บทที่ 5

ผลการทดลอง

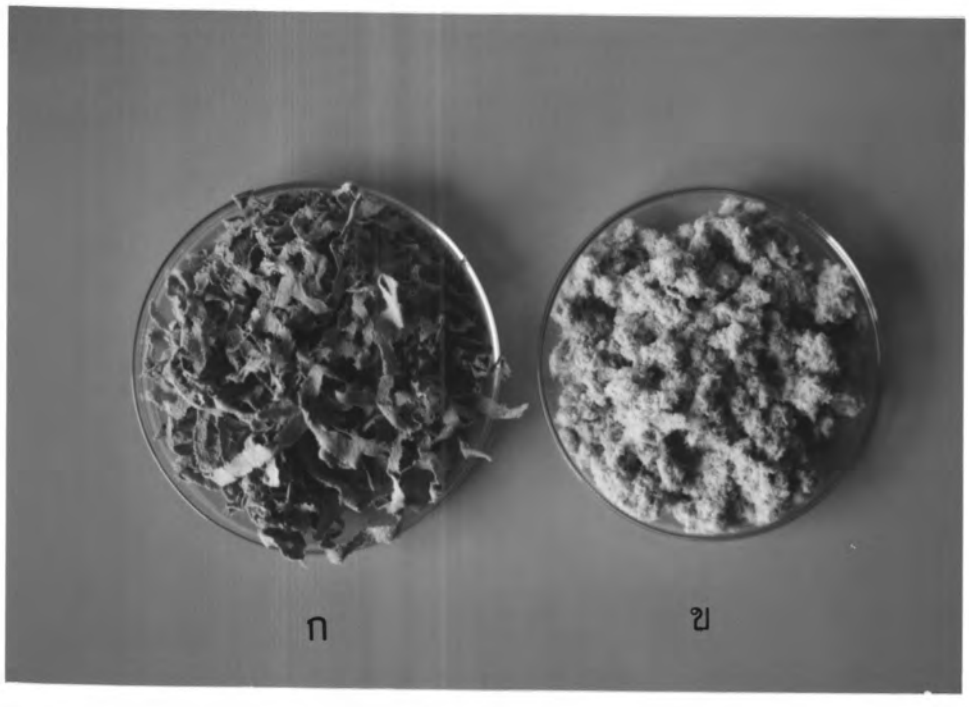
5.1 การเตรียมอัลคาไลน์โปรติเอสให้บริสุทธิ์บางส่วน

การแยกอัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตโดย *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 คิดเป็นค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 188.77 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นนำ crude enzyme มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยการตกตะกอนด้วย 70% แอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที 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 คิดเป็นค่าแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 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
เอนไซม์ผง	254,025	587.1	432.68	69.37	2.29

ภาพที่ 5 อัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตโดย *B. subtilis* TISTR 25
(ก) crude enzyme (ข) lyophilized enzyme



ภาพที่ 6 เศษหนังฟอกโครมจากขั้นตอนการขูดบาง
(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[2]	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] เปอร์เซนต์ ปราศจากความชื้น (moisture free basis)

