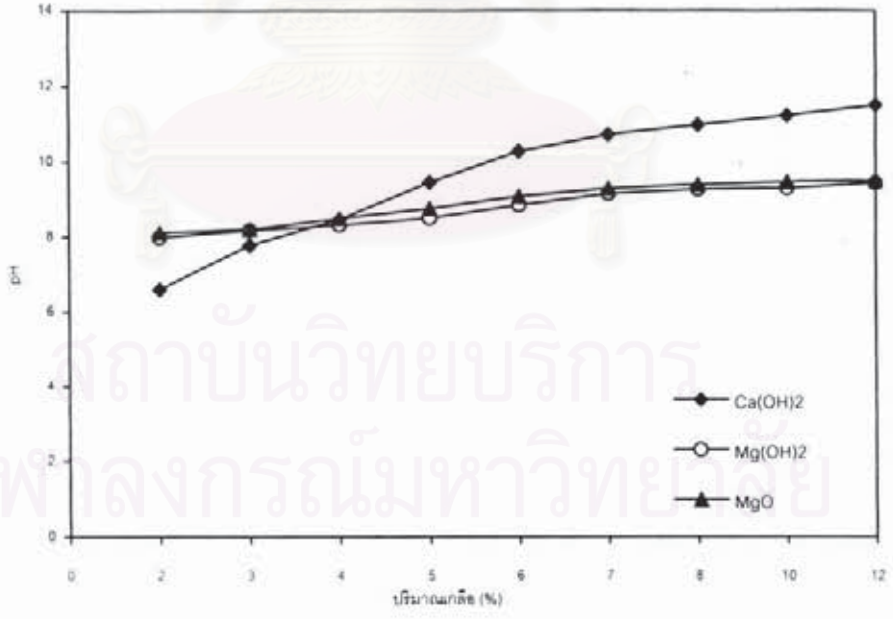
[3]Total Kjeldahl Nitrogen

[4]หาปริมาณโปรตีนโดยการคูณ TKN ด้วย 6.25

[5]คำนวณโดยการคูณ Chromic oxide ด้วย 0.6842

5.3 การปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเกลืออัลคาไลน์-เอิร์ท

การปรับ pH ของของผสมเศษหนังในน้ำกลั่น โดยศึกษาการใช้เกลืออัลคาไลน์-เอิร์ท 3 ชนิด คือ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($Ca(OH)_2$), แมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ ($Mg(OH)_2$) และ แมกนีเซียมออกไซด์ (MgO) ในปริมาณ 1-12 % โดยน้ำหนักของเศษหนัง เพื่อให้ของผสมมี pH ตามต้องการที่ระดับ 8.5 และ 10.5 โดยทำการเขย่าของผสมในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 71°C ด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที พบว่าการปรับ pH ของของผสมให้ได้ที่ระดับ 8.5 จะต้องใช้แมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ ปริมาณ 5 % โดยน้ำหนักของเศษหนัง หรือ ใช้แมกนีเซียมออกไซด์ ปริมาณ 4 % โดยน้ำหนักของเศษหนัง แต่ทั้งแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ และ แมกนีเซียมออกไซด์ จะไม่สามารถปรับ pH ของของผสมให้ได้ระดับ 10.5 ได้ แม้จะใช้ในปริมาณสูงถึง 12 % ก็ตาม สำหรับการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์จะสามารถปรับ pH ได้ ทั้ง 2 ระดับที่ 8.5 และ 10.5 โดยใช้ปริมาณ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ 4 % และ 6.5 % โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ดังนั้นสำหรับการทดลองต่อไปจะเลือกใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ในการปรับ pH ของของผสมก่อนเติมเอนไซม์ ภาพที่ 7 แสดงการปรับ pH โดยการแปรผันปริมาณเกลือ 1-12 % โดยน้ำหนักของเศษหนัง ด้วยเกลืออัลคาไลน์-เอิร์ท ทั้ง 3 ชนิด จากภาพจะเห็นว่าการใช้แมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ และ แมกนีเซียมออกไซด์ จะให้ผลในการปรับ pH ไม่แตกต่างกัน



ภาพที่ 7 ค่าความเป็นกรด-ด่างของของผสม เมื่อแปรผันชนิด และปริมาณเกลืออัลคาไลน์-เอิร์ท

5.4 สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเศษหนังด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

5.4.1 ปริมาณการใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายเศษหนัง

การใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ที่ผลิตโดยเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 ในปริมาณที่เหมาะสม โดยแปรผันปริมาณเอนไซม์ในช่วง 0 - 8 % โดยน้ำหนักของเศษหนัง โดยก่อนการเติมเอนไซม์จะเตรียมเศษหนังให้เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ภายใต้สภาวะการทำงานของเอนไซม์ (optimal activity) ที่อุณหภูมิ 45 °C และ pH 10.5 โดยการทำให้โปรตีนในเศษหนังเสียสภาพทางธรรมชาติ ด้วยสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ติดตามวัดค่า pH ของสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีน และปริมาณเศษหนังที่ไม่ถูกย่อยสลายซึ่งมีตะกอนโครเมียมรวมอยู่ด้วย (chrome cake) พบว่าค่า pH ของสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีนลดลงเมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นและมีแนวโน้มคงที่ ส่วนปริมาณเศษหนังที่ไม่ถูกย่อยมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 5) ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณเอนไซม์ 2 % ในการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากต้องการให้มีปริมาณเอนไซม์มากเพียงพอ เพราะอาจมีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ ไปในระหว่างการดำเนินการทดลอง เนื่องจากสภาวะในการทดลอง เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง รวมทั้งระยะเวลาที่ทำการศึกษาวิจัย

ตารางที่ 5 ปริมาณ chrome cake และ pH ของสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีนเมื่อแปรผันปริมาณการใช้อัลคาไลน์โปรติเอส

ปริมาณเอนไซม์(%)	Chrome cake(g)	Chrome cake(%) ± SD[1]	pH
0	1.5045	60.18 ± 4.84 (a)	9.46
0.5	0.5623	22.49 ± 0.37 (b)	8.13
1.0	0.5618	22.47 ± 0.44 (b)	8.09
1.5	0.5652	22.61 ± 0.57 (b)	8.04
2.0	0.5706	22.82 ± 0.12 (b)	8.01
4.0	0.5654	22.61 ± 0.12 (b)	7.97
6.0	0.6032	24.13 ± 0.31 (b)	7.96
8.0	0.6254	25.02 ± 1.31 (b)	7.96

[1]เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามแนวตั้ง ตัวอักษรที่เหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

5.4.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายด้วยอัลคาไลน์โปรติเอส

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายเศษหนังด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส โดยการแปรผันอุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 30, 37 และ 45 °C ที่ pH 8.5 และ 10.5

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายเศษหนังด้วยเอนไซม์ ที่ pH 8.5 และ 10.5 โดยการปรับ pH ของของผสมด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 4 % และ 6.5 % โดยน้ำหนักของเศษหนัง (ผลจากข้อ 5.3) และใช้เอนไซม์ 2% โดยน้ำหนักของเศษหนัง (ผลจากข้อ 5.4.1) แช่ของผสมในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 30, 37 และ 45 °C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พิจารณาผลการทดลองจากน้ำหนักเศษหนังที่ไม่ถูกย่อย ในรูปของปริมาณ chrome cake (ตารางที่ 6) พบว่าเมื่ออุณหภูมิในการย่อยสลายสูงขึ้น ปริมาณเศษหนังที่ไม่ถูกย่อยจะมีค่าลดลง เปรียบเทียบระหว่างระดับ pH 8.5 และ 10.5 พบว่าปริมาณ chrome cake ที่ pH 10.5 ต่ำกว่าที่ระดับ 8.5 ทุกระดับอุณหภูมิ และให้ค่าต่ำที่สุดที่อุณหภูมิ 45°C โดยจะมีค่าร้อยละ 27.46 , 24.06 และ 21.04 สำหรับการย่อยสลายที่อุณหภูมิ 30 , 37 และ 45 °C ตามลำดับ

ตารางที่ 6 ปริมาณ chrome cake เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ที่ pH 8.5 และ 10.5

อุณหภูมิ (°C)	ค่าเฉลี่ยปริมาณ chrome cake (%) ± SD		เฉลี่ยอุณหภูมิ [1]
	pH 8.5	pH 10.5	
30	68.27 ± 0.29	27.46 ± 0.21	47.86 (a)
37	64.83 ± 0.83	24.06 ± 0.04	44.45 (b)
45	63.75 ± 0.57	21.04 ± 0.74	42.39 (c)
เฉลี่ย pH [1]	65.62 (ก)	24.19 (ข)	

[1]เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งและแนวนอน ตัวอักษรที่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลทางสถิติ ดังแสดงในตารางผนวกที่ 2 ปรากฏว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณ chrome cake ที่ระดับ pH ต่างกัน จะให้ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % เมื่อเปรียบเทียบ โดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) แสดงในตารางที่ 6

สำหรับระดับอุณหภูมิที่ต่างกัน ที่ 45 °C ให้ค่าเฉลี่ยปริมาณ chrome cake ต่ำที่สุด (42.39 %) แตกต่างกับค่าเฉลี่ยปริมาณ chrome cake ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 °C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณ chrome cake ต่อปัจจัยร่วมระหว่างอุณหภูมิ และ pH พบว่าให้ผล

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อทดสอบโดยวิธี DMRT ปรากฏว่าที่อุณหภูมิ 45°C และ pH 10.5 จะให้ค่าเฉลี่ยปริมาณ chrome cake ต่ำที่สุด แตกต่างกันจากเมื่อใช้อุณหภูมิ 45°C และ pH 8.5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้อุณหภูมิ 45°C และ pH 10.5

เมื่อนำสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังด้วยเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30,37 และ 45°C ไปวิเคราะห์ปริมาณโครเมียมโดยวิธีอะตอมมิคแอบซอร์ปชั่น พบว่า สารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังด้วยเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45°C มีปริมาณโครเมียม 3.483, 1.722 และ 1.660 ppm ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ที่อุณหภูมิ 45°C มีปริมาณโครเมียมแตกต่างกับการใช้อุณหภูมิ 30, 37°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงในตารางผนวกที่ 3

5.4.3 เปรียบเทียบความสามารถในการละลายของโปรตีนในเศษหนัง ในการย่อยสลายเศษหนังด้วยอัลคาไลน์โปรติเอส ในภาวะที่มีการปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยเกลืออัลคาไลน์-เอิร์ท ต่างชนิดกัน

การเปรียบเทียบความสามารถในการละลายของโปรตีนในเศษหนัง ในสภาวะการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โดยการปรับ pH ของของผสมเป็น 10.5 ด้วยเกลือต่างชนิดกัน 3 ชนิดคือ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ แมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ และ แมกนีเซียมออกไซด์ ปริมาณ 6.5% โดยน้ำหนักของเศษหนัง แต่ในการใช้แมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ และ แมกนีเซียมออกไซด์ จะต้องใช้ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ในการปรับ pH ของของผสมให้ถึง 10.5 ก่อนเติมเอนไซม์ พบว่าการใช้ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ จะเหลือตะกอน chrome cake น้อยที่สุด รองลงมาคือ แมกนีเซียมออกไซด์ และแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ โดยจะเหลือปริมาณตะกอนร้อยละ 22.20, 27.01 และ 30.99 ตามลำดับ หรือมีความสามารถในการละลายของโปรตีนได้ร้อยละ 77.80, 72.99 และ 69.01 ตามลำดับ (ตารางที่ 7) และเมื่อทดสอบค่า pH ของสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีนที่ได้ พบว่า pH ของไฮโดรไลเสตจะลดลงเมื่อความสามารถในการละลายของเศษหนังเพิ่มขึ้น

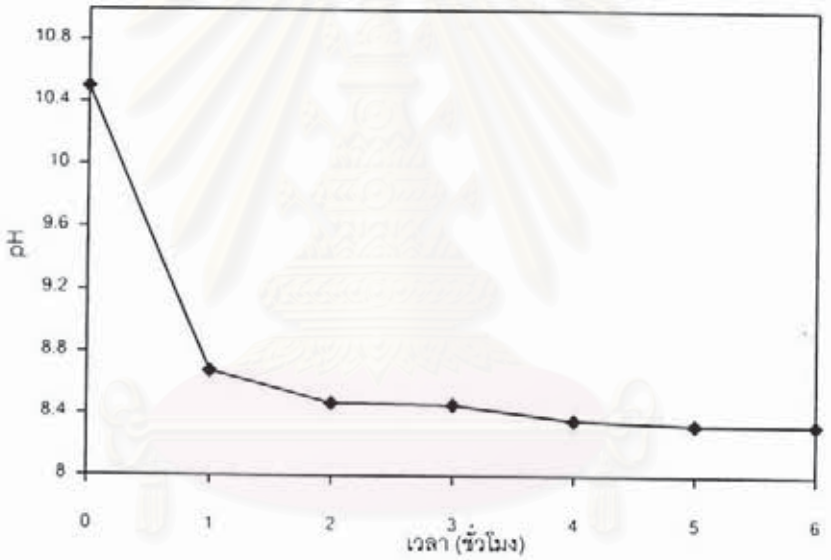
ตารางที่ 7 ปริมาณ chrome cake และความสามารถในการละลายโปรตีนเศษหนัง

อัลคาไลน์-เอิร์ท	ค่าเฉลี่ย[1] Chrome cake (%) ± SD	Solubility of shaving (%)	pH ของไฮโดรไลเสตโปรตีน
$Ca(OH)_2$	22.20 ± 0.74 (a)	77.80	8.20
$Mg(OH)_2$ ± NaOH	30.99 ± 0.50 (b)	69.01	8.81
MgO ± NaOH	27.01 ± 0.36 (c)	72.99	8.79

[1]เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามแนวตั้ง ตัวอักษรที่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

5.4.4 เวลาที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายด้วยอัลคาไลน์โปรติเอส

การย่อยสลายเศษหนังด้วยเอนไซม์ ภายใต้สภาวะการเตรียมเศษหนังในน้ำกลั่นให้มี pH 10.5 ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 6.5% โดยน้ำหนักของเศษหนัง (ผลจากข้อ 5.3) โดยใช้อัลคาไลน์โปรติเอส 2%โดยน้ำหนักของเศษหนัง (ผลจากข้อ 5.4.1) เขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 45°C โดยการแปรผันเวลาในการเขย่าในช่วง 0-6 ชั่วโมง วัดค่า pH ของของผสมทุกๆ 1 ชั่วโมง ตั้งแต่ก่อนเติมเอนไซม์ (ชั่วโมงที่ 0) พบว่า pH ของของผสม มีค่า 10.5 ซึ่งก็คือ pH สุดท้ายของของผสมหลังการย่อยตัวอย่างด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 6.5% พบว่าค่า pH ของของผสมจะลดลงอย่างมากในช่วงชั่วโมงที่ 0-2 หลังการเติมเอนไซม์(ภาพที่ 8) จาก pH 10.5 ลงมาที่ระดับ 8.47 และค่า pH แนวโน้มจะคงที่เมื่อใช้เวลาในการย่อย 4 ชั่วโมงขึ้นไป โดยมีค่า pH ในชั่วโมงที่ 1 ถึง 6 เป็น 8.68, 8.47, 8.46, 8.36, 8.33 และ 8.33 ตามลำดับ



ภาพที่ 8 ค่าความเป็นกรด-ด่างของของผสม เมื่อแปรผันเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายเศษหนังด้วยอัลคาไลน์โปรติเอส

เมื่อวิเคราะห์พารามิเตอร์หรือองค์ประกอบทางเคมีบางตัว หลังจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างการใช้เวลาในการย่อยที่ 3 หรือ 6 ชั่วโมง ด้วยวิธี t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงในตารางผนวกที่ 5-10 พบว่า pH ของของผสม และ pH ของสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีน ที่กรองออกจาก chrome cake ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ความสามารถในการละลายของเศษหนัง หรือ ปริมาณน้ำหนักแห้งของ chrome cake และไฮโดรไลเสตโปรตีนที่นำไปทำแห้งโดยวิธีการระเหิดแห้งก็มีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโครเมียมใน chrome cake ในรูป Cr_2O_3 โดยวิธีเปอร์คลอริกแอซิดออกซิเดชั่น พบว่าเมื่อใช้เวลาในการย่อยสลาย

น้อยจะมีโครเมียมอยู่ใน chrome cake มากกว่า โดยจะมีค่า Cr_2O_3 ร้อยละ 17.36 และ 16.63 สำหรับการย่อยเศษหนังด้วยเวลา 3 และ 6 ชั่วโมงตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ ด้วยวิธี t-test พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนผลการวิเคราะห์ปริมาณโครเมียมในสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีน โดยวิธี อะตอมมิคแอบซอร์ปชั่น พบว่าการย่อยสลายด้วยอัลคาไลน์โปรติเอสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะมีปริมาณโครเมียมในสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีน ไม่ถึง 1 ppm ซึ่งน้อยกว่า การย่อยสลายที่ใช้เวลานานถึง 6 ชั่วโมง โดยมีปริมาณโครเมียมในสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีน 0.994 และ 1.646 ppm สำหรับการย่อยเศษหนังด้วยเวลา 3 และ 6 ชั่วโมงตามลำดับ

ตารางที่ 8 พารามิเตอร์บางตัวที่ใช้ในการตัดสินใจลดเวลาในการย่อยสลายด้วยอัลคาไลน์โปรติเอส

พารามิเตอร์	เวลาที่ใช้ในการย่อยสลายด้วยอัลคาไลน์โปรติเอส (ชั่วโมง)	
	3	6
pH ของของผสม	8.46 ± 0.02	8.33 ± 0.03
pH ของสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีน	8.10 ± 0.02	8.16 ± 0.04
ปริมาณ chrome cake (%)	20.56 ± 0.29	21.46 ± 0.56
Solubility of shaving (%)	79.44 ± 0.29	78.54 ± 0.56
ปริมาณไฮโดรไลเสตโปรตีนผงแห้ง (%)	60.20 ± 0.97	61.36 ± 1.21
ปริมาณ Cr_2O_3 ใน chrome cake (%)	17.36 ± 0.14	16.63 ± 0.40
ปริมาณ Cr (ppm)ในสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีน	0.994 ± 0.01	1.646 ± 0.02

5.4.5 การลดปริมาณการใช้อัลคาไลน์โปรติเอส

เนื่องจากอัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร มีต้นทุนการผลิตคิดเป็นเงินประมาณ 2,700 บาท (วรรณวิมล, 2540) การผลิตเอนไซม์ในงานวิจัยนี้ ได้อัลคาไลน์โปรติเอสที่มีแอคติวิตีจำเพาะสูงถึง 432.68 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ผลจากข้อ 5.1) ซึ่งถือว่าสูงกว่าเอนไซม์ผงของบริษัท Sigma ที่ผลิต ได้จาก *B. licheniformis* ที่มีแอคติวิตี 175 ยูนิต ต่อน้ำหนักเอนไซม์ 25 มิลลิกรัม ซึ่งมีราคา 1,500 บาท ดังนั้นเอนไซม์ที่ผลิตได้เองนี้น่าจะมีประสิทธิภาพการทำงานสูง จึงได้ศึกษาการลดปริมาณการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายเศษหนัง โดยการแปรผันปริมาณการใช้เอนไซม์ ในช่วง 0-1.6 %

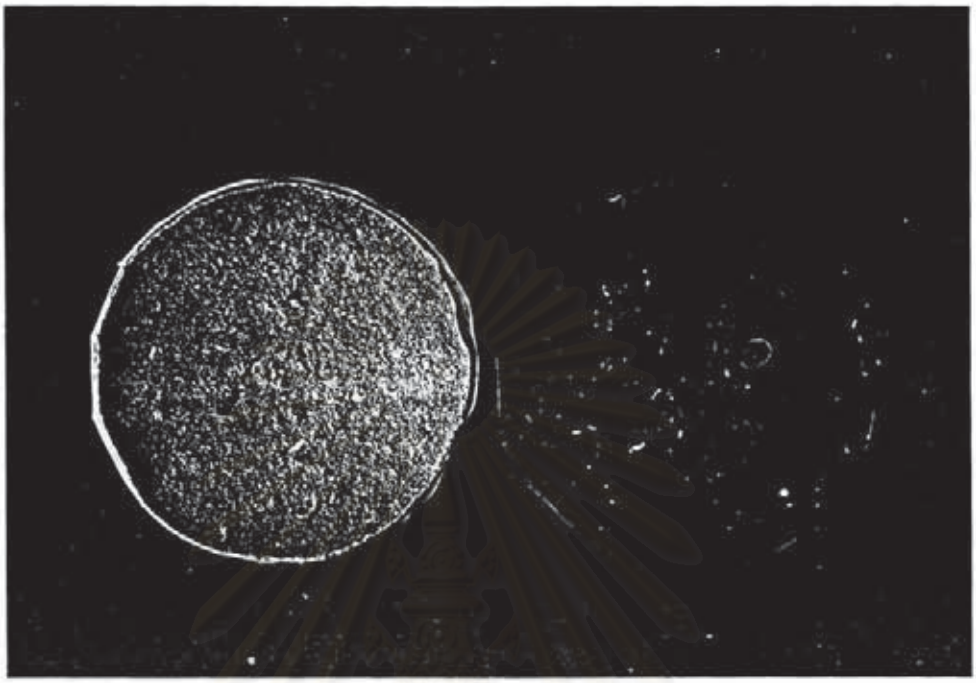
ตารางที่ 9 ปริมาณ Chrome cake เมื่อแปรผันปริมาณการใช้อัลคาไลน์โปรติเอสในช่วง 0-1.6 %

เอนไซม์	Chrome cake (%)				Solubility of
(%)	1	2	3	เฉลี่ย ± SD[1]	shaving (%)
0.0	62.13	70.40	65.95	66.16 ± 1.14 (a)	33.84
0.2	25.15	27.07	26.11	26.16 ± 0.96 (b)	73.89
0.4	23.14	24.93	24.45	24.17 ± 0.93 (b)	75.83
0.6	22.46	24.76	23.06	23.43 ± 1.19 (b)	76.57
0.8	22.72	25.01	24.01	23.91 ± 1.15 (b)	76.09
1.0	22.50	23.49	23.73	23.24 ± 0.65 (b)	76.76
1.2	22.91	23.47	23.47	23.28 ± 0.32 (b)	76.72
1.4	21.56	25.67	24.30	23.84 ± 2.09 (b)	76.16
1.6	21.66	24.09	25.39	23.71 ± 1.89 (b)	76.29

[1]เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามแนวตั้ง ตัวอักษรที่เหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับที่ความเชื่อมั่น 95 %

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ chrome cake ในกลุ่มที่มีการใช้เอนไซม์ที่ทุกระดับความเข้มข้น กับการทดลองชุดควบคุม พบว่าการใช้เอนไซม์ทำให้เหลือปริมาณ chrome cake น้อยกว่าการทดลองที่ไม่มีการเติมเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตารางผนวกที่ 11 และพบว่าเมื่อใช้เอนไซม์เพิ่มขึ้นในช่วง 0.2 ถึง 0.6 % ปริมาณ chrome cake จะลดลงและจะมีแนวโน้มคงที่ ตั้งแต่ 0.6 % ขึ้นไป โดยจะทำเหลือ chrome cake ประมาณ 23 % โดยน้ำหนักเริ่มต้นของเศษหนัง

จากข้อมูลในตารางที่ 9 จะเห็นว่าที่ระดับการใช้เอนไซม์ 1.4 และ 1.6 % มีปริมาณ chrome cake สูงขึ้น เมื่อกรองตะกอน chrome cake แยกออกจากไฮโดรไลเสตโปรตีน พบว่าตะกอนที่เหลือจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ มีลักษณะเป็นตะกอนขนาดเล็ก ละเอียด และเป็นเนื้อเดียวกันคล้ายครีมเค็ก ซึ่งเรียกตามลักษณะตะกอนว่า Chrome cake เมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุมที่ไม่ใช้เอนไซม์ ซึ่งจะได้ตะกอนที่หยาบกว่า (ภาพที่9) และพบว่าตะกอนที่มีลักษณะเป็นครีมนี้จะกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ได้ช้า แม้ว่าจะใช้การกรองแบบดูดอากาศ (suction filtration) ก็ตาม ประสิทธิภาพการกรองที่ลดลงเนื่องจากการอุดตันของรูกระดาษกรอง ทำให้ chrome cake มีความชื้นสูงและอาจมีสารละลายโปรตีนบางส่วนถูกหน่วง (retained) อยู่ที่ตะกอน ทำให้มีความผิดพลาดในการหาน้ำหนักแห้งของตะกอน chrome cake ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงได้ศึกษาผลการล้างตะกอน และโปรตีนในน้ำล้างตะกอน



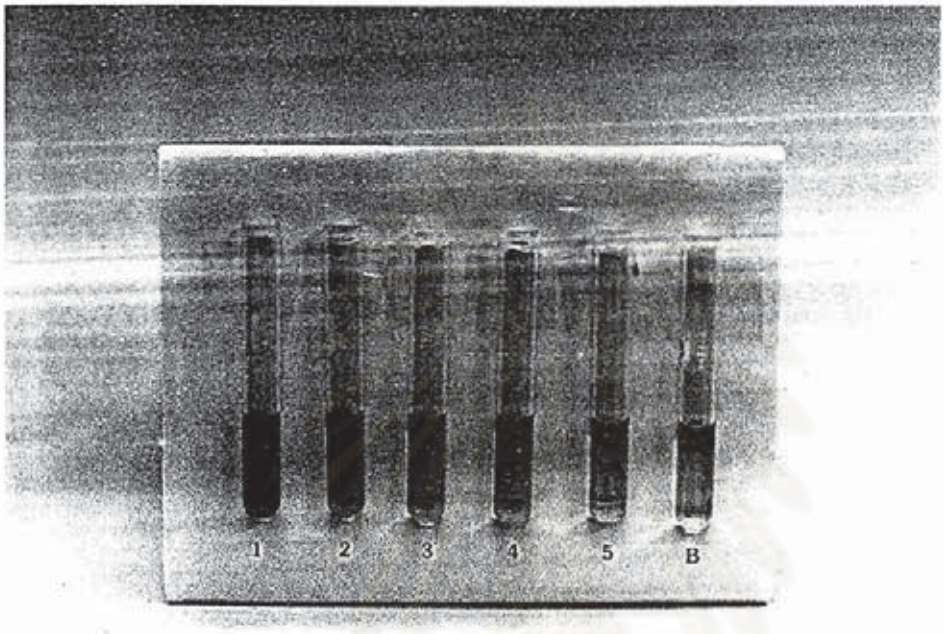
ภาพที่ 9 เศษหนังที่ไม่ถูกย่อยสลายและตะกอนโครเมียม
(ก) ไม่ใช้เอนไซม์ (ข) ใช้อัลคาไลน์โปรติเอส 1.0 %

5.4.6 ผลของการล้างตะกอน chrome cake

ผลการศึกษาการล้างตะกอน chrome cake ด้วยน้ำกลั่น โดยทำการล้าง 3-5 ครั้ง ครั้งละ 20 มิลลิลิตร หลังจากการย่อยสลายเศษหนังด้วยเอนไซม์แล้ว นำของผสมมาเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แยกเก็บส่วนสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีนไว้ในตู้เย็น ส่วนตะกอนนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น ครั้งละ 20 มิลลิลิตร แล้วเหวี่ยงตกตะกอน chrome cake ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 3-5 ครั้ง หรือจนกว่าน้ำล้างตะกอนไม่ให้ผลบวก (positive test) ในการทดสอบกับสารละลายไบยูเร็ต โดยนำน้ำล้างตะกอนแต่ละส่วน (fractions) จำนวน 0.5 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลายไบยูเร็ต เปรียบเทียบสีกับน้ำกลั่น ในสารละลายไบยูเร็ต (แบลงค์) สังเกตผลเชิงคุณภาพ (quanlitative test) ด้วยตาเปล่า ผลการทดลอบ แสดงดังภาพที่ 10

การหาน้ำหนักแห้งของปริมาณ chrome cake และความสามารถในการละลายของเศษหนัง แสดงในตารางที่ 10 จะเห็นว่าปริมาณ chrome cake ลดลงเหลือเพียงประมาณ 22 % และมีแนวโน้มจะคงที่ ตั้งแต่ระดับการใช้เอนไซม์ 1.0 % และการใช้เอนไซม์มากขึ้นถึง 3 % ก็ไม่ทำให้ปริมาณ chrome cake ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ chrome cake ที่เหลือที่ระดับการใช้เอนไซม์ 0-8 % ในตารางที่ 5 หรือระดับเอนไซม์ 0-1.6 % ในตารางที่ 9 พบว่าการล้างตะกอนสามารถลดความแปรปรวนของปริมาณ

chrome cake ที่เหลือได้ และจากภาพที่ 10 จะเห็นว่าการล้างตะกอนจะสามารถลดปริมาณโปรตีนใน chrome cake ได้



ภาพที่ 10 ผลการทดสอบสีของโปรตีนในน้ำล้างตะกอนกับสารละลายไบยูเร็ต

ตารางที่ 10 ปริมาณ chrome cake และ ความสามารถในการละลายของเศษหนัง เมื่อล้าง chrome cake ด้วยน้ำกลั่น

เอนไซม์	Chrome cake (g)			Chrome cake	Solubility of
(%)	1	2	เฉลี่ย	(%)	shaving (%)
0.0	1.6741	1.6988	1.6865	67.46	32.54
0.5	0.5582	0.5518	0.5550	22.20	77.80
1.0	0.5489	0.5476	0.5483	21.93	78.07
1.5	0.5469	0.5520	0.5495	21.98	78.02
2.0	0.5548	0.5385	0.5467	21.87	78.13
2.5	0.5514	0.5419	0.5467	21.87	78.13
3.0	0.5481	0.5502	0.5492	21.97	78.03

5.5 องค์ประกอบทางเคมีของ Chrome cake

เศษหนังบางส่วนที่ไม่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ซึ่งผสมอยู่กับตะกอนโครเมียม ที่เรียกว่า "Chrome cake" นั้น จะนำไปกรองเพื่อแยกตะกอนออกจากสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีน มีความชื้นประมาณร้อยละ 85.7 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดตะกอน และ ประสิทธิภาพการกรองโดยวิธี suction filtration ด้วยการปรับความแรงของปั๊มพ์ (vacuum pump) ให้เหมาะสมเพื่อที่จะไม่ทำให้กระดาษกรองทะลุ ตะกอนที่อบแห้งแล้ว มีปริมาณโดยเฉลี่ยร้อยละ 21.27 จะนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ทางเคมี แสดงผลในตารางที่ 11 พบว่าองค์ประกอบหลักของ chrome cake ที่ปราศจากความชื้น คือ ปริมาณเถ้า โดยเฉลี่ยประมาณร้อยละ 42 ซึ่งคิดเป็นปริมาณโครเมียมในรูปโครมิกออกไซด์ อยู่ถึงร้อยละ 17.6 ที่เหลือเป็น แคลเซียม ร้อยละ 4.37 ซึ่งมาจากแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการทดลอง ส่วนแมกนีเซียมมีอยู่ไม่เกิน 1 % เป็น impurity ในแคลเซียมไฮดรอกไซด์

ตารางที่ 11 องค์ประกอบทางเคมีของ Chrome cake ที่เหลือจากการย่อยสลายเศษหนังด้วยอัลคาไลน์โปรติเอส

องค์ประกอบ (%)	ค่าเฉลี่ย ± SD[5]	ช่วง	N[4]
Moisture	85.73 ± 3.8	83.05 – 91.30	4
Ash[1]	42.16 ± 0.40	41.70 – 42.43	3
Cr_2O_3[1]	17.63 ± 1.46	16.00 – 20.76	20
TKN[1,2,3]	7.10 ± 1.29	5.43 – 9.07	14
Fat[1]	1.14 ± 0.72	0.63 – 1.94	3
Calcium[1]	4.37 ± 0.35	3.85 – 4.62	4
Magnesium[1]	0.20 ± 0.05	0.147 – 0.252	3

[1]Moisture free basis

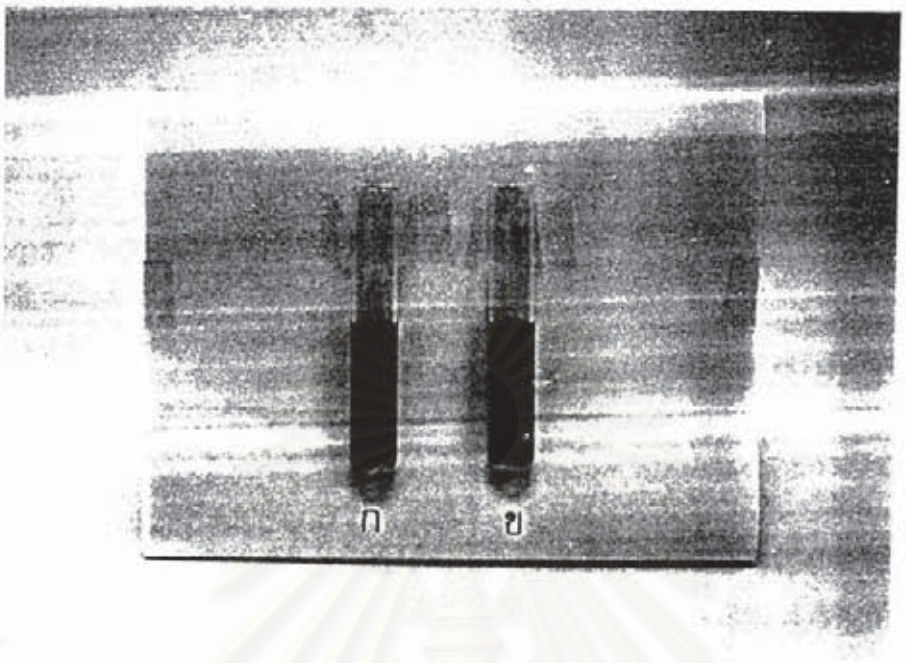
[2]Total Kjeldahl Nitrogen

[3]ปริมาณโปรตีน โดยคูณ TKN กับ 6.25

[4] จำนวนซ้ำที่ทำการทดลอง

[5]ค่าเฉลี่ยจากจำนวนตัวอย่าง N

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 11 การละลายตะกอน Chrome cake ด้วย กรดซัลฟุริกเจือจาง 5 เท่า
(ก) ไม่ใช้เอนไซม์ (ข) ใช้อัลคาไลน์โปรติเอส 1.0 %

จากภาพที่ 11 สารละลายโครเมียมซัลเฟตที่ได้จากการละลายตะกอน chrome cake ด้วยกรดซัลฟุริกเจือจาง 5 เท่า สารละลายโครเมียมซัลเฟตที่ได้จากการละลายตะกอน chrome cake ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (ข) จะมีสีเขียวเข้มกว่าสารละลายโครเมียมซัลเฟตที่ได้จากการละลายตะกอน chrome cake ที่ไม่ใช้เอนไซม์ (ก) เนื่องจากใน chrome cake มีปริมาณโครเมียม มากกว่า 2-3 เท่า โดยการทดลองที่ไม่ใช้เอนไซม์มีปริมาณโครมิกออกไซด์โดยเฉลี่ยเพียงร้อยละ 6.77 และเนื่องจากอัลคาไลน์โปรติเอสที่ใช้มีสีน้ำตาลเข้มของกากเมล็ดทานตะวัน ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

5.6 องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีน

สารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีนที่ได้มีค่า pH อยู่ในช่วง 8.10-8.24 มีปริมาณโครเมียมละลายอยู่เพียง 0.903 ppm ปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) 29.53 mg/ml หรือประมาณ 30,000 ppm ปริมาณเถ้าเฉลี่ย 6.35 mg/ml หรือประมาณ 6,350 ppm มีปริมาณแคลเซียมและแมกนีเซียม 1103 และ 3.92 ppm ตามลำดับ องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีน แสดงในตารางที่ 12

เมื่อนำสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีนไปทำให้เป็นผงแห้งโดยวิธีการระเหิดแห้ง (Lyocnilization) จะได้ผงโปรตีนโดยเฉลี่ยร้อยละ 60.9 โดยน้ำหนักแห้งของเศษหนัง เป็นผงโปรตีนที่มีความชื้นโดยเฉลี่ย

ร้อยละ 5.65 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) ร้อยละ 12.45 ปริมาณแคลเซียมร้อยละ 0.44 และมีโครเมียมอยู่ในช่วง 0-20 ppm หรือคิดเป็นค่าเฉลี่ยร้อยละ 0.0013 โดยน้ำหนักของผงโปรตีนปราศจากความชื้น ที่ระดับความสามารถในการละลายโปรตีนจากเศษหนัง (solubility of shaving) ร้อยละ 75 องค์ประกอบทางเคมีของไฮโดรไลเสตโปรตีน แสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 12 องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีน

องค์ประกอบ	ค่าเฉลี่ย ± SD[1]	ช่วง	N[2]
pH	8.14 ± 0.05	8.10 – 6.01	19
Total solids (mg/ml)	29.53 ± 1.65	26.99 – 33.52	16
Ash (mg/ml)	6.35 ± 0.52	5.27 – 7.03	16
Chromium (ppm)	0.903 ± 0.10	0.750 – 1.021	9
Calcium (ppm)	1103 ± 98	991 - 1173	3
Magnesium (ppm)	3.92 ± 1.4	2.30 – 4.75	3

[1]ค่าเฉลี่ยจากจำนวนตัวอย่าง N

[2]จำนวนตัวอย่างที่ทำการทดลอง

ตารางที่ 13 องค์ประกอบทางเคมีของไฮโดรไลเสตโปรตีนที่ทำแห้งโดยวิธีการระเหิดแห้ง

องค์ประกอบ (%)	ค่าเฉลี่ย ± SD[5]	ช่วง	N[4]
Moisture	5.65 ± 0.19	0.54 – 6.01	6
Ash[1]	22.10 ± 0.59	21.22 – 23.28	19
Chromium[1]	0.0013 ± 0.001	0.0 – 0.0020	3
TKN[1,2,3]	12.45 ± 0.45	11.90 - 13.67	14
Fat[1]	1.34 ± 0.69	0.88 - 2.36	4
Calcium[1]	0.44 ± 0.15	0.22 - 0.62	8

[1]Moisture free basis

[2]Total Kjeldahl Nitrogen

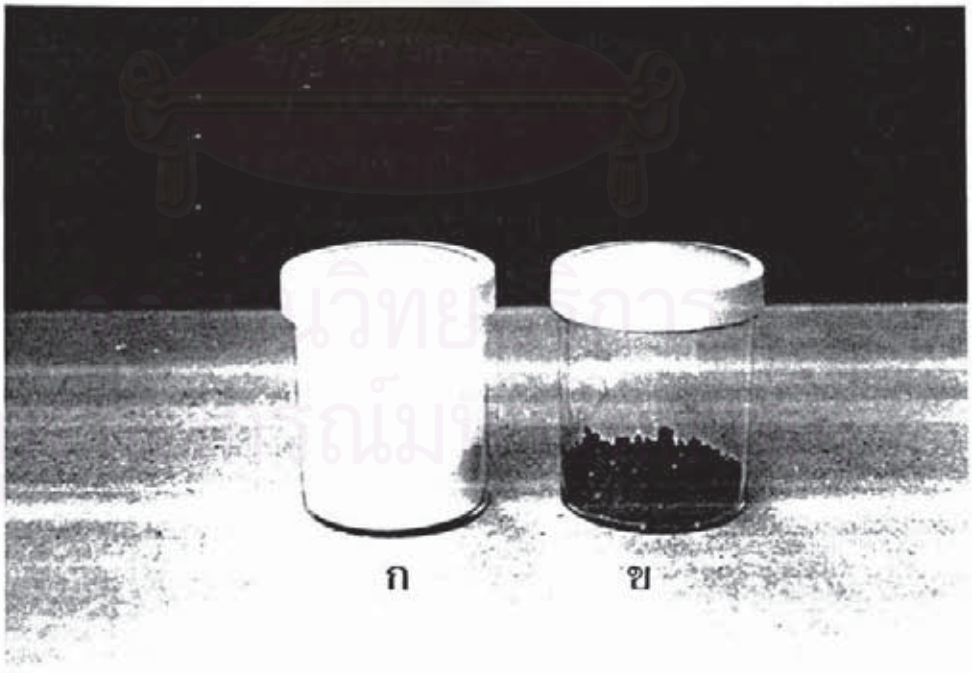
[3]ปริมาณโปรตีน โดยคูณ TKN กับ 6.25

[4] จำนวนซ้ำที่ทำการทดลอง

[5]ค่าเฉลี่ยจากจำนวนตัวอย่าง N

ภาพที่ 12 สารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีน

(ก) ใช้อัลคาไลน์โปรติเอส 1.0 % (ข) ไม่ใช้เอนไซม์



ภาพที่ 13 ผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังด้วยอัลคาไลน์โปรติเอส 1.0 %

(ก) ไฮโดรไลเสตโปรตีน (ข) chrome cake

5.7 กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของผงโปรตีน

ผงโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังด้วยอัลคาไลน์โปรติเอส มีปริมาณไนโตรเจนร้อยละ 12.8 โดยน้ำหนักปราศจากความชื้น หรือคิดเป็นปริมาณโปรตีนร้อยละ 80 เปรียบเทียบกับการทดลองควบคุมซึ่งไม่ใช้เอนไซม์ในการย่อย มีปริมาณไนโตรเจนร้อยละ 5.54 หรือคิดเป็นปริมาณโปรตีนร้อยละ 34.64 น้อยกว่าโปรตีนในตัวอย่างที่มีการใช้เอนไซม์อยู่ 2.31 เท่า เมื่อนำไปวิเคราะห์สัดส่วนกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ เปรียบเทียบกับกรดอะมิโนของคอลลาเจน ชนิด I (Colllagen Type I) ชนิดที่เป็นองค์ประกอบของหนังสัตว์ การวิเคราะห์กรดอะมิโนใช้วิธี Pico-Tag โดยทำการย่อยสลายโปรตีน (Protein hydrolysis) ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ซึ่งจะต้องทำ Performic oxidation ก่อน เพื่อทำให้ Methionine และ Cysteine อยู่ในรูป Methionine sulfone และ Cysteic acid แต่การทำ Performic oxidation จะไปทำลาย Histidine และ Tyrosine ส่วนการทำย่อยสลายด้วยกรดยังสามารถไปทำลาย Tryptophan หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปทำปฏิกิริยากับ phenylisothiocyanate (PITC) เพื่อเปลี่ยนให้กรดอะมิโนอยู่ในรูป phenylthiocabamyl amino acid สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ผลการวิเคราะห์สัดส่วนกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ แสดงในตารางที่ 14

จะเห็นว่าสัดส่วนกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของไฮโดรไลเสตโปรตีนที่ได้ในตัวอย่าง มีสัดส่วนที่ใกล้เคียงกับกรดอะมิโนของคอลลาเจน ชนิด I และใกล้เคียงกับกรดอะมิโนในโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังด้วย ALKALASE™ ในงานวิจัยของ Taylor และคณะ (1992) ยกเว้นปริมาณไกลซีนในโปรตีนที่ได้มีปริมาณ 23.2 ซึ่งต่ำกว่าในคอลลาเจนมาตรฐาน (32.7)และโปรตีนของ Taylor แม้ว่ากรดอะมิโนแต่ละชนิดที่ได้ จะมีปริมาณแตกต่างกับคอลลาเจน แต่จะเห็นว่ามีรูปแบบ (profile) เหมือนกัน จากตารางที่ 14 จะเห็นว่าโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนัง โดยใช้ด่างเพียงอย่างเดียว (ไม่เติมเอนไซม์) จะมีปริมาณกรดอะมิโนปริมาณต่ำกว่าในโปรตีนที่ย่อยด้วยอัลคาไลน์โปรติเอส โดยเฉลี่ยประมาณ 2.5 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับสัดส่วนปริมาณโปรตีนในตัวอย่างไฮโดรไลเสตโปรตีนที่มีการใช้เอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีนในไฮโดรไลเสตโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังด้วยด่างเพียงอย่างเดียว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของไฮโดรไลเสตโปรตีน

Amino acid Residues	Colllagen (Type I)[1,3,4]	Hydrolyzate protein		
		Control[3]	Sample[3]	Taylorและคณะ 1992
Gly	32.7	8.89	23.2	33.0
Hyp	8.6	--	--	10.0
Pro	13.0	5.17	13.8	12.5
Ala	11.4	3.49	8.87	8.4
[2]Arg	5.2	2.86	6.85	4.8
Asp	4.6	1.74	3.90	5.1
Cys	0.0	0.0	0.0	0.0
Glu	7.5	3.18	7.72	7.7
[2]His	0.5	--	--	0.9
[2]Ile	1.2	0.531	1.06	1.4
[2]Leu	2.5	1.11	2.45	2.6
[2]Lys	2.8	1.24	3.02	2.7
[2]Met	0.6	0.171	0.628	0.2
[2]Phe	1.3	0.766	2.13	1.3
Ser	3.1	1.13	2.81	4.1
[2]Thr	1.6	0.650	1.55	2.1
Tyr	0.4	--	--	0.1
[2]Val	2.3	0.733	1.51	0.1

[1]mole percent

[2]Essential amino acid

[3]Moisture free basis

[4]Piez ,1984

-- ถูกทำลายในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ความชื้นในเศษหนังตัวอย่างเป็นปัจจัยสำคัญในการแปรผันปริมาณการใช้เกลืออัลคาไลน์-เอิร์ท และปริมาณการใช้เอนไซม์ โดยเศษหนังที่เพิ่งออกจากเครื่องขูดบางใหม่ๆ จะมีความชื้นสูงกว่าร้อยละ 50 และความชื้นจะลดลงเมื่อทิ้งไนไว้ในอากาศ (open air) ดังนั้นควรเก็บเศษหนังไว้ในภาชนะปิดที่สามารถ รักษาความชื้นไว้ได้ เช่นกล่องพลาสติก แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น แต่ไม่ควรเก็บเศษหนังโดยการอบแห้ง เพราะ จะทำให้ต้องเสียเวลาแช่เศษหนัง และต้องเพิ่มเวลาในการย่อยเศษหนังในสารละลายด่าง เศษหนังที่ใช้ใน การวิจัยนี้มีความชื้นประมาณร้อยละ 25-32 และมี pH อยู่ในช่วง 3.58-3.67

เศษหนังที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็น chrome shavings ที่มีลักษณะเป็นแถบยาว มีขนาดแตกต่างกัน ซึ่งจะทำให้มีพื้นที่ผิวที่จะทำปฏิกิริยากับสารเคมี และเอนไซม์ต่างกัน ดังนั้นจึงต้องลดความแปรปรวนนี้ โดยการเพิ่มพื้นที่ผิวด้วยการตัดและบดสับเศษหนังให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดเท่าๆ กัน ก่อนนำมาใช้ แต่ สำหรับ chrome shavings ที่มีลักษณะเหมือนมะพร้าวขูด เป็นเม็ดเล็กๆ หรือ เศษหนังที่ได้จากขั้นตอน การขัดหนัง (buffing dust) จะไม่ต้องผ่านการบดสับ

ความแปรปรวนของปริมาณ chrome cake หรือความสามารถในการละลายของโปรตีนในเศษ หนังส่วนหนึ่งมาจากขนาดของเศษหนัง แม้ว่าจะมีการบดสับตัวอย่างแล้วก็ตาม นอกจากนี้ความแปร ปรวนอาจมาจากอัตราการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิในการย่อยสลายด้วยด่าง เนื่องจากในการทดลองนั้นจะใช้ อุณหภูมิ 71 °C เป็นเวลา 90 นาที แต่อุณหภูมิเริ่มต้น (T_0) ของเครื่องเขย่าที่ใช้ในแต่ครั้งไม่เท่ากัน โดยจะ เริ่มจับเวลา(T_1) เมื่ออุณหภูมิของเครื่องเขย่าเท่ากับ 71 °C ดังนั้นช่วงเวลาที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก T_0 ไป T_1 จะไม่เท่ากัน ซึ่งอาจทำให้ระดับการ denature ของคอลลาเจนในสารละลายด่างต่างกัน

เหตุผลในการเลือกใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ในการปรับ pH ของของผสม เนื่องจากแคลเซียม ไฮดรอกไซด์ สามารถปรับ pH ได้ในช่วงกว้าง โดย pH จะแปรผันตามปริมาณการใช้แคลเซียมไฮดรอก ไซด์ ในขณะที่แมกนีเซียมออกไซด์ และแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ สามารถปรับ pH ได้อย่างจำกัด ทั้งนี้ เนื่องจากคุณสมบัติเฉพาะตัวของสาร โดยแมกนีเซียมออกไซด์ และแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ จะสามารถ ปรับ pH ได้สูงสุดประมาณ pH 9.5 แต่แคลเซียมไฮดรอกไซด์ สามารถปรับ pH 10.5 ได้ และการที่ไม่ใช้ โซเดียมไฮดรอกไซด์ช่วยปรับ pH เพราะผลการวิจัยของ Taylor และคณะ (1994) แสดงให้เห็นว่าการใช้ โซเดียมไฮดรอกไซด์ แม้จะทำให้การย่อยสลายเกิดได้ดีขึ้น แต่กลับทำให้ผลิตภัณฑ์โปรตีนที่ได้มีปริมาณ เถ้าสูง และมีโครเมียมอยู่ในไฮโดรไลเสตโปรตีนในปริมาณสูงขึ้น นอกจากนี้อะตอมของแคลเซียมยังเป็น cofactor ของเอนไซม์ และจะทำให้เอนไซม์เสถียรยิ่งขึ้น (เกษม, 2536) ในการใช้เกลืออัลคาไลน์-เอิร์ท ต่างชนิดกัน จะทำให้ได้เกลือซัลเฟตต่างชนิดกันเกิดขึ้น ดังสมการต่อไปนี้

$$Cr_2(SO_4)_3 + 3\,Ca(OH)_2 \longrightarrow 3\,CaSO_4 + 2\,Cr(OH)_3$$

$$Cr_2(SO_4)_3 + 3\,Mg(OH)_2 \longrightarrow 3\,MgSO_4 + 2\,Cr(OH)_3$$

ซึ่งเกลือแต่ละชนิดจะมีค่าการละลาย(solubility) ต่างกัน เกลือแคลเซียมซัลเฟต มีค่าการละลาย 0.21 กรัมต่อน้ำ100 กรัม ที่อุณหภูมิ 20 °C ในขณะที่ แมกนีเซียมซัลเฟต มีค่าการละลาย 33 กรัมต่อน้ำ100 กรัม ดังนั้นเป็นไปได้ว่าการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์น่าจะทำให้ไฮโดรไลเสตโปรตีนที่ได้มีปริมาณเถ้าอยู่น้อยกว่า ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีกว่า

ปฏิกิริยาการย่อยสลายเศษหนัง ในสภาวะที่ใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ในการละลายโปรตีนและการปรับ pH จะสามารถย่อยได้ดีกว่า การใช้ แมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ หรือ แมกนีเซียมออกไซด์ เปรียบเทียบ ปริมาณ chrome cake จะเหลือน้อยที่สุดเมื่อใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (ผลการทดลอง ข้อ 5.4.3)

แคลเซียมไฮดรอกไซด์ มีราคาถูกกว่าแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ และ แมกนีเซียมออกไซด์ รวมทั้งในกระบวนการฟอกหนังมีการใช้น้ำปูนขาวอยู่แล้ว ดังนั้นการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์จะไม่เป็นการเพิ่มต้นทุนให้กับโรงงานฟอกหนังอีก หากโรงงานขนาดเล็กจะทำการบำบัดเศษหนังเองก็สามารถทำได้

นอกจากนี้แคลเซียมยังเป็นธาตุอาหารหลักสำหรับสัตว์ ความต้องการแร่ธาตุของสัตว์แบ่งตามปริมาณแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในร่างกายสัตว์ สัตว์ทั่วไปจะมีแคลเซียมประมาณร้อยละ 1.5 ขณะที่แมกนีเซียมเป็นธาตุอาหารรอง และร่างกายสัตว์ต้องการแมกนีเซียมในปริมาณน้อยประมาณร้อยละ0.04 โดยแคลเซียม แมกนีเซียมในร่างกายสัตว์เป็นองค์ประกอบอยู่ในกระดูก และของเหลวในร่างกาย เช่น ในพลาสมาจะมีแคลเซียมอยู่ประมาณ 8-12 มิลลิกรัม ต่อพลาสมา 100 มิลลิลิตร ส่วนแมกนีเซียมจะอยู่ในซีรัม (blood serum) 1.7- 4.0 มิลลิกรัม ต่อซีรัม 100 มิลลิลิตร (พันทิพา, 2535)

อัลคาไลน์โปรติเอส ที่ผลิตโดยเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 เป็นเอนไซม์ที่มีช่วงการทำงานใน pH ที่เป็นด่าง สามารถย่อยสลายโปรตีนในหนังสัตว์ และเนื่องจากคุณสมบัติของโปรตีนที่สามารถละลายได้ดีในสารละลายด่าง แต่โครเมียมจะละลายได้ที่ pH ต่ำ ๆ หรือในสารละลายกรด แต่จะไม่ละลายหรือละลายได้น้อยที่ pH ที่เป็นด่าง ประมาณ pH 8.5 โดยอัลคาไลน์โปรติเอสจะสามารถย่อยเศษหนังและละลายโปรตีน ในขณะเดียวกันโครเมียมจากเศษหนัง จะตกตะกอนในสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ได้ตะกอนโครเมียมไฮดรอกไซด์ ($Cr(OH)_3$) ซึ่งจะไม่สามารถละลายกลับมาสู่สารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีนได้อีก

กลไกการย่อยสลายเศษหนังด้วยอัลคาไลน์โปรติเอสจะเกิดการตัดสายโพลีเปปไทด์ ที่พันธะเปปไทด์ และจะทำให้เกิดปลาย N (N-terminal residue) ของหมู่อะมิโน เมื่อระดับการถูกย่อยเพิ่มขึ้น โดยพิจารณาจากปริมาณเศษหนังที่ไม่ถูกย่อย และความสามารถในการละลายของเศษหนัง ในการทดลอง

พบว่า pH ของสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีนที่ได้ จะมีค่าลดลง เมื่อใช้เวลาในการย่อยมากขึ้น (ผลการทดลอง ข้อ 5.4.4)

สารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังด้วยอัลคาไลน์โปรติเอส มีปริมาณของแข็งทั้งหมดอยู่ในช่วง 27,000-33,520 ppm เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Taylor และคณะ (1992) ซึ่งมีปริมาณของแข็งทั้งหมดโดยเฉลี่ย 72,000 ppm อาจทำให้เข้าใจว่าประสิทธิภาพการย่อยต่างกันมาก แต่เมื่อพิจารณาจากปริมาณการใช้น้ำ พบว่างานวิจัยของTaylor มีการใช้น้ำเพียง 500-1,000% แต่งานวิจัยนี้มีการใช้น้ำมากถึง 2,000% เนื่องจากเศษหนังที่ใช้ได้ผ่านขั้นตอนการบดสับทำให้เศษหนังมีลักษณะฟู เบา และดูดซับน้ำได้ดี หากใช้น้ำปริมาณน้อยจะไปจำกัดการละลายของเกลืออัลคาไลน์-เอิร์ทและเอนไซม์ที่ใช้ แต่อย่างไรก็ตาม สามารถแก้ปัญหาได้โดยการเตรียมเกลืออัลคาไลน์-เอิร์ท ให้เป็น stock ของสารละลายด่าง หรือการเตรียมเป็นสารละลายของเอนไซม์ แล้วเติมในเศษหนังที่แช่น้ำเตรียมไว้แล้ว การใช้ปริมาตรน้ำมาก ทำให้ต้องใช้เวลา และพลังงานในการทำให้โปรตีนเป็นผงแห้งมากยิ่งขึ้น

การนำโครเมียมจาก chrome cake กลับมาใช้ประโยชน์ (recycle) จะเป็นการช่วยลดปริมาณการนำเข้าโครเมียม และลดความเสี่ยงที่จะได้รับโครเมียมอันเนื่องจากการปนเปื้อนของโครเมียมในสภาพแวดล้อม และค่าใช้จ่ายสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการที่ศึกษานี้เท่ากับ 32 บาท / kg ของเศษหนังสัตว์ มีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาการนำโครเมียมจากเศษหนังกลับมาใช้ประโยชน์ ไม่ว่าจะโดยการเผา การออกซิไดซ์ หรือ วิธีการอื่นๆ ดังกล่าวไว้แล้วในบทที่ 2 เนื่องจาก chrome cake มีปริมาณโครมิกออกไซด์สูงถึงร้อยละ 17.63 โดยน้ำหนักแห้งของตะกอน chrome cake เมื่อนำ chrome cake มาละลายด้วยกรดซัลฟุริกเจือจาง 5 เท่า ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตามวิธีของ Zhuang (1992) สารละลายโครเมียมซัลเฟตที่ได้สามารถนำไปใช้ในการดองกรด (pickling) หรือใช้ในการดองหนัง (tanning) ได้ โครเมียมที่นำกลับมาใช้จะสามารถทดแทนการใช้ไบโครเมต ทั้งนี้ขึ้นกับสัดส่วนโดยโมลของกรดซัลฟุริกที่ใช้ และการปรับระดับความเป็นด่าง (basicity) โดยการเติมด่าง โดยปกติโครเมียมซัลเฟตที่เหมาะสมที่ใช้เป็นสารฟอกที่เรียก "Basic chromium sulfate" จะมี basicity ประมาณ 33%ดังสมการที่ (2) (Hauck, 1972 และ Sharphouse, 1989)

สมการการละลายตะกอนโครเมียมไฮดรอกไซด์ด้วยกรดซัลฟุริก แสดงได้ดังนี้

$$8Cr(OH)_3 + 12H_2SO_4 \longrightarrow Cr_8(SO_4)_{12} + 24H_2O \qquad (1)$$

$$8Cr(OH)_3 + 8H_2SO_4 \longrightarrow Cr_8(OH)_8(SO_4)_8 + 16H_2O \qquad (2)$$

สารละลายโครเมียมซัลเฟตที่ได้มีฤทธิ์เป็นกรด สามารถตกตะกอนออกมาในรูปเกลือโครเมียมซัลเฟต โดยการทำให้เป็นกลางด้วยการเติมด่าง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมคาร์บอเนต หรือแมกนีเซียมออกไซด์ ในการละลายตะกอน Chrome cake จะมีตะกอนสีขาวของแคลเซียมซัลเฟต ($CaSO_4$) ซึ่งไม่ละลายในกรด เป็นตะกอนหนักตกตะกอนอยู่ก้นหลอด สามารถแยกออกแล้วนำไปใช้ในการผลิตยิปซั่มได้ ส่วนตะกอนโปรตีนที่เหลือหลังจากละลาย chrome cake ด้วยกรดซัลฟุริกแล้ว ซึ่งเป็นตะกอนเบาแขวนลอยอยู่ในสารละลายโครเมียมซัลเฟต สามารถแยกออกโดยการรินส่วนสารละลายแล้วนำไปกรองหรือเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที สามารถจะนำไปเป็นปุ๋ยไนโตรเจนสำหรับไม้ดอก ไม้ประดับได้ (Zhuang,1992)

การล้างตะกอนจะสามารถลดปริมาณโปรตีนในตะกอน chrome cake ได้ (ผลการทดลองข้อ 5.4.6) ซึ่งจะเป็นการช่วยลดปริมาณโปรตีนในสารละลายโครเมียมซัลเฟตที่ได้จากการละลายตะกอนโครเมียมไฮดรอกไซด์ด้วยกรดซัลฟุริก และจะทำให้สารละลายโครเมียมซัลเฟตที่ได้มีคุณภาพดีขึ้น

ไฮโดรไลเสตโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนัง ด้วยอัลคาไน์โปรติเอส 1 % จะได้ผลผลิตโปรตีนผงโดยเฉลี่ย 60.9 % มีปริมาณไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบโดยเฉลี่ย 12.45 % ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับปริมาณไนโตรเจนในเศษหนังเริ่มต้น มีปริมาณโปรตีนในช่วง 75-85 % สูงกว่าโปรตีนจากพืชทุกชนิด และสูงกว่าโปรตีนจากปลาป่น (55-66%) เนื้อและกระดูกป่น (55-60%) (ทวี, 2527) อาหารโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังไม่เพียงแต่มีปริมาณโปรตีนสูง แต่ยังมีกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของคอลลาเจน ชนิด I อย่างครบถ้วน และเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับสัตว์อยู่ถึง 9 ชนิด คือ ฮิสติดีน ลูซีน ไอโซลูซีน อาร์จินีน ไลซีน เมทไธโอนีน ทรีโอนีน เฟนิลอะลานีน และ เวลีน เปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Taylor (1992) ขาดเพียงทริปโตเฟน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดที่ไม่มีอยู่ในคอลลาเจน แต่สามารถทดแทนทริปโตเฟนได้ โดยการผสมกากเมล็ดฝ้ายในสูตรอาหารสัตว์ เนื่องจากกากเมล็ดฝ้ายมีทริปโตเฟน ในปริมาณสูง ผลการทดลองข้อ 5.7 ไม่รายงานผลปริมาณฮิสติดีน เนื่องจากฮิสติดีนจะถูกทำลายในขั้นตอนการทำ performic oxidation

ไฮโดรไลเสตโปรตีนที่ได้มีปริมาณไขมัน โดยเฉลี่ยร้อยละ 1.34 แม้ว่าจะมีปริมาณค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณไขมันในกากถั่วเหลือง (3.0-4.8%) แต่สามารถทดแทนไขมันโดยผสมกับวัตถุดิบอาหารสัตว์จากพืชที่มีไขมันสูงได้ เช่น ผสมกับกากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง และ รำ แต่โดยปกติในการคำนวณสูตรอาหารสัตว์นั้นจะไม่เสริมไขมันเกิน 5 % สำหรับสัตว์กระเพาะเดี่ยว หรือไม่เกิน 2-3 % สำหรับสัตว์กระเพาะรวม การมีไขมันในอาหารมาก จะทำให้อาหารหืนเร็ว (จารุรัตน์,2533) ถ้าเสริมไขมันเกิน 5 % จะทำให้การย่อยได้ของเซลลูโลสลดลง และทำให้สัตว์กินอาหารลดลงด้วย (ศรีสกุล และ รณชัย, 2539)

ปริมาณเถ้าในไฮโดรไลเสตโปรตีนมีค่าประมาณร้อยละ 22 แสดงถึงปริมาณแร่ธาตุที่มีอยู่ในเศษหนังเริ่มต้นที่มีปริมาณเถ้าร้อยละ 17.8 และสารเคมีที่ใช้ในการย่อยสลายเศษหนัง มีปริมาณแคลเซียมร้อยละ 0.44 และมีปริมาณโครเมียมอยู่เพียงร้อยละ 0.0013 หรือ 13 ppm ซึ่งต่ำกว่าระดับสูงสุดของแร่ธาตุพิษ (Toxic minerals) ในอาหารที่สัตว์เลี้ยงต้านทานได้ คือ ระดับความต้านทานโครเมียมคลอไรด์ 1,000 ppm และ โครเมียมออกไซด์ 3,000 ppm (พันทิพา,2535)

การประเมินคุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบอาหารสัตว์ ที่จะนำมาเป็นแหล่งโปรตีนนอกจากพิจารณาจากปริมาณโปรตีนแล้ว ยังจะต้องพิจารณาถึงกรดอะมิโนเป็นหลัก เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน และการให้พลังงานแก่สัตว์เป็นอันดับรองลงมา เพราะการที่สัตว์จะเจริญเติบโตให้เนื้อ(อัตราการแลกเนื้อ)อย่างเหมาะสม จะต้องมีจำนวนกรดอะมิโนที่จำเป็นที่เพียงพอ คุณภาพโปรตีนก็เป็นเรื่องที่สำคัญ เนื่องจากวัตถุดิบแต่ละชนิดมีการเกาะตัวของกรดอะมิโน หรือเป็นโปรตีนที่ย่อยสลายให้เป็นกรดอะมิโนเล็กๆ ได้ยาก ทำให้สัตว์ไม่สามารถนำไปใช้ได้ (ทวี, 2527) แต่ไฮโดรไลเสตโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังในงานวิจัยของ Taylor(1992) กล่าวว่า เป็นโปรตีนโมเลกุลเล็กมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 1,000-3,000 ดาลตัน จึงน่าจะมีความเหมาะสมในการนำไปเป็นอาหารสัตว์ หรือเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

1. อัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตได้โดยเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 และตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 % แล้วทำ dialyzed กำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตบางส่วน เมื่อนำไปทำให้เป็นผงโดยวิธี lyophilization จะได้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสผง 10.3 กรัมต่อน้ำหมัก 3 ลิตร มีแอคติวิตีจำเพาะ 432.68 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เปอร์เซนต์ผลผลิตที่ได้เท่ากับ 69.37 % มีความบริสุทธิ์กว่า crude enzyme 2.29 เท่า
2. ชนิดและปริมาณเกลืออัลคาไลน์-เอิร์ท ที่เหมาะสมในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ของเศษหนัง เพื่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ คือการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ 6.5 % โดยน้ำหนักของเศษหนัง ที่มีความชื้น 25-32 % ในการปรับ pH เป็น 10.5
3. สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเศษหนังด้วยอัลคาไลน์โปรติเอส คือการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ในการปรับ pH เป็น 10.5 และที่อุณหภูมิ 45 °C ปริมาณอัลคาไลน์โปรติเอสที่ใช้ น้อยกว่า 1.0 % หรือปริมาณการใช้ในช่วง 0.2 - 1.0 % ที่ระดับการใช้อัลคาไลน์โปรติเอส 1.0 % จะทำให้เศษหนังละลายได้โดยเฉลี่ย 78.8 %
4. เวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายเศษหนังด้วยเอนไซม์ คือ 3 ชั่วโมง
5. การล้างตะกอน chrome cake ด้วยน้ำกลั่น สามารถลดปริมาณโปรตีนในตะกอน chrome cake ได้
6. เปอร์เซ็นต์ผลผลิตของไฮโดรไลเสตโปรตีนผงแห้งที่ได้เท่ากับ 60.9 % ซึ่งประกอบไปด้วยไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) 12.45 % ปริมาณไขมัน 1.34 % ปริมาณเถ้า 22.1 % ปริมาณแคลเซียม 0.44 % และปริมาณโครเมียม 0.0013 %
7. ปริมาณ chrome cake ที่เหลือจากการย่อยสลายด้วยอัลคาไลน์โปรติเอสเฉลี่ยประมาณ 21.27 % ปริมาณเถ้า 42.16 % ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 7.10 % ปริมาณไขมัน 1.14 % ปริมาณโครมิกออกไซด์ 17.63 % และ ปริมาณแคลเซียม 4.37 %
8. สามารถสกัดโครเมียมออกจาก chrome cake ด้วยกรดซัลฟุริกเจือจาง 5 เท่า หรือ H_2SO_4 : H_2O (1:4) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาการนำ crude enzyme มาใช้ในการย่อยสลายเศษหนัง เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตเอนไซม์ โดยจะสามารถตัดค่าใช้จ่ายของแอมโมเนียมซัลเฟต และลดความต้องการใช้พลังงาน
2. การใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ หรืออาจใช้แคลเซียมออกไซด์ ควรเตรียมให้อยู่ในรูปสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ เพื่อให้สะดวกในการเติมด่าง และแก้ปัญหาการไม่ละลายของแคลเซียมออกไซด์ เมื่อใช้น้ำปริมาตรน้อยลง จะทำให้ปริมาณของแข็งทั้งหมดในสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีนมีค่าสูงขึ้น
3. ศึกษาการนำสารละลายโครเมียมซัลเฟต กลับไปใช้ในการกระบวนการฟอกหนัง รวมทั้งการตกตะกอนของเกลือโครเมียมซัลเฟตในรูป Basic chromium sulfate ด้วยด่าง
4. ศึกษาการนำผลิตภัณฑ์โปรตีนไปทดสอบการให้อาหารสัตว์ โดยพิจารณาในแง่ที่ใช้เป็นหัวอาหาร และการคำนวณสูตรอาหารสัตว์ที่เหมาะสม รวมทั้งศึกษาการย่อยได้ของสัตว์ที่ได้รับอาหารโปรตีน
5. ศึกษาการนำกากตะกอนโปรตีนที่ได้จากการละลายตะกอน chrome cake ไปใช้เป็นปุ๋ยไนโตรเจนสำหรับพืช เช่น พืชในกลุ่มไม้ดอก ไม้ประดับ
6. ศึกษาการนำตะกอนแคลเซียมซัลเฟตไปใช้ในการผลิตยิปซั่ม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เกษม พงษ์มณี. 2536. การผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส โดย *Bacillus subtilis* TISTR 25. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ควบคุมมลพิษ, กรม. 2536. การใช้ประโยชน์ของเสียจากอุตสาหกรรม. กรุงเทพมหานคร: ฝ่ายการใช้ประโยชน์ของเสีย กองจัดการสารอันตรายและกากของเสีย.

จรินทร์ เจริญศรีวัฒนกุล. 2537. ฟอกหนังปัญหารายล้อมที่ต้องพิฆาต. ปกิณกะเศรษฐกิจ 5 (เมษายน-มิถุนายน): 16-19.

จันทิมา จิระนุชนารถ. 2539. การกลายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เพื่อเพิ่มการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส. วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จารุรัตน์ เศรษฐภักดี. 2533. อาหารสัตว์เศรษฐกิจ. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทรวิโรฒ

ตวงหทัย สาทรานุวัฒน์. 2539. การใช้ Alkaline protease จากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในการผลิตยางพาราแผ่น. Senior Project ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ทวี แก้วคง. 2527. โภชนศาสตร์สัตว์เบื้องต้น และการให้อาหารสัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร :กรุงสยามการพิมพ์.

ปกรณ์ จิโรจน์กุลกิจ. 2532. การแยกให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พันทิพา พงษ์เพียจันทร์. 2535. หลักการอาหารสัตว์ เล่ม 1 : โภชนะ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

พันทิพา พงษ์เพียจันทร์. 2538.หลักการอาหารสัตว์ เล่ม 2: หลักโภชนศาสตร์และการประยุกต์. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เยาวนุช สุจริตธรรม, ธงชัย พรรณสวัสดิ์, อรทัย ชวาลภาฤทธิ์, บุญสม ลิ่วศรีวิไล และ Meyhoefer, B.. 2536. การตกตะกอนผลึกโครเมียมจากน้ำเสียฟอกหนังโดยการบำบัดด้วยด่าง. การประชุมวิชาการสมาคมวิศวกรสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทยครั้งที่ 3. หน้า 364-374.

โรงงานอุตสาหกรรม, กรม. 2538. โรงงานฟอกหนังและผลิตภัณฑ์จากหนังในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. อุตสาหกรรมทหาร 28 (ธันวาคม): 12-14

วรรณวิมล ทรัพย์ดี. 2540.การผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิตสาขาเทคโนโลยีทางชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศศิธร เจริญวิเศษศิลป์ , ธงชัย พรรณสวัสดิ์, อรทัย ชวาลภาฤทธิ์, บุญสม ลิ่วศรีวิไล และ Meyhoefer, B..2536. การละลายตะกอนผลึกโครเมียมจากน้ำเสียฟอกหนังเพื่อการเวียนใช้. ใน การประชุมวิชาการสมาคมวิศวกรสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทยครั้งที่ 3. หน้า 375-386.

ศรีสกุล วรจันทรา และ รณชัย สิทธิไกรพงษ์. 2539. โภชนศาสตร์สัตว์. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

สถาบันสิ่งแวดล้อมไทย. 2539. "โครงการการประยุกต์ใช้หลักการทางเศรษฐศาสตร์ในการจัดการมลพิษโรงงาน". รายงานการศึกษาฉบับกลาง. 15 พฤศจิกายน 2539. หน้า 3-2

สุวรงค์ วงษ์ศิริ. 2536. การสกัดแทนนินจากเปลือกเงาะ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชา เคมีเทคนิค คณะวิทยาศาตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อภิศักดิ์ จงเจริญใจ. 2538. โปรตีนในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์. ใน การประชุมปฏิบัติการภาคฤดูร้อนครั้งที่ 20.หน้า 28-38.

อำพล เอื้ออารี และโชติ วิมลเฉลา. 2525. การพัฒนาเศษหนังกาวจากโรงงานฟอกหนังเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์. วารสารเคมีวิศวกรรม เทคโนโลยีทางอาหารและเชื้อเพลิง.4 (มกราคม): 17-35.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

Alloway, B.J. 1993. Heavy metal in soil. 1st ed. John Wiley & Sons: New York. pp.125-150.

ASTM.1993. Annual Book of ASTM Standards, section 15 , vol. 15.04 . American Society for Testing and Meterial . Philadelphia.

Beynon, R.J. and Bond, J.S..1989. Proteolytic enzyme. 1st ed. Oxford : IRL Press.

Bollag, D.M. and Edelstein, S.J. .1991. Protein methods. New York : Wiley-Liss ,Inc.

Cot, J. ; Manich, A.M. and Aramon, C. .1991. Design of a pilot plant for complete processing of by-product of the tanning industry : Preparation of acollagenic material with "zero" chrome content. Journal of the American Leather Chemistry Association. 86 : 141-156.

Eisenthal, R. and Danson, M.J. .1992. Enzyme assay :Apractical approach. New York : IRL Press.

Germann, H.-P. .1995. Chrome tannage from the viewpoint of ecology. Journal of the Society of Leather Techno logists and Chemists. 79: 82-85.

Hauck,R.A. .1972. Report on methods of chromium recovery and reuse from spent chrome tan liqour. Journal of the American Leather Chemistry Association. 67 : 422-430.

Heidemann, E. 1991. Disposal and recycling of chrome-tanned materials. Journal of the American Leather Chemistry Association. 86 : 331-333.

Helrich, K..1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. vol 1. 15th ed. Virginia: Association of Official Analytical Chemists.

Imai, T. and Okamura, H. 1991. Studies on incineration of chrome leather waste. Journal of the American Leather Chemistry Association. 86 : 281-294.

Locher, H. and Uffelmann, R. 1967. Ger. Offen. 1,254,813 cited in Taylor, M.M.; Diefendorf, E.J. and Marmer,W.N..1991. Efficiency of enzymic solubilization of chrome shavings as influenced by choice of alkalinity - reducing agents. Journal of the American Leather Chemistry Association. 86: 199-208.

McDonald, P.; Edwards,R.A. and Greenhalgh, J.F.D.1981. Animal Nutrition . New York : Longman Scientific Technical.

Menden, E.E.;Rutland, F.H. and Kallenberge, W.E. .1994. Chromium leachability from blue shavings by the TCLP procedure. Journal of the American Leather Chemistry Association. 89 : 2-13.

Michael, B.B. 1986. Encyclopedia of Materials Science and Engineering. vol.4. 1st ed. New York: Pergamon Press. pp. 2534-2539.

Okamura, H. 1976. Recovery of chromium from shavings by wet air oxidation. Journal of the American Leather Chemistry Association. 71: 173-179.

Othmer, K. 1981. Encyclopedia of Chemical Technology. vol. 14. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons. pp. 200-231.

Parvathi, M.S. and Nandy, S.C. 1984. Hydrolysis of vegetable tanned leather by a soil actinomyces. Leather Sci. 31(9): 234-236. Chemical Abstracts: Abstract No. CA102(14): 115502g.

Piez, K..A. and Reddi, A.H. . 1984. Extracellular Matrix Biochemistry. New York : Elsevier.

Rutland, F.H. 1991. Environmental compatibility of chromium-containing tannery and other leather product wastes at land disposal sites. Journal of the American Leather Chemistry Association. 86: 364-373

Sharphouse, J.H. . 1989. Leather technician's handbook. London : Buckland Press.

Scopes, R.K. . 1987. Protein purification : Principles and practice. 2nd ed. . New York : Springer-Verlag.

Taylor, M.M.; Diefendorf, E.J. and Na, G.C. . 1990. Enzymic treatment of chrome shavings. Journal of the American Leather Chemistry Association. 85: 264-274.

Taylor, M.M.; Diefendorf, E.J. and Marmer, W.N.. 1991. Efficiency of enzymic solubilization of chrome shavings as influenced by choice of alkalinity-inducing agents. Journal of the American Leather Chemistry Association. 86: 199-208.

Taylor, M.M.; Diefendorf, E.J.; Marmer, W.N. and Brown, E.M.. 1992. Characterization of products isolated by enzyme treatment of chromium-containing leather waste. Journal of the American Leather Chemistry Association. 87: 380-389

Taylor, M.M.; Diefendorf, E.J.; Marmer, W.N. and Brown, E.M.. 1993. Enzymatic processing of materials containing chromium and protein. U.S. Patent 5,271,912, December 21, 1993.

Taylor, M.M.; Diefendorf, E.J.; Marmer, W.N. and Brown, E.M.. 1994 Effect of various alkalinity-inducing agents on chemical and physical properties of protein products isolated from chromium containing leather waste. Journal of the American Leather Chemistry Association. 89: 221-228.

Tingda, J.; Dihua, M.; Yiwan, C. and Chunping, Z. . 1992. Nutrition of feed collagen protein powder from the reclamation treatment of chrome leather scrap. Animal feed Science and Technology. 37: 175-184.

UNEP-IE/PAC (United Nations Environment Programme Industry and Environment Programme Activity Centre). 1994. Tanneries and the environment : A technical guide to reducing the environmental impact of tannery operations. France: United Nations Publication.

Ward, O.P. 1983. "Proteinases" Microbial Enzymes and Biotechnology, (Forgarty, W.M. ed.), London and New York, Applied Science Publishers, pp. 251-317.

Wecharatana, M. 1995. Hazardous waste management in US. Military installations. Workshop on Recent Environmental Techonlogies and Hazardous Waste Management, July 26-27, 1995, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

Zhuang, Y. 1992. Profitability of protein recovery from leather shavings with high level chrome content. Seminar on the profitability of cleand techonlogy in the leather tanning industries, October 20-21, 1992. Samutprakarn: Bangpoo Country Club.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียม

1. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเก็บรักษา

Nutrient Agar Slant ประกอบด้วย

Beef Extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Bacto Agar	15	กรัม

ละลายส่วนผสมของอาหารในน้ำกลั่นจำนวน 1 ลิตร บรรจุในหลอดทดลองแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำหลอดทดลองมาวางเอียงประมาณ 15 องศา ก่อนที่อาหารจะแข็งตัว รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. อาหารที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อ (inoculum medium)

สูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (Basal medium) ประกอบด้วย

KH_2PO_4	1	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.01	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	20	กรัม
กลูโคส	5	กรัม

ละลายส่วนผสมทุกตัว ยกเว้นกลูโคส ในน้ำกลั่น แล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 7 เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ส่วนกลูโคสแยกอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมเข้าไปโดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 %

3. อาหารที่ใช้ในการเตรียมเชื้อตั้งต้น (starter inoculum medium)

การเตรียม Skim milk agar plate

ชั่ง Bato agar 1.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลาย Skim milk (stock solution 10 % w/v) 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้พออุ่น นำไปเทลงจานเพาะเชื้อ

4. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร สูตรอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

KH_2PO_4	1	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.01	กรัม
กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1		
แป้งมันสำปะหลัง	1.0	กรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเทียบมาตรฐานสารละลาย

1. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล

1.1 การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH, AR grade) 1 ส่วน ละลายในน้ำกลั่นเย็น ที่ต้มเดือด 20 นาที (CO_2 free) 1 ส่วน ในขวดรูปชมพู่ คนจนละลายหมด ปิดด้วยจุกยางแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 วัน แล้วปิเปตมา 5.40 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 1 ลิตร นำไปไตเตรทสารมาตรฐานปฐมภูมิ Potassium hydrogen phthalate (KHP)

1.2 การเทียบมาตรฐานสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล

ชั่งสารมาตรฐานปฐมภูมิ Potassium hydrogen phthalate (KHP) ที่อบแห้ง 120 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 0.20 กรัม (ให้ทราบน้ำหนักละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร หยดฟีนอล์ฟธาลีน 2-3 หยด ไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล ปริมาตร B (มิลลิลิตร)

การคำนวณ

$$\text{Normality of NaOH} = \frac{\text{KHP (g)} \times 1{,}000\ \text{(ml)}}{\text{B(ml)} \times 204.229}$$

2. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟุริก 0.1 นอร์มอล

2.1 การเตรียมสารละลายกรดซัลฟุริก

ปิเปตกรดซัลฟุริก ความเข้มข้น 96- 98 % จำนวน 3 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำกลั่นในขวดปริมาตร เจือจางให้ครบปริมาตร 1 ลิตร

2.2 ปิเปตมา 10 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ หยดฟีนอล์ฟธาลีน 2-3 หยด ไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล

การคำนวณ

$$N_1 = N_2V_2 / V_1$$

เมื่อ N_1 = ความเข้มข้นของกรดซัลฟุริก (นอร์มอล)

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (นอร์มอล)

V_1 = ปริมาตรสารละลายกรดซัลฟุริก (มิลลิลิตร)

V_2 = ปริมาตรสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ (มิลลิลิตร)

3. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.1 นอร์มอล

3.1 การเตรียมสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต

ชั่งโซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) 24.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ต้มเดือด 20 นาที (CO_2 free) เติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 1 กรัม เจือจางให้มีปริมาณครบ 1 ลิตร ในขวดปริมาตร

3.2 การเทียบมาตรฐานสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.1 นอร์มอล

ชั่งโพแตสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$) ที่อบแห้งที่130 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 0.20 กรัม (ให้ทราบน้ำหนักละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ละลายน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (1:1) 4 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 10 % โพแตสเซียมไอโอไดด์ (KI) 20 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยาง ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 5 นาที ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟต 0.1 นอร์มอล จนสารละลายมีสีจางลงเป็นสีน้ำตาลปนเขียว เติมสารละลาย 2 % น้ำแป้ง 2 มิลลิลิตร ไตเตรทต่อจนสารละลายมีสีเขียวใส

การคำนวณ

$$\text{Normality of } Na_2S_2O_3 = A/(0.04903 \times B)$$

เมื่อ A = น้ำหนัก $K_2Cr_2O_7$ ที่ใช้ (กรัม)

B = ปริมาตร $Na_2S_2O_3$ ที่ใช้ (มิลลิลิตร)

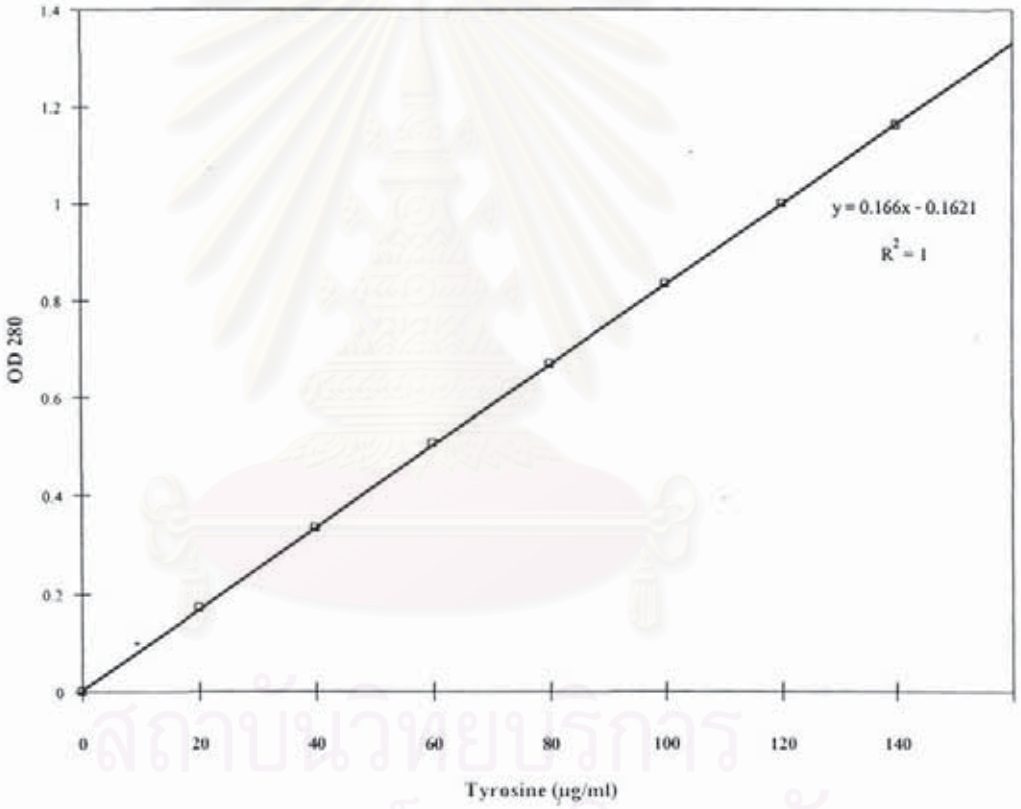
สารละลายแบลงค์ : น้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ที่มีกรดไฮโดรคลอริก (1:1) 4 มิลลิลิตร สารละลาย 10 % โพแตสเซียมไอโอไดด์ (KI) 20 มิลลิลิตร และน้ำแป้ง 2 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

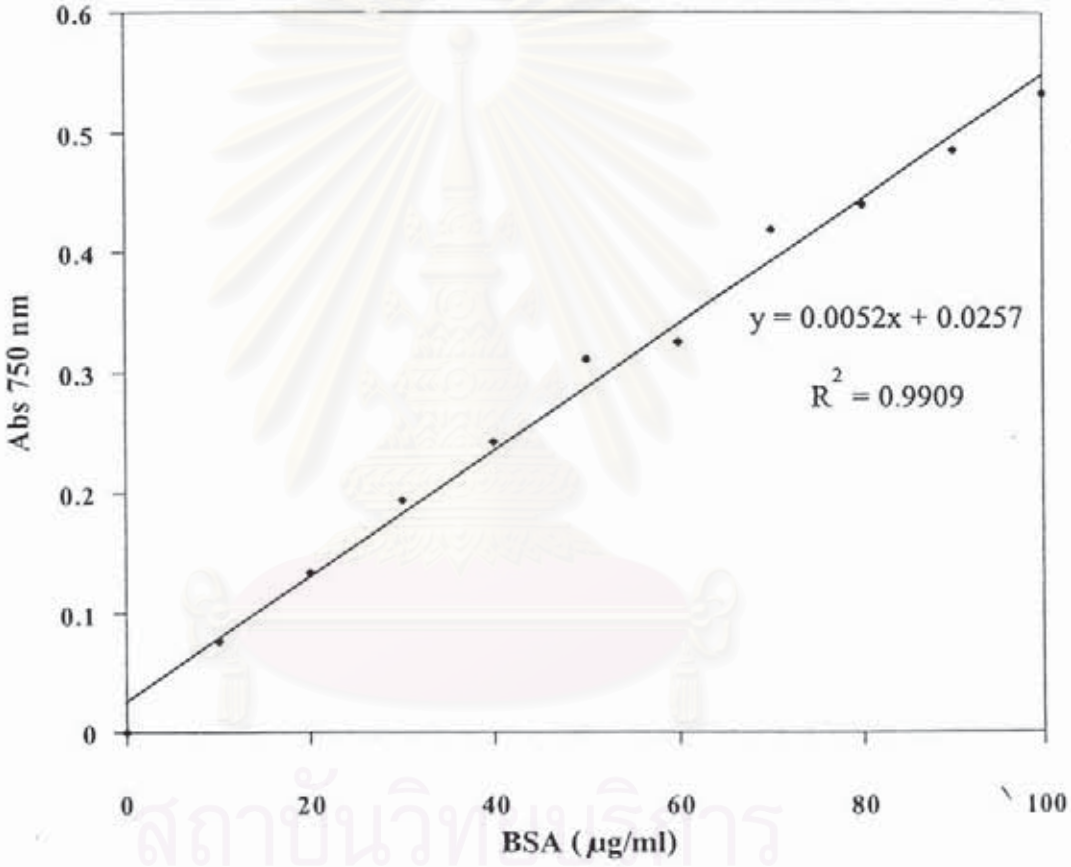
กราฟมาตรฐาน

ภาพผนวกที่ 1 ค กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์อัลคาไลน์โปรติเอสแอคติวิตี แปรผันความเข้มข้นของไทโรซีน 0-140 ไมโครกรัม วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร



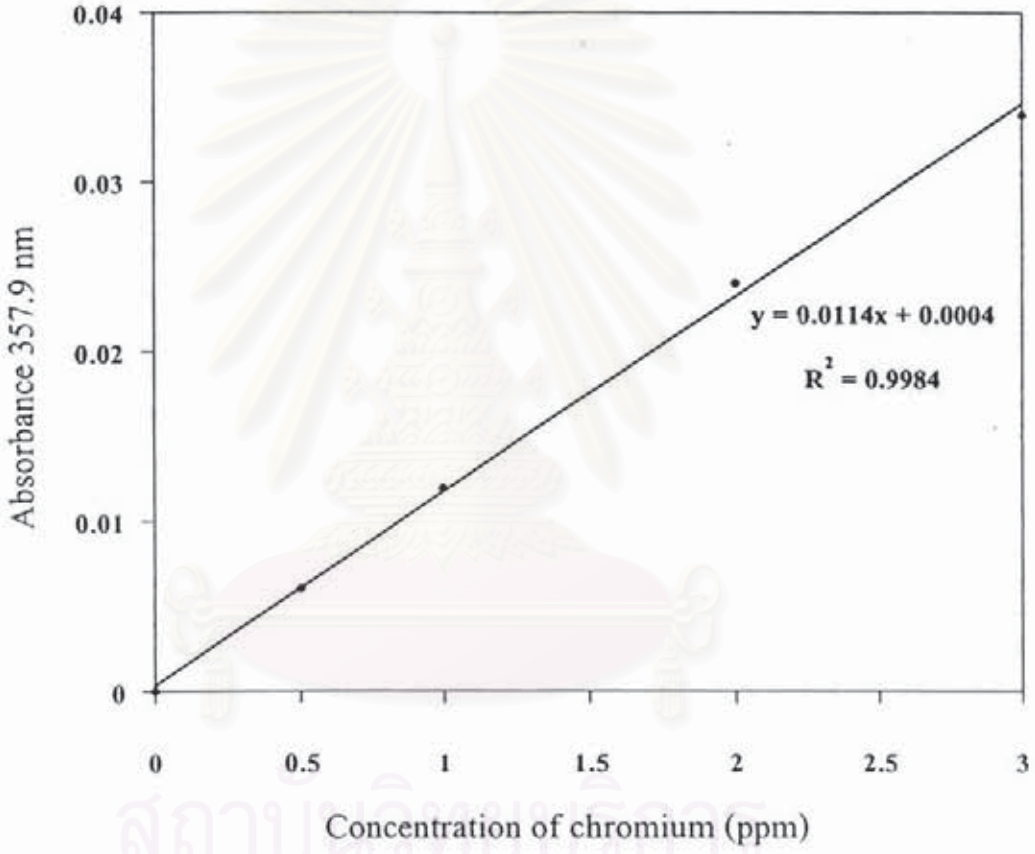
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพผนวกที่ 2 ค กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอว์รี แปรผันความเข้มข้นของ Bovine serum albumin (BSA) 0-120 ไมโครกรัม วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร



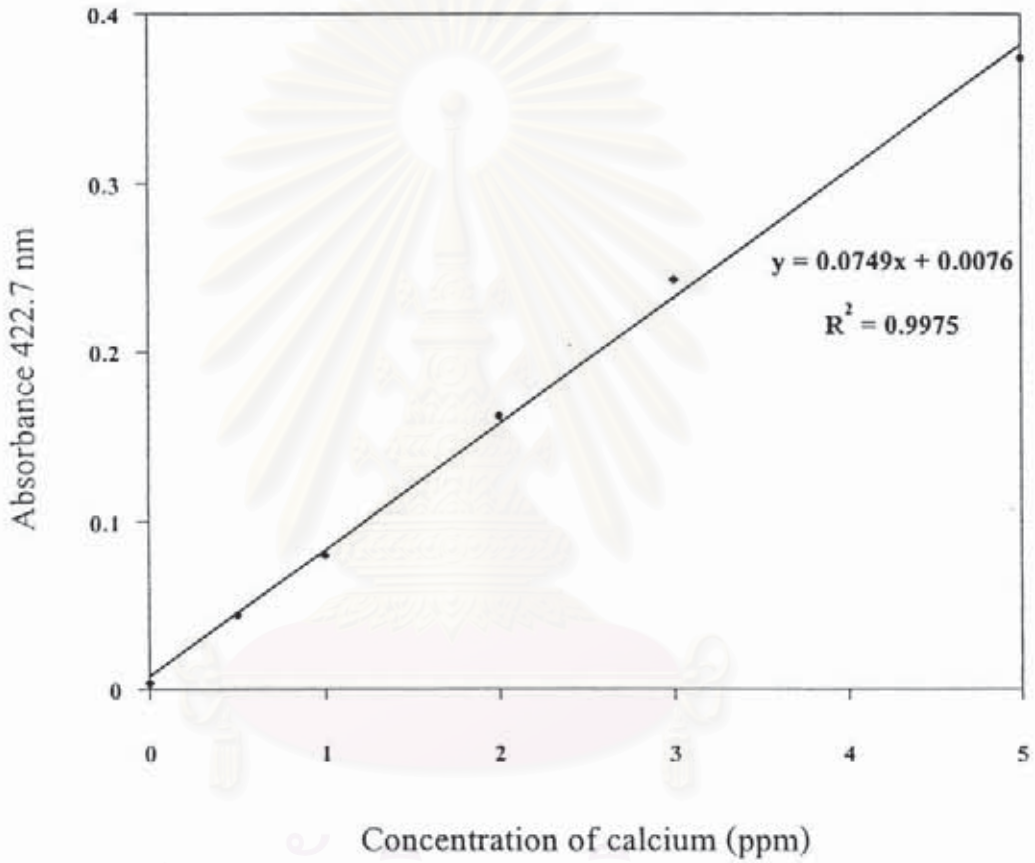
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพผนวกที่ 3 ค กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโครเมียม โดยวิธี Atomic absorption spectrophotometry



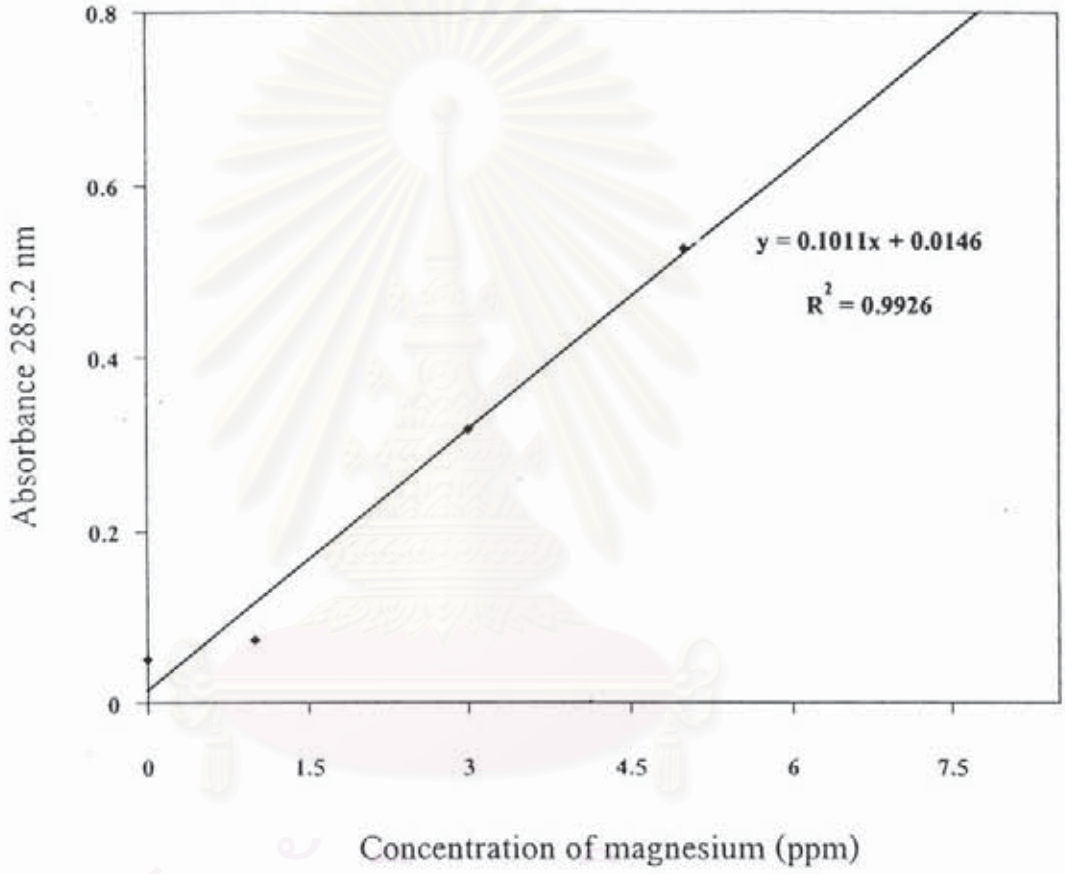
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพผนวกที่ 4 ค กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม โดยวิธี Atomic absorption spectrophotometry



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพผนวกที่ 5 ค กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแมกนีเซียม โดยวิธี Atomic absorption spectrophotometry



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณ Chrome cake เมื่อแปรผันปริมาณการใช้อัลคาไลน์โปรติเอส

SOV	df	SS	MS	F
Between group	7	2.259	0.3230	159.633*
Within group	16	0.032	0.0002	
Total	23	2.291		

* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ตารางผนวกที่ 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณ Chrome cake เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่ pH 8.5 และ 10.5

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	3	7815.663	2605.211	9215.280*
A	2	91.630	45.815	162.060*
B	1	7724.002	7724.002	27321.720*
AB	2	3.707	1.854	6.557*
Error	12	3.392	0.283	
Total	17	7822.732		

A = Temperature

B = pH

* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ตารางผนวกที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณ Chromium ในสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีน เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เป็น 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส

SOV	df	SS	MS	F
Between group	2	6.426	3.213	6.614*
Within group	6	2.915	0.486	
Total	8	9.340		

* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ตารางผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณ Chrome cake เมื่อแปรผันชนิดเกลืออัลคาไลน์-เอิร์ท

SOV	df	SS	MS	F
Between group	2	116.678	58.339	186.684*
Within group	6	1.875	0.312	
Total	8	118.553		

* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางผนวกที่ 5 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่า pH ของของผสม ภายหลังจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เมื่อแปรผันเวลาในการย่อยสลายเป็น 3 และ 6 ชั่วโมง

t-Test: Two-sample

	3 hrs	6 hrs
Mean	8.46	8.33
Variance	0.0002	0.0009
n	3	3
Pool Variance	0.0006	
Hypothesized Mean	0	
df	4	
t Stat	6.592	
t Critical two-tail		
Assuming Equal Variance	2.776	
Assuming Unequal Variance	3.182	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางผนวกที่ 6 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่า pH ของสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีนภายหลังจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เมื่อแปรผันเวลาในการย่อยสลายเป็น 3 และ 6 ชั่วโมง

t-Test: Two-sample

	3 hrs	6 hrs
Mean	8.10	8.16
Variance	0.0002	0.0012
n	3	3
Pool Variance	0.0007	
Hypothesized Mean	0	
df	4	
t Stat	-3.015	
t Critical two-tail		
Assuming Equal Variance	2.776	
Assuming Unequal Variance	3.182	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางผนวกที่ 7 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณ Chrome cake (%) ของสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีน เมื่อแปรผันเวลาในการย่อยสลายเป็น 3 และ 6 ชั่วโมง

t-Test: Two-sample

	3 hrs	6 hrs
Mean	20.560	21.457
Variance	0.084	0.313
n	3	3
Pool Variance	0.199	
Hypothesized Mean	0	
df	4	
t Stat	-2.464	
t Critical two-tail		
Assuming Equal Variance	2.776	
Assuming Unequal Variance	3.182	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางผนวกที่ 8 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนที่ได้กลับคืนภายหลังจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เมื่อแปรผันเวลาในการย่อยสลายเป็น 3 และ 6 ชั่วโมง

t-Test: Two-sample

	3 hrs	6 hrs
Mean	60.170	61.357
Variance	1.043	1.466
n	3	3
Pool Variance	1.255	
Hypothesized Mean	0	
df	4	
t Stat	-1.298	
t Critical two-tail		
Assuming Equal Variance	2.776	
Assuming Unequal Variance	2.766	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางผนวกที่ 9 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเฉลี่ยของปริมาณ Cr_2O_3 (%) ใน Chrome cake ภายหลังจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เมื่อแปรผันเวลาในการย่อยสลายเป็น 3 และ 6 ชั่วโมง

t-Test: Two-sample

	3 hrs	6 hrs
Mean	17.36	16.63
Variance	0.02	0.16
n	3	3
Pool Variance	0.09	
Hypothesized Mean	0	
df	4	
t Stat	3.00	
t Critical two-tail		
Assuming Equal Variance	2.78	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางผนวกที่ 10 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณ Chromium (ppm) ของสารละลายไฮโดรไลเสตโปรตีน เมื่อแปรผันเวลาในการย่อยสลายเป็น 3 และ 6 ชั่วโมง

t-Test: Two-sample

	3 hrs	6 hrs
Mean	0.994	1.646
Variance	0.0001	0.0003
n	3	3
Pool Variance	0.0002	
Hypothesized Mean	0	
df	4	
t Stat	-52.605	
t Critical two-tail		
Assuming Equal Variance	2.776	
Assuming Unequal Variance	3.182	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางผนวกที่ 11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณ Chrome cake เมื่อแปรผันปริมาณการใช้อัลคาไลน์โปรติเอสในช่วง 0- 1.6 %

SOV	df	SS	MS	F
Between group	8	2.980	0.373	175.536*
Within group	18	0.038	0.002	
Total	26	3.018		

* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย