การสกัดโครเมียมออกจากเศษหนังฟอกโครม โดยวิธีการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เพื่อการนำโปรตีนกลับมาใช้ประโยชน์

นางสาว สุภาภรณ์ กิตติวโรดม

วิทยานิพนธ์เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-639-699-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHROMIUM REMOVAL FROM CHROME-CONTAINING LEATHER WASTE BY ENZYMATIC HYDROLYSIS FOR PROTIEN RECOVERY

Miss Supaporn Kittiwarodom

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Environmental Science
Inter-Department of Environmental Science
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1998

ISBN 974-639-699-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสกัดโครเมียมออกจากเศษหนังฟอกโครม โดยวิธีการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เพื่อการนำโปรตีนกลับมาใช้ประโยชน์
โดย	นางสาว สุภาภรณ์ กิตติวโรดม
สาขาวิชา	สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิพัฒน์ พัฒนผลไพบูลย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิไล อโนมะศิริ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)

สุภาภรณ์ กิตติวโรดม : การสกัดโครเมียมออกจากเศษหนังฟอกโครมโดยวิธีการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพื่อการนำโปรตีนกลับมาใช้ประโยชน์ (CHROMIUM REMOVAL FROM CHROME-CONTAINING LEATHER WASTE BY ENZYMATIC HYDROLYSIS FOR PROTEIN RECOVERY) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.นภา ศิวรังสรรค์, อ.ที่ปรึกษาร่วม ผศ. ดร. วิไล อโนมะศิริ ; 80 หน้า. ISBN 974-639-699-4.

การกำจัดเศษหนังที่มีโครเมียมเป็นองค์ประกอบ ได้กลายมาเป็นปัญหาสำคัญของโรงงานฟอกหนัง การฝังกลบเศษหนังเหล่านี้ก็ไม่เป็นที่ยอมรับ เนื่องจากโครเมียม(III)สามารถถูกออกซิไดซ์ไปเป็นโครเมียม(VI) ซึ่งเป็นพิษและสามารถปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

การย่อยสลายเศษหนังโดยใช้เอนไซม์เป็นทางเลือกที่น่าสนใจที่จะนำมาใช้ เพื่อการนำโปรตีนกลับมาใช้ประโยชน์ โดยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโครเมียมออกจากเศษหนังฟอกโครมโดยใช้อัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตโดย *B.subtilis* TISTR 25. เริ่มต้นโดยทำการการต้มเศษหนังที่อุณหภูมิ 71°C ในสารละลายที่มีแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 6.5 % เพื่อปรับให้มี pH 10.5 ตามด้วยการย่อยสลายด้วยอัลคาไลน์โปรติเอส ปริมาณน้อยกว่า 1.0 % ที่ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสม 45°C เมื่อปฏิกิริยาการย่อยสลายเกิดขึ้น pH ของของผสมจะลดลงเหลือประมาณ 8.5 โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้สามารถแยกออกจากตะกอนโครเมียม โดยวิธีการกรองแล้วนำไประเหิดแห้ง เปอร์เซ็นต์ผลผลิตของโปรตีนผงโดยเฉลี่ยประมาณ 60.9 % โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับสัตว์อยู่ 9 ชนิดจากทั้งหมด 10 ชนิด และมีโครเมียมอยู่เพียง 13 ส่วนในล้านส่วน ซึ่งเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้

ส่วนกากตะกอนโครเมียมสามารถนำมาสกัดโครเมียมออกโดยการละลายด้วยกรดซัลฟุริกในน้ำในอัตราส่วน 1:4 ได้เป็นสารละลายโครเมียมซัลเฟต ซึ่งอาจนำกลับไปใช้ในขั้นตอนการตองหนังและใช้ในการฟอกหนังได้ ในขณะที่กากตะกอนโปรตีนที่เหลือจากการสกัดโครเมียมด้วยกรดสามารถแยกออกจากสารละลายโครเมียม และอาจนำไปใช้เป็นปุ๋ยไนโตรเจน นอกจากนั้นตะกอนแคลเซียมซัลเฟตอาจใช้เป็นยิปซั่มในการผลิตปูนซิเมนต์

ภาควิชา สหสาขา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C826900 : MAJOR INTER-DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL SCIENCE
KEY WORD: CHROMIUM / LEATHER WASTE / TANNING / PROTEASE / PROTEIN

SUPAPORN KITTIWARODOM : CHROMIUM REMOVAL FROM CHROME-CONTAINING LEATHER WASTE BY ENZYMATIC HYDROLYSIS FOR PROTEIN RECOVERY. THESIS ADVISOR : ASSIST.PROF. NAPA SIWARUNGSON , THESIS CO-ADVISOR : ASSIST. PROF. WILAI ANOMASIRI, Ph.D. 80 pp.
ISBN 974-639-699-4.

Disposal of chromium-containing leather waste has become a serious problem to the tanning industry. Landfills are disinclined to accept this leather waste because 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 to 10.5. The appropriate conditions for the enzyme hydrolysis should be less than 1.0 % with alkaline protease at 45°C for 3 hours. As the hydrolysis proceeded the pH of mixture fell to about 8.5. The obtained protein hydrolyzate could be isolated from chrome cake by filtration and then lyophilization. The yield 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 cake was extracted with (1:4) sulfuric acid solution. The extracted chromium sulfate solution may be reused into the pickling step and tanning process, whereas the protein residues separated from chromium solution and could be used as a nitrogen fertilizer. In addition, the calcium sulfate precipitate may be used as gypsum in cement production.

ภาควิชา สหสาขา ลายมือชื่อนิสิต สุพาภรณ์ กิตติวโรดม

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา นภ สิวรุ่งสรรค์

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม วิไล อโนมะศิริ

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดีของ ผศ.นภา ศิวรังสรรค์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการวิจัยมาด้วยดีตลอด

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. วิไล อโนมะศิริ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร. พิพัฒน์ พัฒนผลไพบูลย์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ผศ.ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ข้อคิดเห็น และข้อแนะนำที่ช่วยทำให้การแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ สารเคมี และสนับสนุนทุนวิจัยบางส่วน

ขอขอบคุณ ภาควิชาชีวเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย รวมทั้งเจ้าหน้าที่ ภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ลุงประจวบผู้ใจดี และเพื่อนพ้องน้องพี่ทุก ๆ คน

ขอขอบคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้เครื่อง lyophilizer ในการทำแห้งตัวอย่าง

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ กองการศึกษาเคมีปฏิบัติ กรมวิทยาศาสตร์บริการ ทุกท่าน

ขอขอบคุณ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ใช้เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน

ขอขอบพระคุณ คุณเจตน์ นักวิชาการห้องปฏิบัติการเคมี และ องค์การฟอกหนัง ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเศษหนังที่ใช้ในการวิจัยนี้

ขอขอบคุณ คุณธนากร บุญโพธิ์ทอง บริษัท กรุงเทพอาหารสัตว์ จำกัด ที่กรุณาวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน และให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

เนื่องจากการวิจัยนี้ได้รับทุนบางส่วนมาจากทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย และกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยและคณะกรรมการพิจารณาทุน มา ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบคุณ เพื่อน ๆ สหสาขาฯ แวดล้อม. ผู้มีน้ำใ จ และขอบคุณ เชิดชัย โพธิ์ศรี ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจเสมอมา

ท้ายนี้ ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่ ซึ่งสนับสนุนในด้านการเงินและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญภาพ ..... ฌ

คำย่อ ..... ญ

บทที่

1 บทนำ 1

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

3 ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์ 17

4 วิธีการทดลอง 20

5 ผลการทดลอง 31

6 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 49

รายการอ้างอิง 56

ภาคผนวก 61

ประวัติผู้เขียน 80

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. ปริมาณกากของเสียจากขั้นตอนต่างๆ ในกระบวนการฟอกหนัง 10
2. กรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับสัตว์ 12
3. การทำให้อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์บางส่วน 31
4. องค์ประกอบทางเคมีของเศษหนังจากขั้นตอนการขูดบาง 33
5. ปริมาณ chrome cake และ pH ของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต เมื่อแปรผัน ปริมาณการใช้อัลคาไลน์โปรติเอส 35
6. ปริมาณ chrome cake เมื่อแปรผันปริมาณการใช้เอนไซม์ ที่ pH 8.5 และ 10.5 36
7. ปริมาณ chrome cake และ ความสามารถในการละลายโปรตีนในเศษหนัง เมื่อแปรผันชนิดอัลคาไลน์-เอิร์ท 37
8. พารามิเตอร์บางตัวที่ใช้ในการตัดสินใจลดเวลาในการย่อยสลายด้วย อัลคาไลน์โปรติเอส 39
9. ปริมาณ chrome cake เมื่อแปรผันปริมาณการใช้อัลคาไลน์โปรติเอสในช่วง 0-1.6 % 40
10. ปริมาณ chrome cake และความสามารถในการละลายของเศษหนัง เมื่อล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น 42
11. องค์ประกอบทางเคมีของ chrome cake ที่เหลือจากการย่อยสลายเศษหนังด้วย อัลคาไลน์โปรติเอส 43
12. องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต 45
13. องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ทำแห้งโดยวิธีการระเหิดแห้ง ... 45
14. กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเสต 48

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	ภาพตัดขวางของหนังสัตว์	6
2.	ตำแหน่งที่สารฟอกประเภทต่างๆ ทำปฏิกิริยากับคอลลาเจน	6
3.	การเชื่อมโยงระหว่างสารประกอบของโครเมียมกับคอลลาเจน	7
4.	ขั้นตอนการฟอกหนัง	9
5.	อัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตโดย *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 ด้วยกรดซัลฟุริกเจือจาง 5 เท่า	44
12.	สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต	46
13.	ผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังด้วยอัลคาไลน์โปรติเอส	46

คำย่อ

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