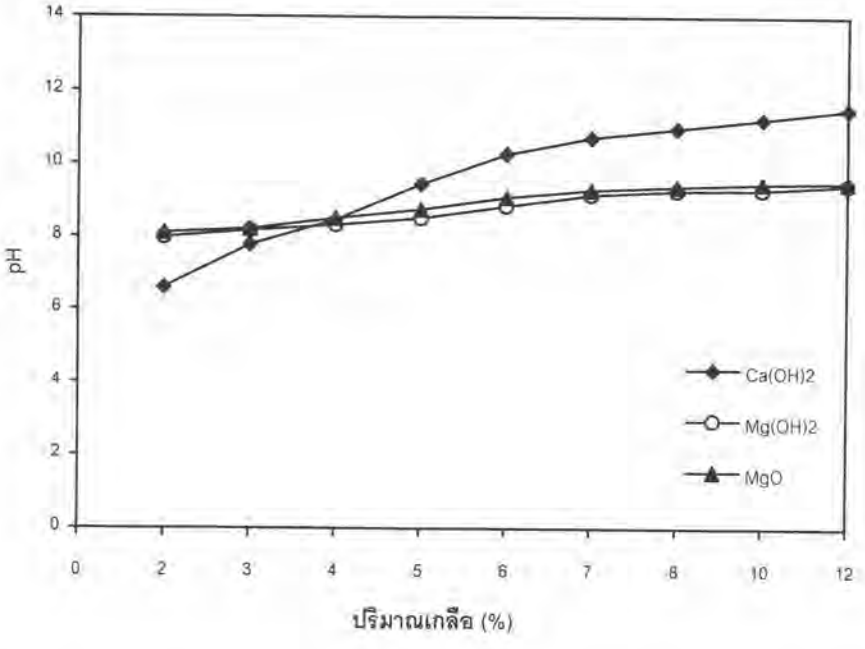
[3] Total Kjeldahl Nitrogen

[4] สามารถคำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยการคูณ 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 ที่ผลิตโดย *B. subtilis* TISTR 25 ในปริมาณที่เหมาะสม โดยแปรผันปริมาณเอนไซม์ในช่วง 0 - 8 % โดยน้ำหนักของเศษหนัง โดยก่อนการเติมเอนไซม์จะเตรียมเศษหนังให้เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ภายใต้สภาวะการทำงานของเอนไซม์ (optimal activity) ที่อุณหภูมิ 45 ^{o}C และ pH 10.5 โดยการทำให้โปรตีนในเศษหนังเสียสภาพทางธรรมชาติ ด้วยสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ติดตามวัดค่า pH ของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต และปริมาณเศษหนังที่ไม่ถูกย่อยสลายซึ่งมีตะกอนโครเมียมรวมอยู่ด้วย (chrome cake) เพื่อแสดงระดับการเกิดปฏิกิริยาของเศษหนังกับเอนไซม์ ถ้าปริมาณ chrome cake ต่ำ แสดงว่าเอนไซม์สามารถย่อยสลายเศษหนังได้ดี และค่า pH ที่ลดลงแสดงว่ามีการย่อยสลายที่พันธะเปปไทด์แล้วปลดปล่อยหมู่คาร์บอกซิลิก ในการทดลอง พบว่าค่า pH ของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตลดลงเมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นและมีแนวโน้มคงที่ ส่วนปริมาณเศษหนังที่ไม่ถูกย่อยมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 5) ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณเอนไซม์ 2 % ในการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากต้องการให้มีปริมาณเอนไซม์มากเพียงพอ เพราะอาจมีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ ไปในระหว่างการดำเนินการทดลอง เนื่องจากสภาวะในการทดลอง เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง รวมทั้งระยะเวลาที่ทำการศึกษาวิจัย

ตารางที่ 5 ปริมาณ chrome cake และ pH ของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตเมื่อแปรผันปริมาณการใช้อัลคาไลน์โปรติเอส

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

[1]เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามแนวตั้ง ตัวอักษรที่เหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

5.4.2 อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายด้วยอัลคาไลน์โปรติเอส

การศึกษาอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายเศษหนังด้วยอัลคาไลน์โปรติเอส 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) เขย่าของผสมในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 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

เมื่อนำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังด้วยเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45°C ไปวิเคราะห์ปริมาณโครเมียมโดยวิธีอะตอมมิคแอบซอร์ปชั่น พบว่าสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังด้วยเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 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 ชนิด คือแคลเซียมไฮดรอกไซด์ แมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ และ แมกนีเซียมออกไซด์ ปริมาณ 6.5 % โดยน้ำหนักของเศษหนัง แต่ในการใช้แมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ และ แมกนีเซียมออกไซด์ จะต้องใช้ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ในการปรับ pH ของของผสมให้ถึง 10.5 ก่อนเติมเอนไซม์ พบว่าการใช้ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ จะเหลือตะกอน chrome cake น้อยที่สุดรองลงมาคือ แมกนีเซียมออกไซด์ และ แมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ โดยจะเหลือปริมาณตะกอนร้อยละ 22.20, 27.01 และ 30.99 ตามลำดับ หรือมีความสามารถในการละลายของโปรตีนได้ร้อยละ 77.80, 72.99 และ 69.01 ตามลำดับ (ตารางที่ 7) และเมื่อทดสอบค่า pH ของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ พบว่าpH ของไฮโดรไลเสตจะลดลงเมื่อความสามารถในการละลายของเศษหนังเพิ่มขึ้น

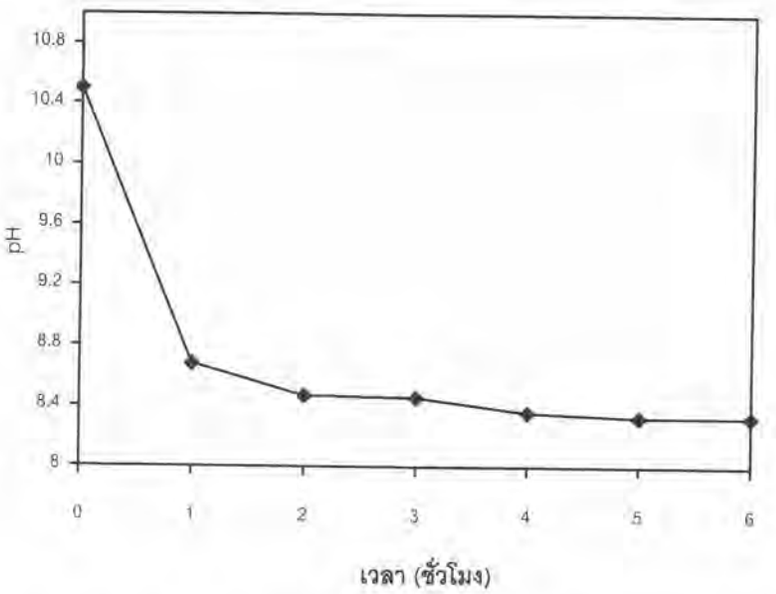
ตารางที่ 7 ปริมาณ chrome cake และความสามารถในการละลายโปรตีนเศษหนัง

อัลคาไลน์-เอิร์ท	ค่าเฉลี่ย[1] Chrome cake (%) ± SD	Solubility of shaving (%)	pH ของโปรตีนไฮโดรไลเสต
$Ca(OH)_2$	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) แช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 45°C โดยการแปรผันเวลาในการแช่ในช่วง 0-6 ชั่วโมง วัดค่า pH ของของผสมทุกๆ 1 ชั่วโมง ตั้งแต่ก่อนเติมเอนไซม์ (ชั่วโมงที่ 0) พบว่า pH ของของผสม มีค่า10.5 ซึ่งก็คือ pH สุดท้ายของของผสมหลังการย่อยตัวอย่างด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 6.5 % พบว่าค่า pH ของของผสมจะลดลงอย่างมากในช่วงชั่วโมงที่ 0-1 หลังการเติมเอนไซม์ (ภาพที่ 8) จาก pH 10.5 ลงมาที่ระดับ 8.68 และค่า pH มีแนวโน้มจะคงที่ เมื่อใช้เวลาในย่อยมากขึ้น 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 หลังจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างการใช้เวลาในการย่อยที่ 3 หรือ 6 ชั่วโมง ด้วยวิธี t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % แสดงในตารางผนวกที่ 5-10 พบว่า pH ของของผสม และ pH ของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต ที่กรองออกจาก chrome cake ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ความสามารถในการละลายของเศษหนัง หรือ ปริมาณน้ำหนักแห้งของ chrome cake และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่นำไปทำแห้งโดยวิธีการระเหิดแห้งก็มีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโครเมียมในchrome 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 ส่วนผลการวิเคราะห์ปริมาณโครเมียมในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต โดยวิธี อะตอมมิคแอบซอร์ปชั่น พบว่าการย่อยสลายด้วยอัลคาไลน์โปรติเอสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะมีปริมาณโครเมียมในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต ไม่ถึง 1 ppm ซึ่งน้อยกว่า การย่อยสลายที่ใช้เวลานานถึง 6 ชั่วโมง โดยมีปริมาณโครเมียมในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต 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 ของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต	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
ปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสตผงแห้ง (%)	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)ในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต	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 %

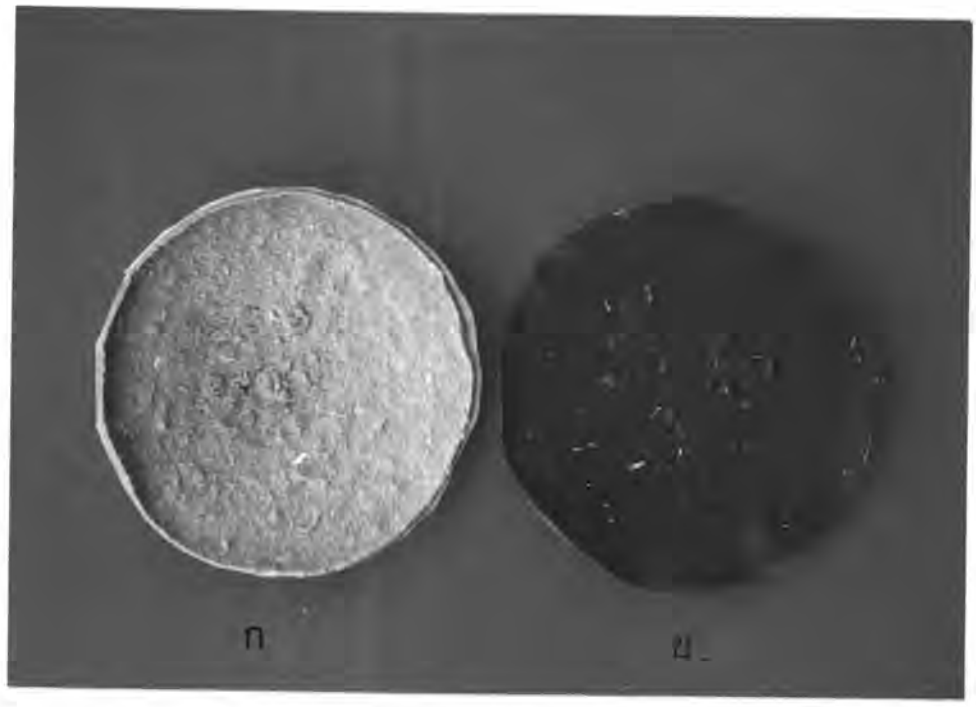
ตารางที่ 9 ปริมาณ Chrome cake เมื่อแปรผันปริมาณการใช้อัลคาไลน์โปรติเอสในช่วง 0-1.6 %

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 โดยจะเหลือ chrome cake ประมาณ 23 % โดยน้ำหนักเริ่มต้นของเศษหนัง

จากข้อมูลในตารางที่ 9 จะเห็นว่าที่ระดับการใช้เอนไซม์ 1.4 และ 1.6 % มีปริมาณ chrome cake สูงขึ้น เมื่อกรองตะกอน chrome cake แยกออกจากโปรตีนไฮโดรไลเสต 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



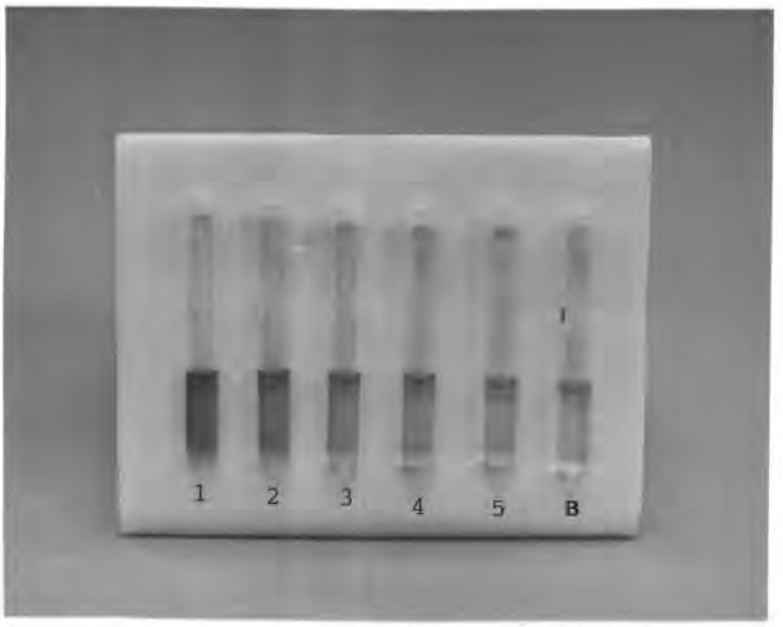
ภาพที่ 9 เศษหนังที่ไม่ถูกย่อยสลายและตะกอนโครเมียม (chrome cake)
(ก) ไม่ใช้เอนไซม์ (ข) ใช้อัลคาไลน์โปรติเอส 1.0 %

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 แยกเก็บส่วนสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตไว้ในตู้เย็น 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 ผลการทดสอบ แสดงดังภาพที่ 10

การหาน้ำหนักแห้งของปริมาณ chrome cake และความสามารถในการละลายของเศษหนัง แสดงในตารางที่ 10 จะเห็นว่าปริมาณ chrome cake ลดลงเหลือเพียงประมาณ 22 % และมีแนวโน้มจะคงที่ ตั้งแต่ระดับการใช้เอนไซม์ 1.0 % และการใช้เอนไซม์มากขึ้นถึง 3.0 % 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
เมื่อ 1,2,3,4,5 คือ การล้างตะกอนครั้งที่ 1,2,3,4,5 และ B คือ แบลงค์

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 จะนำไปกรองเพื่อแยกตะกอนออกจากสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต มีความชื้นประมาณร้อยละ 85.7 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดตะกอน และ ประสิทธิภาพการกรองโดยวิธี suction filtration ด้วยการปรับความแรงของปั๊มพ์สุญญากาศ(vacuum pump) ให้เหมาะสมเพื่อที่จะไม่ทำให้กระดาษกรองทะลุ ตะกอนที่อบแห้งแล้ว มีปริมาณโดยเฉลี่ยร้อยละ 21.27 จะนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ทางเคมี แสดงผลในตารางที่ 11 พบว่าองค์ประกอบหลักของ chrome cake ที่ปราศจากความชื้น คือ ปริมาณเถ้า โดยเฉลี่ยประมาณร้อยละ 42.2 ซึ่งคิดเป็นปริมาณโครเมียมในรูปโครมิกออกไซด์ อยู่ถึงร้อยละ 17.63 ที่เหลือเป็นแคลเซียมร้อยละ 4.37 ซึ่งมาจากแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการทดลอง ส่วนแมกนีเซียมมีอยู่ไม่เกิน1% เป็น impurity ในแคลเซียมไฮดรอกไซด์

ตารางที่ 11 องค์ประกอบทางเคมีของ Chrome cake ที่เหลือจากการย่อยสลายเศษหนังด้วยอัลคาไลน์โปรติเอส

องค์ประกอบ (%)	ค่าเฉลี่ย[5] ± SD	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

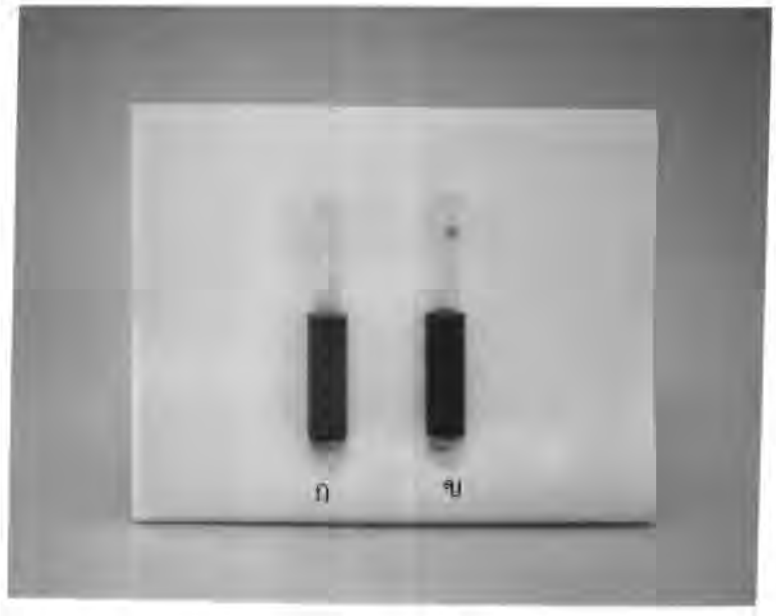
[1]Moisture free basis

[2]Total Kjeldahl Nitrogen

[3]ปริมาณโปรตีน โดยคูณ TKN ด้วย 6.25

[4] จำนวนซ้ำที่ทำการทดลอง

[5]ค่าเฉลี่ยจากจำนวนตัวอย่าง N



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 ที่เหลือจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ มีปริมาณโครเมียมมากกว่า 2-3 เท่า โดยการทดลองที่ไม่ใช้เอนไซม์มีปริมาณโครมิกออกไซด์โดยเฉลี่ยเพียงร้อยละ 6.77 และเนื่องจากอัลคาไลน์โปรติเอสที่ใช้มีสีน้ำตาลเข้มของกากเมล็ดทานตะวัน ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

5.6 องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต

สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีค่า pH อยู่ในช่วง 8.10-8.24 มีปริมาณโครเมียมละลายอยู่เพียง 0.903 ppm ปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) 29.53 mg/ml หรือประมาณ 29,530 ppm ปริมาณเถ้าเฉลี่ย 6.35 mg/ml หรือประมาณ 6,350 ppm มีปริมาณแคลเซียมและแมกนีเซียม 1103 และ 3.92 ppm ตามลำดับ องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต แสดงในตารางที่ 12

เมื่อนำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตไปทำให้เป็นผงแห้งโดยวิธีการระเหิดแห้ง (Lyophilization) 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 องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสต แสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 12 องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต

องค์ประกอบ	ค่าเฉลี่ย[1] ± SD	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 องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ทำแห้งโดยวิธีการระเหิดแห้ง

องค์ประกอบ (%)	ค่าเฉลี่ย[5] ± SD	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

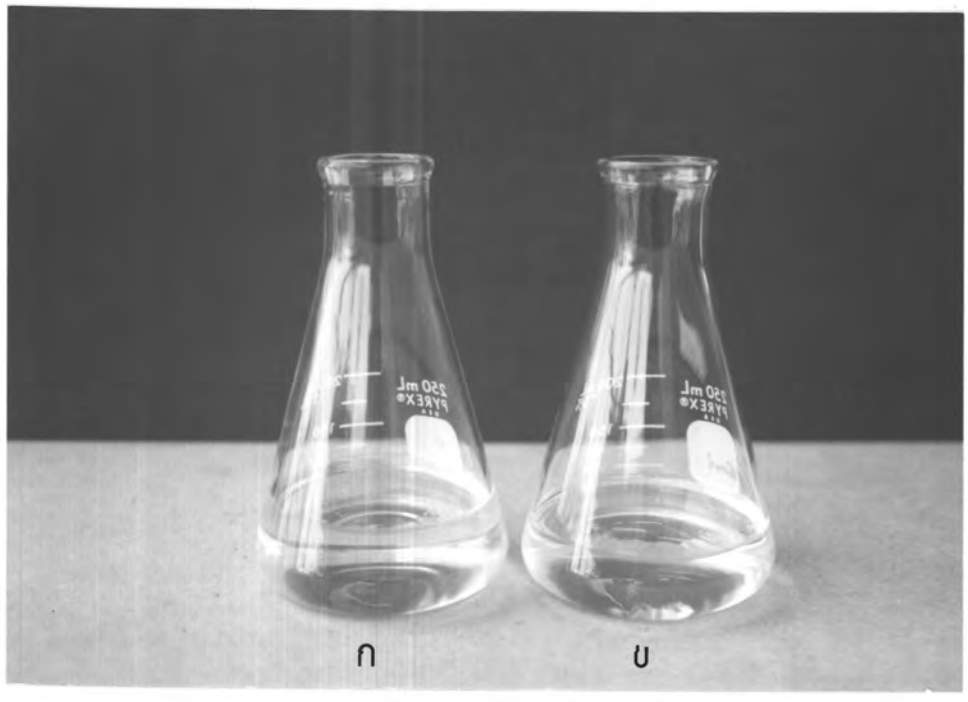
[1]Moisture free basis

[2]Total Kjeldahl Nitrogen

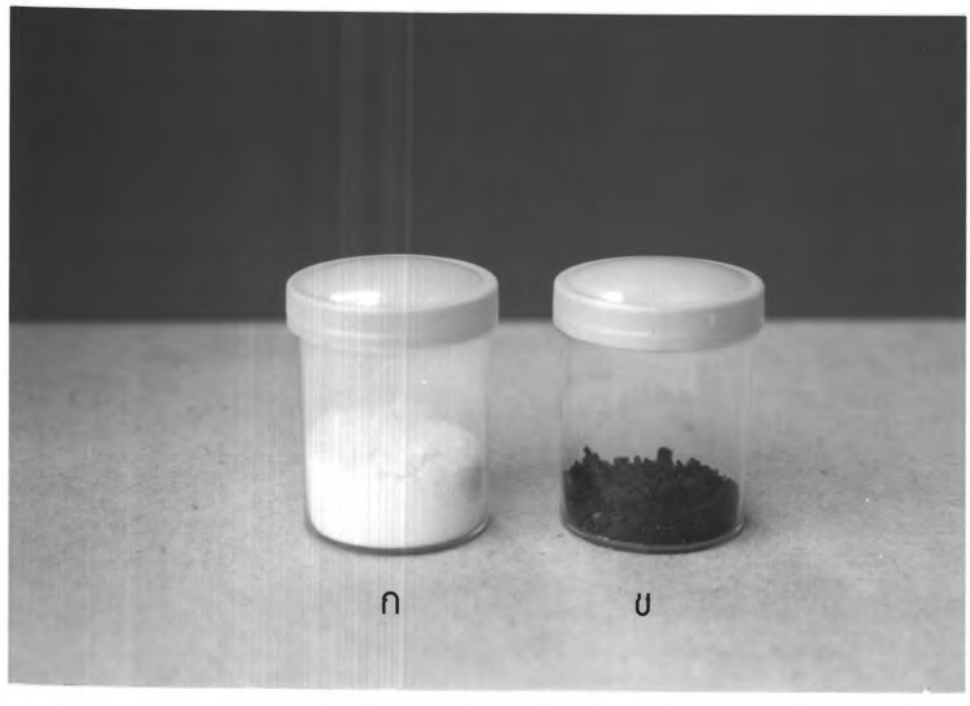
[3]ปริมาณโปรตีน โดยคูณ TKN กับ 6.25

[4] จำนวนซ้ำที่ทำการทดลอง

[5]ค่าเฉลี่ยจากจำนวนตัวอย่าง N



ภาพที่ 12 สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต
(ก) ใช้อัลคาไลน์โปรติเอส 1.0 % (ข) ไม่ใช้เอนไซม์



ภาพที่ 13 ผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังด้วยอัลคาไลน์โปรติเอส 1.0 %
(ก) โปรตีนไฮโดรไลเสต (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

จะเห็นว่าสัดส่วนกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ในตัวอย่าง มีสัดส่วนที่ใกล้เคียงกับกรดอะมิโนของคอลลาเจน ชนิด I และใกล้เคียงกับกรดอะมิโนในโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังด้วย ALKALASE™ ในงานวิจัยของ Taylor และคณะ (1992) ยกเว้นปริมาณไกลซีนในโปรตีนที่ได้มีปริมาณ 23.2 ซึ่งต่ำกว่าในคอลลาเจนมาตรฐาน (32.7)และโปรตีนของ Taylor ทั้งนี้อาจเนื่องจากโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเศษหนังอาจเป็นโปรตีนชนิดอื่นรวมอยู่ด้วย ไม่ใช่โปรตีนคอลลาเจนชนิดI เพียงอย่างเดียว แม้ว่ากรดอะมิโนแต่ละชนิดที่ได้จะมีปริมาณแตกต่างกับคอลลาเจน แต่จะเห็นว่ามีรูปแบบ(profile) เหมือนกัน จากตารางที่ 14 จะเห็นว่าโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนัง โดยใช้ด่างเพียงอย่างเดียว (ไม่เติมเอนไซม์) จะมีปริมาณกรดอะมิโนปริมาณต่ำกว่าในโปรตีนที่ย่อยด้วยอัลคาไลน์โปรติเอส โดยเฉลี่ยประมาณ 2.5 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับสัดส่วนปริมาณโปรตีนในตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสต ที่มีการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายเศษหนังต่อปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังด้วยด่างเพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 14 กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเสต

Amino acid Residues	Collagen (Type I)[1,4,5]	Protein hydrolyzate		
		Control[3,4]	Sample[3,4]	Taylor และคณะ 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]โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการวิจัยนี้

[4]Moisture free basis

[5]Piez ,1984

-- ถูกทำลายในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง