



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ "การแยกโปรตีนจากเศษหนังฟอกโครมด้วยแอลคาไลน์  
โปรติเอสเพื่อใช้เป็นอาหารปลา"

โดย : รองศาสตราจารย์นภา ศิวรังสรรค์ และคณะ

9 กรกฎาคม 2546

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ "การแยกโปรตีนจากเศษหนังฟอกโครมด้วยแอลคาไลน์  
โปรติเอสเพื่อใช้เป็นอาหารปลา"

คณะผู้วิจัย สังกัด

- |                             |                              |
|-----------------------------|------------------------------|
| 1. รศ.นภา ศิวรังสรรค์       | สังกัด จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 2. นาย กฤษฎา วสันต์ธนารัตน์ | สังกัด จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| 3. นาย สราวุฒิ สวัสดิ์กลาง  | สังกัด จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

## Executive summary

Thailand has face a problem of raw material for animal feed soon due to the over usage of fish meal in animal feed production. There is an alternative nitrogen source to replace lack of fish meal from chrome-containing leather which is a candidate of clean technology to reutilize the chrome-containing leather waste by removal of chromium and hydrolysis collagen in chrome-containing leather to protein hydrolysate. Alkaline protease is chosen for optimization protein hydrolysate production from chrome-containing leather. Then the obtained protein hydrolysate can be replaced fish meal in animal feed production. In addition, the pollution from chrome-containing leather waste will be reduced efficiently and reutilized completely for animal feed production.

This research will primarily focus on optimization of protease production from *Bacillus subtilis* TISTR 25 in batch culture fermenter and application of protease to hydrolysis of chrome shaving for protein recovery. The optimal conditions for alkaline protease production, optimal conditions for hydrolysis collagen from chrome shaving and the possibility of using collagen hydrolysate as and animal feed were studied.

The method of this experiment are alkaline protease production, digestion chrome shaving leather with alkaline protease, collagen hydrolysate for fish feed and fish farm testing respectively. This research can be self-sufficient and solve major problem for tannery and animal feed.

ชื่อโครงการวิจัย : การแยกโปรตีนจากเศษหนังฟอกโครมด้วยแอลคาไลน์โปรติเอสเพื่อใช้เป็น  
อาหารปลา

ชื่อผู้วิจัย : รองศาสตราจารย์นา ศิวรังสรรค์, กฤษฎา วสันต์ธนารัตน์ และ  
สราวุฒิ สวัสดิ์กลาง

สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากเศษหนังฟอกโครมโดยใช้แอลคาไลน์โปรติเอสที่  
ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 คือ ต้มเศษหนังที่อุณหภูมิ 71 °C โดยเติมแคลเซียม  
ไฮดรอกไซด์ 6.5 % (w/v) เพื่อปรับให้มี pH 10.5 เวลาที่เหมาะสมในการย่อย คือ 3 ชั่วโมง ที่  
อุณหภูมิ 45 °C และปริมาณแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรติเอสที่ใช้ คือ 10 ยูนิต ต่อน้ำหนักหนัง  
2.5 กรัม น้ำที่เหมาะสมในการทดลองในการต้มหนัง คือ น้ำประปา ปริมาณ 15 เท่าของน้ำหนัก  
หนัง วิธีการที่เหมาะสมในการทำให้สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตแห้งคือการอบแห้ง ไม่พบเชื้อที่  
ทำให้เกิดโรคปากและเท้าเปื่อย, แอนแทรกซ์ และไม่พบ *Salmonella sp.*, *Shigella sp.* และ *E.*  
*coli* ในเศษหนังฟอกโครมและโปรตีนผงแห้ง

เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเสตไปแทนที่ปลาป่นในอาหารปลาตุ๊กตุ๊กผสมในระดับ 0%, 25%,  
50% และ 70% (w/w) พบว่าหลังจากนำอาหาร 4 สูตรนี้ไปเลี้ยงปลาตุ๊กตุ๊กผสมขนาดเริ่มต้น 40  
กรัม ได้ผลการทดลอง คือ น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ร้อยละต่อ  
วัน) อัตราการรอด และอัตราแลกเนื้อ มีค่าทางสถิติไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p>0.05$ ) โดย  
ระดับโปรตีนที่เหมาะสมในการแทนที่ปลาป่นอยู่ในช่วง 25-50 % (w/w)

Project Title : PROTEIN REMOVAL FROM CHROME - CONTAINING LEATHER  
WASTE BY ALKALINE PROTEASE FOR FISH NUTRITION.

Name of researcher : ASSOC. PROF. NAPA SIWARUNGSON, KRITSADA WASANTANARUT  
AND SARAWUT SAWATKLANG.

The optimal condition for protein removal from chrome shavings by alkaline protease from *Bacillus subtilis* TISTR 25 were pretreated at a temperature 71 °C and pH 10.5 adjusted by adding 6.5% (w/v) calcium hydroxide, then performing enzyme hydrolysis with 10 unit enzyme per 2.5 g shaving weight in tap water 15 fold of shaving weight. The protein hydrolyzate was oven-dried. There were no microorganisms causing Foot and Mouth disease or Anthrax, *Salmonella* sp., *Shigella* sp. and *E. coli* detected in chrome shavings and protein hydrolyzate.

The protein hydrolyzate was used in replacement of fishmeal in fish feed for hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* x *Clarias gariepinus*) at the inclusion levels of 0, 25, 50 and 75% (w/w) respectively. Four diets treatments on hybrid catfish (40 g) were experimented. The results showed weight gain, specific growth rate, survival rate and feed conversion rate were not significant difference at  $p > 0.05$ . The optimum protein level for replacing fishmeal was in the range of 25-50% (w/w).

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้จัดทำขอขอบคุณภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมี ที่ใช้ในการวิจัย เจ้าหน้าที่และบุคลากรทุกท่านในภาควิชาชีวเคมีที่ให้ความช่วยเหลือและความสะดวกในการทำงานวิจัยครั้งนี้ บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ จำกัด (มหาชน) ดร.ชวลิต อรชุนวงศ์ คุณสมนึก วิสุทธิพงศ์ถาวร และบุคลากรทุกท่านที่บริษัทที่กรุณาให้ใช้สถานที่ในการวิจัย และให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน บริษัทโกวาอินดัสเตรียลอินเตอร์เนชันแนลจำกัดและห้างหุ้นส่วนโกวาอินดัสเตรียลจำกัดที่ให้ reactor สำหรับการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตในระดับ 130 ลิตรและเอื้อเฟื้อสถานที่ที่ใช้ทำการทดลอง บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย สำหรับความอนุเคราะห์ด้านทุนอุดหนุนการวิจัยจนทำให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ คณะผู้จัดทำขอถือโอกาสขอบคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

## สารบัญ

หน้า

|                                        |    |
|----------------------------------------|----|
| บทคัดย่อภาษาไทย.....                   | ๗  |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....                | ๘  |
| กิตติกรรมประกาศ.....                   | ๙  |
| สารบัญ.....                            | ๑๐ |
| สารบัญตาราง.....                       | ๑๑ |
| สารบัญภาพ.....                         | ๑๒ |
| คำย่อ.....                             | ๑๓ |
| บทที่                                  |    |
| 1. บทนำ.....                           | 1  |
| 2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 5  |
| 3. ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์.....           | 23 |
| 4. วิธีการทดลอง.....                   | 26 |
| 5. ผลการทดลอง.....                     | 40 |
| 6. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....       | 71 |
| 7. รายงานอ้างอิง.....                  | 77 |
| 8 . ภาคผนวก.....                       | 85 |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่                                                                                                      | หน้า |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1. ปริมาณกากของเสียจากขั้นตอนต่าง ๆ ในกระบวนการฟอกหนัง<br>(กิโลกรัมต่อ 1,000 กิโลกรัม หนังดิบหมักเกลือ) ..... | 8    |
| 2. กรดอะมิโนที่จำเป็น (Essential amino acid) สำหรับสัตว์.....                                                 | 10   |
| 3. ข้อแตกต่างระหว่างปลาดุกอุยและปลาดุกเทศ.....                                                                | 16   |
| 4. ส่วนประกอบ (% ของนน.แห้ง) ของอาหารที่ใช้ในการทดลอง.....                                                    | 35   |
| 5. ชนิดและปริมาณของวิตามินและแร่ธาตุที่ใช้ในการทดลอง.....                                                     | 36   |
| 6. กรดอะมิโนที่จำเป็นชนิดต่าง ๆ คิดเป็นร้อยละของน้ำหนักแห้งในอาหารแต่ละสูตร.....                              | 37   |
| 7. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (ร้อยละ) ของน้ำหนักแห้งอาหารทดลอง<br>แต่ละสูตร.....                        | 38   |
| 8. องค์ประกอบทางเคมีของเศษหนังจากขั้นตอนการชุบยาง.....                                                        | 42   |
| 9. ปริมาณ chrome cake และ pH ของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต<br>เมื่อแปรผันปริมาณการใช้แอลคาไลน์โปรตีน.....       | 44   |
| 10. ปริมาณ chrome cake เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการย่อยสลายด้วย<br>เอนไซม์ที่ pH 8.5 และ 10.5.....                | 45   |
| 11. ปริมาณ chrome cake และความสามารถในการละลายโปรตีนเศษหนัง.....                                              | 46   |
| 12. พารามิเตอร์บางตัวที่ใช้ในการตัดสินใจลดเวลาในการย่อยสลายด้วย<br>แอลคาไลน์ โปรตีน.....                      | 48   |
| 13. ปริมาณ chrome cake เมื่อแปรผันแอกติวิตีของเอนไซม์ในช่วง 0-60 unit.....                                    | 49   |

## สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางที่                                                                                                                                                                                                                    | หน้า |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 14. ปริมาณ chrome cake เมื่อแปรผันปริมาณน้ำในการย่อยสลายด้วย<br>เอนไซม์ในน้ำกลั่นและน้ำประปา (10, 15 และ 20 เท่า (w/v) ).....                                                                                               | 52   |
| 15. ปริมาณผลผลิต chrome cake, pH และปริมาณผลผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต<br>เมื่อทดลองการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในหม้อต้มขนาด 20 ลิตร (หนัง 1 กิโลกรัม<br>ต่อน้ำประปา 15 ลิตร) และ 130 ลิตร (หนัง 8 กิโลกรัมต่อน้ำประปา 120 ลิตร) ..... | 53   |
| 16. องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตเมื่อต้มใน flask<br>ขนาด 250 มิลลิลิตร, หม้อต้มขนาด 20 และ 130 ลิตร.....                                                                                                    | 56   |
| 17. องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตเมื่อต้มใน flask<br>ขนาด 250 มิลลิลิตร, หม้อต้มขนาด 20 และ 130 ลิตรแล้วทำแห้ง<br>โดยวิธีการอบแห้ง.....                                                                      | 57   |
| 18. กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเสต.....                                                                                                                                                                      | 61   |
| 19. น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม) ตลอดการทดลองที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีน<br>ผงแห้งแตกต่างกัน.....                                                                                                                       | 63   |
| 20. อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ร้อยละต่อวัน) ของปลาที่ได้รับอาหารที่มี<br>ระดับโปรตีนผงแห้งแตกต่างกัน.....                                                                                                                  | 65   |
| 21. ผลของอิทธิพลอาหารต่ออัตราการรอด (SR) อัตราแลกเนื้อ (FCR) ของ<br>ปลาทดลองที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนผงแห้งแตกต่างกัน.....                                                                                             | 66   |
| 20. ต้นทุนของการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต.....                                                                                                                                                                                   | 69   |

## สารบัญภาพ

| รูปที่                                                                                                   | หน้า |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1. แอลคาไลน์โปรตีนเอสที่ผลิตโดยเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> TISTR 25.....                              | 40   |
| 2. เศษหนังฟอกโครมจากขั้นตอนการชุบ.....                                                                   | 41   |
| 3. ค่าความเป็นกรด-ด่างของของผสม เมื่อแปรผันชนิด และปริมาณ<br>เกลืออัลคาไลน์-เอิร์ท.....                  | 43   |
| 4. ค่าความเป็นกรด-ด่างของของผสม เมื่อแปรผันเวลาที่ใช้ในการย่อย<br>สลายเศษหนังด้วยแอลคาไลน์โปรตีนเอส..... | 47   |
| 5. สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการทดลองใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร.....                             | 50   |
| 6. ตะกอน chrome cake ที่กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์หนึ่ง.....                                                | 50   |
| 7. ขนาดอนุภาค chrome cake ที่ได้จากกลุ่มที่ใช้เอนไซม์.....                                               | 51   |
| 8. ขนาดอนุภาค chrome cake ที่ได้จากกลุ่มที่ไม่ใช้เอนไซม์.....                                            | 51   |
| 9. การลดลงของอุณหภูมิของของผสมในหม้อต้มขนาด 20 ลิตรจากอุณหภูมิ 71 °C<br>จนเหลือ 45 °C.....               | 54   |
| 10. การลดลงของอุณหภูมิของของผสมในหม้อต้มขนาด 130 ลิตรจากอุณหภูมิ 71 °C<br>จนเหลือ 45 °C.....             | 55   |
| 11. สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการทดลองในหม้อต้มขนาด 20 ลิตร.....                                  | 57   |
| 12. สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตในชุดทดลองที่ใช้แอลคาไลน์โปรตีนเอส (กรองแล้ว).....                           | 58   |
| 13. โปรตีนผงแห้ง.....                                                                                    | 58   |
| 14. หม้อต้ม ขนาด 20 ลิตร.....                                                                            | 59   |
| 15. หม้อต้ม ขนาด 130 ลิตร .....                                                                          | 59   |

## สารบัญภาพ (ต่อ)

| รูปที่                                                                                                      | หน้า |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 16a. แสดงน้ำหนักเพิ่ม (กรัม) ของปลา ตลอดการทดลองที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนผงแห้งแตกต่างกัน.....         | 64   |
| 16b. แสดงน้ำหนักเพิ่ม (กรัม) ของปลา ตลอดการทดลองที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนผงแห้งแตกต่างกัน.....         | 64   |
| 17a. แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ร้อยละต่อวัน) ของปลาที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนผงแห้งแตกต่างกัน..... | 65   |
| 17b. แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ร้อยละต่อวัน) ของปลาที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนผงแห้งแตกต่างกัน..... | 66   |
| 18. แสดงลักษณะของอาหารปลาที่ใช้ในการทดลอง.....                                                              | 67   |
| 19. สถานที่ที่ใช้ในการทดลอง.....                                                                            | 67   |
| 20. ปลาอุกกลุ่มสมในบ่อที่ใช้ทดลอง.....                                                                      | 68   |

## คำย่อ

|       |                                           |
|-------|-------------------------------------------|
| °C    | องศาเซลเซียส                              |
| g     | กรัม                                      |
| μmol  | ไมโครโมล                                  |
| μl    | ไมโครลิตร                                 |
| μg/ml | ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร                     |
| mg/ml | มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร                     |
| N     | นอร์มอล                                   |
| M     | โมลาร์                                    |
| ml    | มิลลิลิตร                                 |
| nm    | นาโนเมตร                                  |
| w/v   | น้ำหนักต่อปริมาตร                         |
| v/v   | ปริมาตรต่อปริมาตร                         |
| rpm   | รอบต่อนาที                                |
| U/mg  | ยูนิตต่อมิลลิกรัม                         |
| HPLC  | High Performance Liquid<br>Chromatography |
| %     | เปอร์เซ็นต์                               |

## บทที่ 1

### บทนำ

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

อุตสาหกรรมฟอกหนังเป็นอุตสาหกรรมเกษตร (Agro-Industry) ประเภทหนึ่ง ซึ่งมีการนำหนังสัตว์มาใช้ประโยชน์ โดยผ่านกรรมวิธีฟอกหนัง หนังสัตว์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการฟอกหนังนั้น ประมาณร้อยละ 90 เป็นหนังโค และกระบือ ซึ่งเป็นหนังจากภายในประเทศและหนังดิบ

(Raw hide) ที่นำเข้าจากต่างประเทศ (จรินทร์ เจริญศรีวัฒนกุล, 2537)

ในประเทศไทยมีโรงงานฟอกหนังอยู่ประมาณ 150 โรงงาน อุตสาหกรรมฟอกหนังกว่าร้อยละ 80 นิยมใช้วิธีฟอกโครม ในการฟอกหนังจะมีเศษวัสดุเหลือทิ้ง คือเศษหนัง ปริมาณโดยเฉลี่ยปีละ 18,000 ตัน โดยเป็นเศษหนังจากขั้นตอนต่างๆ ในกระบวนการฟอกหนัง และมีเศษหนังที่มีโครเมียมเป็นองค์ประกอบรวมอยู่ด้วย ซึ่ง Environmental Protection Agency (EPA) จัดให้เป็นกากของเสียอันตรายหมายเลข K053 (EPA hazardous Waste Number K053) ซึ่งทางโรงงานไม่ได้นำไปขายหรือใช้ประโยชน์อื่นๆ แต่จะให้เทศบาลนำไปกำจัด ทำให้เพิ่มปัญหากับพื้นที่ทิ้งขยะ และพื้นที่ฝังกลบ (Landfill) เนื่องจากข้อจำกัดเรื่องพื้นที่รองรับขยะ มาตรการทางด้านสิ่งแวดล้อม และค่าใช้จ่ายในการขนย้ายและบำบัดกากของเสียเหล่านี้ ขยะที่มีโครเมียมเป็นองค์ประกอบอาจทำให้เกิดปัญหามลพิษจากโครเมียมในสภาพแวดล้อม เช่น ปัญหาน้ำชะขยะ (Leachate) ส่งผลการแพร่กระจายของโลหะหนักลงสู่พื้นผิวดิน น้ำใต้ดิน การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของดิน ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช และเข้าสู่ระบบห่วงโซ่อาหารของสิ่งมีชีวิต อันจะมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพอนามัยของประชาชน จึงได้พยายามคิดค้นวิธีการกำจัดและการใช้ประโยชน์เศษหนังดังกล่าว โดยการแก้ปัญหาในระยะแรกมุ่งเน้นที่การกำจัดเศษหนังและการนำโครเมียมกลับมาใช้ประโยชน์เป็นหลัก

อย่างไรก็ตาม มีการนำเศษหนังที่มีโครเมียมนี้ไปใช้ประโยชน์โดยตรง โดยไม่ผ่านกระบวนการกำจัดโครเมียม เช่น นำไปใช้ในการเป็นวัตถุดิบในการผลิตฉนวนไฟฟ้า วัสดุก่อสร้าง และแผ่นไฟเบอร์ (Fiber sheet) หรือผสมกับไวโนลอะซิเตท เพื่อผลิตพื้นรองเท้า รวมทั้งใช้แทนเยื่อกระดาษในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ แต่ท้ายที่สุด ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำเศษหนังดังกล่าวไปใช้เป็นวัตถุดิบ จะกลายเป็นขยะหลากหลายประเภทที่มีโครเมียมเป็นองค์ประกอบ

การนำโครเมียมกลับมาใช้ใหม่ โดยการเผาเศษหนังที่อุณหภูมิสูง ซึ่งจะทำให้ซีเถ้าของโครเมียมสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมเกลือโบโครเมต หรือเป็นแหล่งโครเมียม ในการเผาจะทำให้เกิดก๊าซพิษได้แก่  $\text{SO}_2$  และ  $\text{NO}_2$  รวมทั้งเขม่าควัน แม้ว่าจะสามารถกำจัด  $\text{SO}_2$  ได้ แต่มีต้นทุนการกำจัดสูง การเผาจะใช้ความร้อนสูง สิ้นเปลืองพลังงาน และที่สำคัญไม่สามารถนำโปรตีนมาใช้ประโยชน์ได้

การนำโครเมียมกลับมาใช้ใหม่ โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยอากาศ โดยใช้ตัวออกซิไดซ์ที่แรง เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือใช้คลอรีน ในสภาวะที่เป็นด่างเล็กน้อย สามารถทำได้ไม่สมบูรณ์ เป็นวิธีที่แพงมาก มีโปรตีนละลายผสมอยู่ในสารละลายโครเมียม และยังต้องเพิ่มขั้นตอนการรีดิวซ์โครเมียม(VI) ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา ให้เป็นโครเมียม(III) ด้วย

การย่อยสลายเศษหนังด้วยกรด เช่น กรดซัลฟูริก แม้ว่าจะเป็นวิธีที่ไม่แพง แต่มีข้อจำกัดคือมีโครเมียมเพียงบางส่วนเท่านั้นที่ละลายออกมาจากเศษหนัง และยังคงมีโปรตีนอยู่ในสารละลายโครเมียม สารละลายที่ได้สามารถใช้เป็นสารฟอกยับ (Retanning agent) ส่วนกรดอะมิโนสามารถนำมาใช้เติมในอาหารสัตว์ได้ นอกจากนี้สารละลายที่ได้จากการย่อยสลาย จะสามารถใช้เป็น fat liquors, surfactants หรือ fillers ในกระบวนการผลิตหนังฟอกได้

การย่อยสลายเศษหนังด้วยด่าง เช่น แคลเซียมหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์จะมีประสิทธิภาพมากกว่า จะทำให้เกิดตะกอนโครเมียมไฮดรอกไซด์ ส่วนสารละลายโปรตีนไฮโดรไลสเสตนำไปกำจัดเกลือโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ หรือใช้เรซินแลกเปลี่ยนไอออน (Ion exchange resin)

การบำบัดเศษหนังที่มีโครเมียม โดยการใช้นาโซมัลแอลคาไลน์โปรติเอส มีข้อได้เปรียบคือใช้อุณหภูมิไม่สูง ใช้ระยะเวลาสั้นโดยให้ pH ของปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 8.3-10.5 เพื่อป้องกันการละลายของโครเมียม โดยจะแยกโครเมียมไฮดรอกไซด์ ออกจากสารละลายโปรตีนโดยการกรอง ทั้งโครเมียมและโปรตีนสามารถนำกลับไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น นำกากตะกอนโครเมียม (chrome cake) ไปใช้ในกระบวนการฟอกหนัง โดยการละลายตะกอนด้วยกรดซัลฟูริก ส่วนโปรตีนที่ได้สามารถนำไปทำอาหารสัตว์หรือทำปุ๋ยก็ได้

หลักการบำบัดเศษหนังที่มีโครเมียมด้วยเอนไซม์ โดยอาศัยการเตรียมให้คอลลาเจนเสียสภาพทางธรรมชาติ (denature) ในสารละลายต่าง ที่อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสม ดังที่เข้าใจได้แก่ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ หรือ แมกนีเซียมออกไซด์ ชนิดเดียวหรือรวมกับด่างอื่น เพื่อปรับให้มี pH ที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ แล้วจึงเติมเอนไซม์ลงไป ซึ่งเป็นการย่อยสลายเศษหนังขั้นตอนเดียว (one step process) ต่อมาได้ทำการศึกษาเพื่อพัฒนาการนำกลับโปรตีนโดยการย่อยสลายแบบ 2 ขั้นตอน (two step process) ในขั้นตอนแรกจะย่อยด้วยด่าง จะได้โปรตีนเจล (gelable protein) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูง แล้วแยกเอาเศษหนังส่วนที่ไม่ถูกย่อย มาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โปรติเอสในขั้นตอนที่ 2 ซึ่งจะได้โปรตีนโมเลกุลเล็ก

ปัจจุบันการเลี้ยงสัตว์ได้ขยายตัวสูงขึ้น วัตถุประสงค์ที่จะนำมาทำอาหารสัตว์ก็จะหายากและไม่เพียงพอ เนื่องจากอาหารโปรตีนบางชนิด เช่น ปลาป่น และกากถั่วเหลืองจะมีน้อยในบางฤดูกาล ทำให้ราคาอาหารสัตว์สูงขึ้น จึงได้มีความพยายามที่จะหาแหล่งวัตถุดิบใหม่ๆ เป็นแหล่งโปรตีนสำหรับอาหารสัตว์ เศษหนังจากโรงงานฟอกหนังจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากเศษหนังมีปริมาณมากและสม่ำเสมอตลอดทั้งปี และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากปริมาณการบริโภคเนื้อสัตว์และความต้องการผลิตภัณฑ์เครื่องหนังเพิ่มขึ้น และที่สำคัญคือเศษหนังเป็นวัสดุเหลือทิ้งที่มีโปรตีนสูง หากสกัดแยกโครเมียมออกไปได้ จะสามารถนำโปรตีนนั้นกลับมาใช้ประโยชน์ได้ เช่น การนำไปเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์

โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการช่วยเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์สับสเตรตที่เป็นโพลีเปปไทด์สายใหญ่ให้เป็นโมเลกุลที่เล็กลง ซึ่งผลิตได้จาก พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยประมาณ 50% เป็นโปรติเอสจากจุลินทรีย์ ซึ่งมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมฟอกหนัง ผลิตผงซักฟอก เนื่องจากโปรติเอสที่ได้จากจุลินทรีย์ เป็นเอนไซม์ที่สร้างและขับออกสู่นอกเซลล์ (extracellular enzyme) จึงง่ายต่อการแยกสกัดและสามารถผลิตได้ในปริมาณสูง โปรติเอสจากจุลินทรีย์ที่มีการใช้กันมากในอุตสาหกรรม ได้แก่ แอลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อแบคทีเรีย โดยเฉพาะ *Bacillus* spp. เช่น *B. subtilis* , *B. licheniformis* และ *Alkalophilic Bacillus*

ปกรณ (2532) พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตได้ทั้งนิวทรัลโปรติเอสและแอลคาไลน์โปรติเอส ที่มีช่วงการทำงานได้ในระหว่าง pH 7-11 และมีแอกติวิตีสูงสุดที่ pH 8.0 และ pH 10.5

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

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อผลิตโปรตีนจากเศษหนังวัวที่ผ่านการฟอกโครมโดยวิธีการย่อยสลายด้วยแอลคาไลน์โปรติเอสที่ทำงานร่วมกับด่าง ให้มีปริมาณเพียงพอสำหรับใช้ในระดับอุตสาหกรรม
2. เพื่อศึกษาความเป็นได้ในการนำโปรตีนจากเศษหนังวัวที่สกัดโครเมียมออกไปแล้วไปใช้เป็นอาหารปลา

### ขอบเขตของการวิจัย

1. การศึกษานี้จะศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากเศษหนังวัวที่ผ่านการฟอกโครมโดยวิธีย่อยสลายด้วยแอลคาไลน์โปรติเอสแบบขั้นตอนเดียว ( one step process ) ร่วมกับการใช้ด่าง
2. เศษหนังที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นเศษหนังวัวจากขั้นตอนชุบบาง (Chrome shaving) จากโรงงานฟอกหนัง
3. แอลคาไลน์โปรติเอสที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นเอนไซม์ที่ผลิตเอง
4. โปรตีนที่ผลิตได้ในการวิจัยนี้จะถูกนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารปลา และนำไปทำการทดลองเลี้ยงในปลาเพื่อดูผลต่อการเจริญเติบโต และความเป็นพิษต่อปลา

### ผลงานที่คาดว่าจะเกิดขึ้น

1. เป็นแนวทางการใช้โปรตีนจากเศษหนังวัวที่ผ่านการฟอกโครมสำหรับเป็นส่วนประกอบในอาหารปลา
2. สามารถลดปริมาณเศษหนังที่มีโครเมียมเป็นองค์ประกอบและลดความเสี่ยงจากพิษภัยของโครเมียมที่เจือปนในเศษหนัง
3. เป็นแนวทางในการพัฒนาเศษหนังจากโรงงานฟอกหนังเพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนสำหรับการผลิตอาหารสัตว์อื่นๆ ต่อไป

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### โครเมียม

โครเมียมเป็นโลหะทรานซิชัน มีน้ำหนักโมเลกุล 51.9961 เลขอะตอม 24 จุดหลอมเหลว  $1857^{\circ}\text{C}$  ความหนาแน่น  $7.19\text{ g/cm}^3$  สัญลักษณ์ Cr สารประกอบโครเมียมมีเลขออกซิเดชันหลายค่าตั้งแต่ +2 จนถึง +6 ที่สำคัญได้แก่  $\text{Cr}^{3+}$  และ  $\text{Cr}^{6+}$  สารประกอบของโครเมียมส่วนใหญ่อยู่ในรูปออกไซด์ โครเมียมที่มีอยู่ในแหล่งธรรมชาติเป็น Cr (III) อยู่ในรูปของแร่โครไมต์ ( $\text{Chromite; CrO}_2$ ) มีการนำสารประกอบโครเมียมไปใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ อย่างกว้างขวาง ได้แก่ อุตสาหกรรมชุบโลหะ อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมก่อสร้าง อุตสาหกรรมสิ่งทอ และอุตสาหกรรมฟอกหนัง เป็นต้น แม้ว่าโครเมียมจะมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมต่างๆ มาก แต่ก็ไม่สามารถมองข้ามความเป็นพิษของโครเมียม ซึ่งจะมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อม โดยจะมีผลกระทบต่อสุขภาพอนามัย ทั้งแบบเฉียบพลัน แบบเรื้อรัง และการกลายพันธุ์ รวมทั้งยังเป็นสารก่อมะเร็งอีกด้วย

โครเมียม (VI) มีความเป็นพิษสูงกว่าโครเมียม (III) และในรูปอื่นๆ คณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ได้กำหนดค่ามาตรฐานน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมให้มีปริมาณโครเมียม (VI) ได้ไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอากาศมีฝุ่นของโครเมียม บริเวณที่ทำงานได้ไม่เกิน 5 มิลลิกรัมต่ออากาศหนึ่งลูกบาศก์เมตร องค์การอนามัยโลกได้กำหนดค่าโครเมียมทั่วไปไว้ว่า คนที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์สามารถรับโครเมียมเข้าในร่างกายได้ 50-70 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว ถ้ารับในปริมาณที่มากเกินไปก็จะมีผลกระทบต่อตับ, ไต และต่อระบบเลือด ผลกระทบที่เกิดขึ้นแบบเฉียบพลัน ทำให้เกิดการอาเจียน อูจาระร่วง ตกลเลือด และมีเลือดไหลเข้าสู่ระบบลำไส้ ทำให้เกิดการช็อคได้ ถ้าคนไข้ไม่เสียชีวิต คนไข้จะมีการตายของเนื้อเยื่อบริเวณตับและไต และมีระบบเลือดที่เป็นพิษ ส่วนผู้ที่ได้รับโครเมียมปริมาณไม่มากจะได้รับผลกระทบแบบเรื้อรัง บุคคลอาจรับโครเมียมได้ 2 ทาง คือ จากการสัมผัสกับโครเมียมโดยตรง ซึ่งโครเมียมสามารถทำลายผิวหนัง ทำให้เกิดแผลพุพอง และอีกทางหนึ่งก็คือการหายใจเอาไอของโครเมียมเข้าไป จะมีผลต่อปอด, ตับ, ไต, ระบบลำไส้ และโดยเฉพาะผนังกันจมูกซึ่งจะสัมผัสกับโครเมียมโดยตรง อาจทำให้เป็นมะเร็งบริเวณนี้ได้ นอกจากนั้น ยังอาจทำให้เป็นโรคเยื่อจมูกอักเสบ โรคปอดและหลอดลมอักเสบ โครเมียมสามารถทำให้เกิดเป็นมะเร็งได้เฉพาะบริเวณผนังกันจมูกและที่ปอดเท่านั้น ส่วนบริเวณเนื้อเยื่ออื่นๆ ยังไม่มีรายงานว่าโครเมียมสามารถทำให้เกิดมะเร็งได้ นอกจากนี้ โครเมียมยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมได้ เนื่องจากโครเมียมทำปฏิกิริยากับอาร์เอ็นเอ (RNA) ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้

## องค์ประกอบของหนังสัตว์

หนังสัตว์เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ ส่วนใหญ่เป็นหนังของโค กระบือ ซึ่งได้ชำแหละหนังแยกออกจากส่วนที่เป็นเนื้อ และนำไปหมักเกลือเพื่อรักษาสภาพหนังไม่ให้เน่าเปื่อย ก่อนส่งไปโรงงานฟอกหนัง โดยทั่วไปหนังสัตว์ประกอบด้วยน้ำ 64% โปรตีน 33% ไขมัน 2% เกลือแร่ 0.5% และสารอื่นๆอีก 0.5% โดยโปรตีนในหนังสัตว์เกือบ 80-90 % เป็นโปรตีนคอลลาเจน (collagen) เคอราติน (keratin) อีลาสติน (elastin) อัลบูมิน (albumin) โกลบูลิน (globulin) และมูโคโปรตีน (mucoprotein) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ด้วย โปรตีนคอลลาเจนในหนังสัตว์เป็นคอลลาเจนชนิด I ( type I ) ประกอบด้วยโซไฟลัปเปไนด์ชนิดวนซ้าย 3 โซ มาพันกันเป็นโครงสร้างเกลียวสาม (triple helix structure) แบบวนขวา (right handed super helix) ซึ่งมีความแข็งแรงไม่ละลายน้ำ แต่สามารถดูดน้ำเข้าไปในโมเลกุลได้ ทำให้แผ่นหนังพองตัวขึ้น ถ้านำไปต้มให้ความร้อนโมเลกุลคอลลาเจนจะสลายตัวได้เป็นเจลาติน (gelatin)

## ความรู้เกี่ยวกับการฟอกหนัง

หลักการของการฟอกหนังคือ การใช้ประโยชน์จากผิวหนังส่วนที่เรียกว่า คอเรียม (corium) โดยใช้เคมีภัณฑ์ไปทำปฏิกิริยากับคอลลาเจน (collagen) ซึ่งเป็นสารประกอบที่สำคัญของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันคอเรียม (connective tissue corium) โปรตีนคอลลาเจนมีลักษณะเป็นเส้นใย (fiber) สานกันเป็นโครงข่าย (network) เมื่อโปรตีนคอลลาเจนทำปฏิกิริยากับสารเคมีในกระบวนการฟอกหนัง จะสามารถเปลี่ยนหนังดิบ (hide) เป็นหนังฟอก (leather) ซึ่งสามารถเก็บได้นานและมีคุณสมบัติทางฟิสิกส์ดีขึ้น (สุวรรณค์ วงษ์ศิริ, 2536) การเก็บรักษาน้ำหนังสัตว์ (curing and preservative) เพื่อไม่ให้หนังเน่าเสียในระหว่างการขนส่งมายังโรงงานฟอกหนัง จะใช้วิธีหมักเกลือ (salting curing) โดยการแช่หนังในน้ำเกลือที่มีเกลืออยู่ร้อยละ 30 ของน้ำหนักหนังดิบ

การฟอกหนังมีหลายประเภทโดยสามารถแบ่งตามประเภทของสารที่ใช้ฟอกออกเป็น 4 ประเภทหลักคือ 1) การฟอกด้วยฝาด (vegetable tannage) 2) การฟอกด้วยสารสังเคราะห์ “syntan” (synthetic tannage) 3)การฟอกด้วยแร่ธาตุ (mineral tannage) และ 4) การฟอกด้วยแอลดีไฮด์ (aldehyde tannage) (Sharphouse, 1989) ประเภทที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางคือการฟอกด้วยฝาดและการฟอกด้วยโครม (chrome tannage) ในการฟอกฝาดจะอาศัยสารสกัดแทนนินจากส่วนของพืช เช่น เปลือกไม้ ไปทำปฏิกิริยากับโปรตีนในหนังสัตว์ การฟอกฝาดจะใช้ในการผลิตหนังที่ใช้ในงานหนัก (heavy leather) เช่น ทำพื้นรองเท้า เข็มขัด เป็นต้น ส่วนการฟอกโครม จัดเป็นการฟอกด้วยแร่ประเภทหนึ่ง ซึ่งจะอาศัยการทำปฏิกิริยาของโปรตีนคอลลาเจนกับสารประกอบของโครเมียม การฟอกโครมจะใช้เวลาสั้นกว่าการฟอกฝาด มักใช้ในการผลิตหนังที่ใช้

กับงานเบาๆ (light leather) เช่น กระเป๋าถือ ถุงมือ ใช้หุ้มเบาะเก้าอี้ หนังที่ฟอกโครมจะนุ่มและให้ความยืดหยุ่นดีกว่า สามารถนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆได้หลายประเภท

กรรมวิธีการฟอกหนังเริ่มจากขั้นตอนเตรียมการฟอก โดยจะนำหนังหมักเกลือมาล้างเกลือและสิ่งสกปรกออก (washing) แล้วคัดแยกหนัง (sorting and trimming) เพื่อคัดแยกเอาหนังส่วนที่ไม่ต้องการ เช่น หาง หู และหนังที่มีตำหนิออก แล้วนำไปล้างและแช่น้ำ (washing and soaking) เพื่อให้คืนสภาพธรรมชาติของหนังดิบ ต่อจากนั้นนำไปกำจัดขน โดยแช่น้ำปูนขาว (liming and unhairing) ในขั้นตอนนี้อาจมีการผสมโซเดียมซัลไฟด์ ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) ไดเมทิลเอมีน (dimethylamine) เพื่อช่วยเร่งปฏิกิริยาด้วย หลังจากนั้นนำไปล้างและถากหนังปูน (lime fleshing) เพื่อกำจัดไขมันและพังผืดออก แล้วนำไปผ่าเพื่อให้ได้ความหนาตามต้องการ (lime splitting) และเล็ม (trimming) แล้วจึงนำไปล้างปูนออก และทำให้หนังนุ่มขึ้น (deliming and bating) ก่อนนำเข้าสู่กระบวนการฟอกหนังประเภทต่างๆต่อไป โดยหนังที่ล้างปูนแล้วจะนำไปดองกรด (pickling) เพื่อทำลายฤทธิ์ด่าง และปรับให้มี pH ตามต้องการ แล้วเติมสารฟอกโครม(chrome) เช่น chromic sulphate ( $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ ) , potassium dichromate ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) เพื่อเปลี่ยนสภาพหนังไม่ให้เน่าเปื่อย หนังที่ฟอกได้ในขั้นตอนนี้จะมีสีฟ้า เรียกว่าหนัง “wet blue” หลังจากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนการผ่าหนัง (splitting) และขั้นตอนการขูดบาง (shaving) เพื่อปรับให้หนังมีความหนาตามต้องการ แล้วจึงนำไปฟอกทับ (retanning) ย้อมสี (dyeing) ใส่น้ำมัน (fat liquoring) และนำไปอบแห้ง (drying) แล้วทำให้หนังนุ่ม (stacking) ทำการขัดผิว (buffing) และตกแต่ง (finishing) แล้วจะได้หนังฟอกสำเร็จรูป (leather)

กระบวนการฟอกหนังมีเศษวัสดุเหลือทิ้ง คือ เศษหนัง สามารถแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ 1. เศษหนังก่อนผ่านกระบวนการฟอก หรือ “เศษหนังขาว” และ 2. เศษหนังหลังผ่านกระบวนการฟอก ในส่วนของเศษหนังขาวสามารถนำไปผลิตอาหารสัตว์ ซึ่งมีโปรตีนสูงถึงร้อยละ 70 (อำพล เอื้ออารีและโชติ วิมลเฉลา, 2525) นอกจากนี้ยังสามารถนำไปผลิตถากปุ๋ยหมัก และเจลาตินได้

เศษหนังขาว แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่

1. เศษหนังขาวชั้น 1 หมายถึง เศษหนังที่ได้มาจากการผ่าหนัง (splitting) เป็นหนังทั้งที่ถากเอาพังผืด ไขมันออกแล้วเหลือแต่โปรตีนคอลลาเจนเท่านั้นสามารถนำไปผลิตเจลาตินได้ดี
2. เศษหนังขาวชั้น 2 หมายถึง เศษหนังที่ได้จากการเชือนส่วนหู หาง และเล็บออกก่อนนำเข้าสู่กระบวนการฟอก มักเรียกว่า “เศษหนังขาวดิบ”
3. เศษหนังขาวชั้น 3 หมายถึง เศษหนังที่ได้มาจากการถาก (fleshing) จะเป็นพวก adipose tissue และส่วนที่ติดกับ corium ซึ่งจะมีทั้งไขมันและโปรตีนผสมกันอยู่ เศษหนังขาวชั้นนี้ในต่างประเทศเรียก “glue stock”

สำหรับเศษหนังที่ผ่านการฟอกโครม ซึ่งมีกว่าร้อยละ 20 ของปริมาณหนังดิบทั้งหมด (Othmer,1981) โดยได้มาจากขั้นตอนต่างๆ หลังการฟอกโครม 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) รวมทั้งการนำโครเมียมและโปรตีนกลับมาใช้ประโยชน์ ในการฟอกหนังจะมีเศษหนังเหลือทิ้งจากขั้นตอนต่างๆเป็นจำนวนมาก แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณกากของเสียจากขั้นตอนต่างๆ ในกระบวนการฟอกหนัง

| ขั้นตอนในการฟอกหนัง        | กากของเสีย (กิโลกรัมต่อ 1,000 กิโลกรัมของวัตถุดิบ)                                   |
|----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 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 โพสิโอสไซยาเนต เพื่อผลิตฉนวนไฟฟ้าและวัสดุก่อสร้าง การ

นำshaving ไปผสมกับ hydrophilic acrylate เพื่อผลิตแผ่นไฟเบอร์ (fibrous sheet) หรือผสมกับ ไวนิลอะซิเตทเพื่อผลิตพื้นรองเท้า รวมทั้งใช้แทนกระดาษ ในอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ

การเผาเศษหนัง ที่อุณหภูมิสูง ซึ่งจะทำให้ได้ซีเถ้าของโครเมียมสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมเกลือโบโครเมท หรือเป็นแหล่งโครเมียม

การนำกลับโครเมียมโดยอาศัย ปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยอากาศ โดยใช้สารละลาย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือใช้คลอรีน ในสภาวะที่เป็นด่างน้อยทำปฏิกิริยากับเศษหนัง เพื่อกำจัดโครเมียม (III) ในรูปโครเมตไปเป็น โครเมียม (VI) ในรูป peroxochromate แต่ข้อเสียก็คือ โครเมียม (VI) ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา ทำให้ต้องเพิ่มขั้นตอนการรีดิวซ์ (Cot และคณะ, 1991)

การย่อยสลายเศษหนังด้วยกรดซัลฟูริก จะได้สารละลายที่มีโครเมียมอยู่ ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นสารฟอกหนัง (retanning agent) ส่วนกรดอะมิโนสามารถนำมาใช้เติมในอาหารสัตว์ได้ นอกจากนี้สารละลายที่ได้จากการย่อยสลาย จะสามารถใช้เป็น fat liquors, surfactants และใช้เป็น fillers ในกระบวนการผลิตหนังฟอก ส่วนการใช้กรดอินทรีย์ เช่น กรดอะคริลิก (acrylic acid) ในการเตรียม โอลิโกเปปไทด์ (Oligopeptide) โดยจะทำให้โปรตีนไฮโดรไลสเกิดโพลิเมอร์ของไวนิลโพลิเมอร์ เพื่อใช้เป็น fillers สำหรับแผ่นหนัง (leathers)

การย่อยสลายเศษหนังด้วยด่าง เพื่อแยกตะกอนโครเมียมออกจากสารละลายโปรตีนโดยใช้ การต้มกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์ หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ จะได้ตะกอนโครเมียมไฮดรอกไซด์ แต่ถ้าใช้ด่างแอมโมเนีย ตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตที่ได้จะสามารถใช้ทำปุ๋ยได้ เมื่อนำตะกอนโครเมียมไปละลายด้วยกรดซัลฟูริกจะได้สารละลายโครเมียมซัลเฟต นำไปใช้ในขั้นตอนการดองกรดได้ (pickling) ได้

เศษหนังมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบกว่าร้อยละ 70 หากสามารถนำโปรตีนกลับมาใช้ในการผลิตอาหารสัตว์ได้ จะเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญมากแห่งหนึ่ง โดยส่วนมากการผลิตอาหารสัตว์ วัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนควรมีโปรตีนไม่ต่ำกว่าร้อยละ 20 ในการใช้โปรตีนจากเศษหนังเพื่อเป็นอาหารสัตว์ นอกจากจะต้องคำนึงถึงปริมาณโปรตีนแล้วยังต้องคำนึงถึงกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับสัตว์ด้วย กรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับสัตว์มีอยู่ทั้งหมด 10 ตัว ซึ่งสัตว์กระเพาะเดี่ยวไม่สามารถสังเคราะห์เองได้ จำเป็นต้องได้รับจากอาหาร ยกเว้นพวกสัตว์เคี้ยวเอื้องที่มีจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารช่วยสังเคราะห์ (พันทิพา พงษ์เพียจันทร์, 2538) กรดอะมิโนจำเป็นทั้ง 10 ตัวแสดงในตารางที่ 2

การไฮโดรไลซ์โปรตีน (protein hydrolysis) ด้วยกรดหรือด่าง (acid or alkali hydrolysis) หรือ สภาวะที่รุนแรง หรือการใช้ความร้อนสูง จะมีผลทำให้การนำไปใช้ของโปรตีน (protein availability) ลดลง (อภิศักดิ์ จงเจริญใจ, 2538) ดังนั้นการไฮโดรไลซ์โปรตีนในเศษหนัง เพื่อนำไปผลิตอาหารสัตว์จึงพิจารณาการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) โดยจะใช้

โปรติโอไลติกเอนไซม์ (proteolytic enzyme) หรือโปรติเอส (protease) ซึ่งมีความจำเพาะ (specificity) ในการย่อยสลายเพื่อสกัดโครเมียมออกไปโดยไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ ซึ่งจะทำให้ได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูง และอาจสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งโปรตีนสำหรับการผลิตหรือเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น ปุ๋ย เครื่องสำอาง เป็นต้น นอกจากการใช้ประโยชน์จากโปรตีนแล้ว ตะกอนของโครเมียมยังกลับมาใช้ในกระบวนการฟอกหนังได้อีก 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

วัตถุดิบที่เป็นแหล่งของโปรตีนสำหรับการผลิตอาหารสัตว์สามารถแบ่งเป็น 5 แหล่งใหญ่ๆ คือ

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

การนำเอาโปรตีนจากพืชมาใช้แม้ว่าจะราคาถูก แต่จะมีข้อจำกัด เนื่องจากพืชเหล่านั้นยังคงมีสารที่เป็น Anti-nutritional factors หรือ Toxic substances ซึ่งบางตัวจะยับยั้งการย่อยได้ของสัตว์ ทำให้สัตว์โตช้าและแกร็น ให้ผลผลิตลดลง และถ้าได้รับมากเกินไป อาจทำให้สัตว์ตายได้ การใช้ความร้อนอาจทำลายสารพิษเหล่านั้นได้แต่ก็จะมีผลต่อการนำไปใช้ได้ของโปรตีนลดลง นอกจากนี้การใช้โปรตีนจากพืชที่ให้พลังงานต่ำจะทำให้อัตราการแลกเนื้อเลวลง

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

1. Macroelements คือ แร่ธาตุที่มีอยู่มากในร่างกายสัตว์ ได้แก่ แคลเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม โซเดียม คลอรีน กำมะถัน และแมกนีเซียม
2. Trace elements คือ แร่ธาตุที่มีอยู่น้อยในร่างกายสัตว์ แต่ก็มีผลต่อสัตว์เช่นกัน ได้แก่ ธาตุเหล็ก สังกะสี ทองแดง แมงกานีส ไอโอดีน โคบอลต์ โมลิบดีนัม ซีลีเนียม และโครเมียม

แม้ว่าโครเมียมจะเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต แต่มีเอกสารรายงานว่า โครเมียมเป็นธาตุที่จำเป็นสำหรับหนู เพื่อให้มีการใช้ประโยชน์จากกลูโคสเป็นไปตามปกติ เนื่องจากโครเมียมทำหน้าที่เป็น cofactor ของฮอร์โมนอินซูลิน นอกจากนั้นโครเมียมอาจมีหน้าที่ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตและไขมันด้วย พบว่าถ้าอาหารหนูมีโครเมียม 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักสด) จะทำให้การเจริญเติบโตปกติ และถ้าเสริมโครเมียมอะซิเตต (chromium acetate) ลงไปอีก จะทำให้การเจริญเติบโตเร็วขึ้น (ศรีสกุล วรจันทรา และรณชัย สิทธิไกรพงษ์, 2539) แต่ถ้าให้โครเมียมในอาหารในระดับ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (น้ำหนักแห้ง) จะทำให้การเจริญเติบโตลดลง ตับและไตจะถูกทำลาย ในสัตว์น้ำนั้น โครเมียมเป็นธาตุที่ทำหน้าที่ช่วยฮอร์โมนอินซูลินในการใช้กลูโคส ช่วยลดโคเลสเตอรอล ช่วยในการสร้างโปรตีนและกระตุ้นการสร้างไขมัน ยังไม่มีรายงานอาการขาดในสัตว์น้ำ

### งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เศษหนังที่มีโครเมียมเป็นองค์ประกอบ (chrome-containing leather) สามารถนำไปสกัดโครเมียมออกได้ โดยอาศัยความสามารถในการละลาย (solubility) ของโปรตีน ในสารละลายของเกลืออัลคาไลน์เอิร์ธ (alkaline-earth) และอาศัยคุณสมบัติการตกตะกอนของโครเมียมในสภาวะต่าง เนื่องจากโปรตีนจะละลายได้ดีในสารละลายที่มีเกลือเล็กน้อย ที่เรียกว่าปรากฏการณ์ “salting in” ส่วนโครเมียม (III) สามารถตกตะกอนได้ที่สภาพเป็นกลางหรือเป็นด่างเล็กน้อย และ

จะละลายได้น้อยที่สุดคือ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ pH ประมาณ 8.5 (ศศิธร เจริญวิเศษศิลป์และคณะ, 2536) ในช่วง pH 9-11 โครเมียมจะยังคงสภาพเป็นของแข็งที่ไม่ละลายในรูปของโครเมียมไฮดรอกไซด์  $[\text{Cr}(\text{OH})_3]$  และที่ pH สูงกว่า 12 จะทำให้โครเมียมเปลี่ยนเป็นโครไมต์ ( $\text{CrO}_2$ ) ที่สามารถละลายน้ำได้เช่นกัน (Zhuang, 1992)

ปกรณ จิโรจน์กุลกิจ (2532) ศึกษาคุณสมบัติและการทำให้บริสุทธิ์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย ที่สามารถผลิตได้ทั้งนิวทรัลโปรตีนเอสและแอลคาไลน์โปรตีนเอสโดยเปรียบเทียบกับ *Bacillus licheniformis* ATCC 21415 ซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐานพบว่าเชื้อทั้งสองสามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีนเอสได้ไม่แตกต่างกัน และจากการศึกษาสมบัติทางกายภาพ เคมีจุลศาสตร์ ความจำเพาะในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์เปรียบเทียบกับเอนไซม์มาตรฐานคือ Subtilisin Carlsberg และ Subtilisin BPN พบว่ามีความจำเพาะในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์เหมือนกัน อัลคาไลน์โปรตีนเอสที่ได้สามารถทำงานได้ในช่วง pH 7-11 และมีแอกติวิตีสูงสุดที่ pH 10.5

เกษม พงษ์มณี (2536) ศึกษาการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในระดับขวดเขย่า โดยใช้แหล่งวัตถุดิบจากธรรมชาติเป็นแหล่งอาหาร พบว่ากากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตแอลคาไลน์โปรตีนเอสได้ และ pH ที่เหมาะสมสำหรับตรวจวัดการทำงานของแอลคาไลน์โปรตีนเอส คือ pH 10.5 ที่อุณหภูมิ 45 °C

วรรณวิมล ทรัพย์ดี (2540) ศึกษาการขยายส่วนการผลิตแอลคาไลน์โปรตีนเอสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร เพื่อพัฒนาสู่การผลิตในเชิงการค้า พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดประมาณ 159,215 หน่วยต่อปริมาตรทั้งหมด 3.5 ลิตร ในช่วงเวลาที่ 84

นภา ศิวรังสรรค์ (2542) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโครเมียมออกจากเศษหนังฟอกโครม โดยใช้แอลคาไลน์โปรตีนเอสที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 เริ่มต้นโดยทำการต้มเศษหนังในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 71 °C ในสารละลายที่มีแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 6.5% (w/v) เพื่อปรับให้มี pH 10.5 ตามด้วยการย่อยสลายด้วยแอลคาไลน์โปรตีนเอสปริมาณน้อยกว่า 1.0 % (w/v) ที่ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสม 45 °C เมื่อปฏิกิริยาการย่อยสลายเกิดขึ้น pH ของของผสมจะลดลงเหลือประมาณ 8.5 โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้สามารถแยกออกจากตะกอนโครเมียมโดยวิธีการกรองแล้วนำไปประเหิดแห้ง เปอร์เซ็นต์ผลผลิตของโปรตีนผงที่นำกลับมาได้โดยเฉลี่ยประมาณ 60.9 % โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับสัตว์อยู่ 9 ชนิดจากทั้งหมด 10 ชนิด และมีโครเมียมอยู่เพียง 13 ppm ที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้

อำพล เอื้ออารีและโชติ วิมลเฉลา (2525) ศึกษาการบีบอัดเศษหนังกาว 3 ชั้น เพื่อกำจัด โซเดียมซัลไฟด์ ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) ด้วยเครื่อง Thermal Hydraulic Press ภายใต้ความดันไอน้ำ 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (เกจ) จะสามารถนำกลับโปรตีนได้กว่า 70% เศษหนังที่ผ่านการบีบอัดจะนำไปอบแห้งแล้วบดให้ละเอียดสำหรับใช้เป็นอาหารโปรตีนสำหรับ สัตว์ได้ ส่วนของเหลวที่ออกจากเครื่องบีบอัดจะมีไขมัน สามารถแยกออกและนำไปใช้ในรูปไขมันดิบ (raw grease)

Taylor และคณะ (1992) ศึกษาการย่อยสลายโปรตีนในเศษหนังด้วยเอนไซม์แอลคาไลน์ โปรติเอส โดยการเตรียมตัวอย่างเศษหนังในปริมาณน้ำที่มากพอ ที่อุณหภูมิ  $60-85^{\circ}\text{C}$  และเติม กลีโกลแอลคาไลน์-เอิร์ธ และหรือกลีโกลแอลคาไลน์เพื่อปรับสภาวะละลายให้อยู่ในช่วง pH 8-12 และเติม ALKALASE<sup>TM</sup> 3% โดยน้ำหนัก กวนของผสมเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ หลังจากนั้นแยก โปรตีนไฮโดรไลเสตออกจากตะกอนโครเมียม พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีโครเมียมอยู่น้อยกว่า 1 ppm และไม่มีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของกรดอะมิโนเมื่อเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนของ คอลลาเจน

Taylor และคณะ (1993a) แสดงผลการสกัดโปรตีนเจลจากเศษหนังโดยใช้เอนไซม์ ALKALASE<sup>TM</sup> 0.1% โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 71 องศาเซลเซียส โดยการไฮโดรไลซ์ในสารละลาย ของกลีโกล MgO ความเข้มข้น 3% ร่วมกับ NaOH ความเข้มข้น 3% จะสามารถนำโปรตีนกลับคืน มาได้ 47% และ 65% ตามลำดับ

Taylor และคณะ (1994) แสดงผลการสกัดโปรตีนจากเศษหนังแบบ 2 ขั้นตอน (Two step process) โดยเอนไซม์ ALKALASE<sup>TM</sup> 0.1% โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 70-72 องศาเซลเซียส โดยการ ไฮโดรไลซ์ในสารละลายของกลีโกล MgO ความเข้มข้น 6% และ MgO ความเข้มข้น 4% ร่วมกับ NaOH, KOH,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  หรือ  $\text{K}_2\text{CO}_3$  ความเข้มข้น 1% หรือ MgO ความเข้มข้น 3% ร่วมกับ NaOH, KOH,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  หรือ  $\text{K}_2\text{CO}_3$  ความเข้มข้น 2% พบว่าโปรตีนเจลที่ได้จากขั้นตอนแรกเมื่อ ใช้ MgO 6% จะมีโครเมียม 55 ppm และปริมาณโครเมียมจะสูงขึ้นเมื่อใช้ NaOH หรือ KOH คือมี โครเมียมอยู่ในช่วง 67-126 ppm แต่การใช้  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  หรือ  $\text{K}_2\text{CO}_3$  ไม่ให้ผลแตกต่างจากการใช้ MgO เพียงอย่างเดียว และปริมาณโครเมียมในส่วนของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากขั้นตอนการ ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เมื่อใช้ MgO 6% มีค่า 5 ppm และเมื่อใช้ MgO 3% ร่วมกับ NaOH หรือ KOH 2% จะมีโครเมียมอยู่ 14 และ 10 ppm ตามลำดับ และการใช้ MgO เพียงอย่างเดียว ให้ผล ไม่แตกต่างจากการใช้ MgO ร่วมกับ  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  หรือ  $\text{K}_2\text{CO}_3$

Alves Dos Reis และคณะ (1997) ได้ทำการสกัดโครเมียมออกจากเศษหนังฟอกโดยใช้ แคลเซียมออกไซด์ที่อุณหภูมิ  $80^{\circ}\text{C}$  พบว่าเหลือโครเมียมในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตน้อย

กว่า 0.1 ppm ซึ่งในการทดลองนี้ใช้อัตราส่วนของหนังฟอกต่อน้ำกลั่นและแคลเซียมออกไซด์คือ 1:10:0.08 – 0.1 จะได้โปรตีนไฮโดรไลเสตซึ่งประกอบด้วย crude protein 80% และกรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acid) 25% เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเสตไประเหยนํ้าออกจนแห้งและนำไปเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงไก่ พบว่าไก่ที่ได้รับอาหารชนิดนี้จะมีการเจริญเป็นปกติ

Tingda และคณะ (1992) ทำการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนคอลลาลาเจนผง จากเศษหนังฟอกโครมที่มีส่วนประกอบของ crude protein 500 กรัมต่อกิโลกรัม และกรดอะมิโน 18 ชนิด ซึ่งในโปรตีนผงพบว่ามีโครเมียม (III) 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมและพบว่าไม่มีโครเมียม (VI) จากการทดลองได้ค่า total utilisation ratio of actual amino acid ( $T_{AAA}$ ) ของโปรตีนผงประมาณ 68.7 % เมื่อทดลองเลี้ยงในไก่ตัวผู้จำนวน 6 ตัว โดยใช้วิธี total metabolisable energy (TME) biological evaluation และค่าการย่อยได้ของ dry matter, crude protein, ash และ gross energy (GE) คือ 76.6%, 84.6%, 49.8% และ 77.0% ตามลำดับ เมื่อทำการทดลองในหนูตัวผู้ที่ถูกตอนแล้ว และเมื่อทดลองเลี้ยงไก่อายุ 49 วัน ด้วยอาหารที่ประกอบด้วยโปรตีนผง 20 กรัมต่อกิโลกรัม เปรียบเทียบกับอาหารควบคุม พบว่าได้ค่าน้ำหนักเพิ่มเมื่อสิ้นสุดการทดลองเท่ากับ 40.2 และ 39.8 กรัมตามลำดับ และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อมีค่าเท่ากันทั้งในอาหารที่มีโปรตีนผงและในอาหารควบคุม

Nogami และคณะ (2000) ได้ทำการทดลองใช้โปรตีนจากเศษหนังฟอกโครมที่มีโครเมียมเป็นส่วนประกอบในอาหารทดลองเลี้ยงปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เพื่อดูการสะสมและผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของปลา โดยวัดจากขนาด, น้ำหนัก, และการสะสมโครเมียมในร่างกาย เปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยมีระยะเวลาในการเลี้ยงตั้งแต่ 31 ม.ค. 2540 จนถึง 31 มี.ค. 2542 ทำการวัดผลการทดลองทุก 60 วันของการเลี้ยงปลา โดยดูขนาด น้ำหนัก และวัดการสะสมของโครเมียมในน้ำ อูจาระ กล้ามเนื้อ และลำไส้ ด้วยวิธี atomic absorption spectroscopy ในอาหารสูตรเริ่มต้นนั้นจะมีความเข้มข้นโครเมียมเท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากนั้นเพิ่มเป็น 6.4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อเวลาผ่านไป 6 เดือน และมีความเข้มข้นของโครเมียมสุดท้ายเท่ากับ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อเวลาผ่านไป 16 เดือน ซึ่งผลการทดลองนั้นสามารถสังเกตความแตกต่างของขนาดและน้ำหนักของปลาที่เลี้ยงในอาหารทดลองและชุดควบคุมได้อย่างเด่นชัดเมื่อเวลาผ่านไป 16 เดือน และไม่พบความเป็นพิษหรือการตายของปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง โดยโครเมียมจะมีการสะสมมากที่สุดในลำไส้ของปลา

## ปลาดุกลูกผสม

จากความสำเร็จของกรมประมงในการผสมข้ามสายพันธุ์ปลาดุก ทำให้ได้ปลาดุกลูกผสมชนิดใหม่เกิดขึ้นระหว่างแม่พันธุ์ปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) กับพ่อพันธุ์ปลาดุกเทศ

(*Clarias gariepinus*) ลูกผสมที่ได้เรียกกันทั่วไปว่าปลาดุกลูกผสม ปลาดุกบิ๊กอุย หรือปลาดุกอุยเทศ ปลาดุกกล่าวได้รับการยอมรับและเป็นที่ยอมรับของผู้เลี้ยงเป็นอย่างมากเพราะเลี้ยงง่าย โตเร็ว รสชาदन่านรับประทาน เกษตรกรจึงสนใจนำมาเลี้ยงทดแทนปลาดุกด้านและปลาดุกอุยมากขึ้น ด้วยคุณสมบัติพิเศษของปลาดุกลูกผสมที่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในน้ำที่มีออกซิเจนต่ำและเจริญเติบโตได้ดีในพื้นที่จำกัด ปลาดุกจึงได้ชื่อว่าเป็นปลาชนิดหนึ่งที่สามารถเลี้ยงได้ในความหนาแน่นสูงมาก ในพื้นที่ 1 ตารางเมตรสามารถปล่อยลูกปลาดุกขนาด 2-3 เซนติเมตร ได้สูงถึง 60-300 ตัว ขึ้นอยู่กับปริมาณและราคาของลูกปลารวมทั้งผลผลิตที่ตั้งไว้ใน การเลี้ยงปลาดุก โดยทั่วไปสามารถเลี้ยงได้ปีละ 2 ครั้งๆละ 3-5 เดือน เพื่อเลี้ยงปลาให้ได้ขนาดตัวละ 120-200 กรัม การตายซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจากโรคและคุณภาพของอาหารจะเป็นตัวกำหนดผลผลิตซึ่งแปรผันระหว่าง 3-12 กิโลกรัมต่อตารางเมตรในการเลี้ยงแต่ละครั้ง

เนื่องจากปริมาณและคุณภาพของอาหารที่ใช้เลี้ยงปลาดุกเป็นปัจจัยหนึ่งที่กำหนดผลผลิตที่ได้ ผู้เลี้ยงปลาดุกที่ใช้อาหารคุณภาพดีมีสารอาหารครบถ้วนจึงมักประสบความสำเร็จและได้ผลผลิตปลาดุกสูง อย่างไรก็ตามอาหารที่คุณภาพดี เช่น อาหารเม็ดลอยน้ำสำเร็จรูป มักมีราคาแพง ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง ดังนั้นราคาปลาดุกและราคาอาหารจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดกำไรหรือขาดทุน แต่เนื่องจากราคาปลาแปรผันขึ้นลงตามกลไกของตลาด การควบคุมราคาจึงทำได้ยาก ในขณะที่ราคาอาหารปรับขึ้นลงได้ตามวัตถุดิบที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ จึงมีความเป็นไปได้มากกว่าในการลดต้นทุนค่าอาหารลง โดยการปรับวัตถุดิบที่ใช้ในสูตรอาหารให้มีราคาลดลงแต่ไม่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของปลา

### ลักษณะชีววิทยาบางประการ

ปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*, Gunther) เป็นปลาน้ำจืดพื้นบ้านของไทยชนิดไม่มีเกล็ด รูปร่างเรียวยาว มีหนวด 4 คู่ ที่ริมฝีปาก ผิวหนังมีสีน้ำตาล เนื้อมีสีเหลือง รสชาดอร่อยนุ่มนวล ปลาดุกอุยเป็นปลาที่อาศัยอยู่ตามแม่น้ำ ลำคลอง หนองบึง ทั่วทุกภาคของประเทศไทย มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว สามารถอยู่ได้ในน้ำกร่อยเล็กน้อย แต่ปกติแล้วชอบอาศัยอยู่ในน้ำจืดสนิท และพื้นดินเป็นโคลนตม มีอวัยวะพิเศษช่วยในการหายใจเรียกว่า dendrite จึงสามารถอาศัยอยู่ได้อย่างหนาแน่นในน้ำที่มีออกซิเจนต่ำ ชอบหาอาหารตามหน้าดิน มีตาเล็กผิวด้านกับขนาดของตัว แต่มีหนวดที่รับรู้ความรู้สึกได้ดี ดังนั้นจึงใช้หนวดมากกว่าใช้ตาเพื่อหาอาหารตามพื้นดิน ตามปกติปลาดุกมีนิสัยขี้อาย ชอบกินอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ (วิทย์ ธารชลาณกิจและคณะ, 2525)

ปลาดุกเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมาเป็นเวลานาน มีผู้เลี้ยงกันมากเนื่องจากทำรายได้ดี ปัจจุบันมีการนำแม่พันธุ์ปลาดุกอุยมาใช้ในการผสมกับพ่อพันธุ์ปลาดุกเทศ (*Clarias gariepinus*, Burch 1822) กันมากเพื่อการผลิตปลาดุกลูกผสม หรือปลาดุกบิ๊กอุยหรือปลาดุกอุยเทศ ทำให้แม่พันธุ์ปลาขาดแคลน ราคาแม่ปลาจึงสูงขึ้น (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2533)

ปลาดุกเทศ (*Clarias gariepinus*, Burch 1822) นอกจากชื่อวิทยาศาสตร์ที่กล่าวแล้วยังอาจใช้ชื่อ *Clarias lazera*, *C. sengalensis* และ *C. mossambicus* (Teugels, 1984) จัดเป็นปลาในตระกูลแคทฟิช (catfish) มีชื่อสามัญว่า African Sharptooth Catfish มีถิ่นกำเนิดในแถบทวีปแอฟริกา เป็นปลาที่มีการเจริญเติบโตรวดเร็วมาก สามารถกินอาหารได้แทบทุกชนิด มีความต้านทานโรคและสภาพแวดล้อมสูง มีขนาดใหญ่เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ แต่ปลาดุกชนิดนี้มีเนื้อเหลวและมีสีซีดขาวไม่น่ารับประทาน (มานพ ตั้งตรงไพโรจน์และคณะ, 2533) ปัจจุบันพบแพร่กระจายไปหลายประเทศ เป็นปลาที่นิยมเลี้ยงอีกชนิดหนึ่ง โดยเฉพาะในประเทศเนเธอร์แลนด์ ผลิตในปี 1986 สูงถึง 1,000 เมตริกตัน (Boon และคณะ, 1987) ปลาดุกเทศถูกนำเข้ามาในประเทศไทยในราวปี พ.ศ. 2529-2530 โดยเกษตรกรนำมาจากประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว

ตารางที่ 3 ข้อแตกต่างระหว่างปลาดุกอุยและปลาดุกเทศ

| อวัยวะ        | ปลาดุกอุย                                                                       | ปลาดุกเทศ                                                                                  |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| หัว           | เล็กค่อนข้างรี ไม่แบน กระโหลก<br>สั้น มีรอยปุ่มตรงกลางเล็กน้อย<br>ท้ายทอยโค้งมน | ใหญ่และแบน กระโหลกเป็นตุ่มๆ<br>ไม่เรียบ มีรอยปุ่มตรงกลางเล็กน้อย<br>ท้ายทอยหยักแหลม 3 หยัก |
| ปาก           | ไม่ป้าน ค่อนข้างมน                                                              | ป้านและแบนหนา                                                                              |
| หนวด          | 4 คู่ โคนหนวดเล็ก                                                               | 4 คู่ โคนหนวดใหญ่                                                                          |
| ครีบท้อง      | ปลายครีบทีเทาปนดำ                                                               | ปลายครีบทีแดง                                                                              |
| ครีบอก        | มีเงี่ยงเล็กสั้น แหลมคมมาก<br>ก้านครีบทีแข็ง ยาวเกินหรือ<br>เท่ากับครีบท้อง     | มีเงี่ยงใหญ่สั้นนูน ไม่แหลมคม<br>และส่วนของครีบท้องยื่นถึงปลาย<br>ครีบทีแข็ง               |
| ครีบท้อง      | กลมไม่ใหญ่มากนัก สีเทาปนดำ                                                      | กลมใหญ่ สีเทา ปลายครีบทีมีสีแดง<br>และมีแถบสีขาวคาดบริเวณโคนครีบท้อง                       |
| ลำตัวด้านบน   | สีเหลืองอมเทา ขณะที่ยังเล็กจะ<br>มีจุดขาวเรียงขวางเป็นแถว                       | สีเข้มมีลายต่างคล้ายหินอ่อน<br>สีน้ำตาลเข้ม                                                |
| ลำตัวด้านล่าง | สีเหลือง                                                                        | สีขาว                                                                                      |

รายการอ้างอิง : มานพ ตั้งตรงไพโรจน์และคณะ , 2531 และ 2533

จากการศึกษาลักษณะรูปร่างและชีววิทยาของปลาดุกเทศ กลุ่มวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด ได้ทำการเพาะพันธุ์จนประสบผลสำเร็จเป็นอย่างมากเมื่อใช้แม่พันธุ์ปลาดุกอุยผสมกับพ่อพันธุ์ปลาดุกเทศ ลูกผสมที่ได้มีลักษณะใกล้เคียงกับปลาดุกอุย มีอัตราการเจริญเติบโตรวดเร็ว อีกทั้งทนทานต่อโรคและสภาพแวดล้อมได้ดี เลี้ยงง่าย เป็นที่นิยมบริโภคของประชาชน เนื่องจากมีรสชาติดี ราคาถูก

ปลาดุกลูกผสม (*C. macrocephalus* x *C. gariepinus*) มีลักษณะของปลาดุกอุยและปลาดุกเทศรวมกันอยู่ในตัว กล่าวคือเมื่อยังเล็ก มีลายจุดขาวเรียงขวางลำตัว ด้านบนเป็นแถวๆ แต่ละแถวห่างกันมากกว่าของปลาดุกอุย และจำนวนแถวน้อยกว่า เมื่อโตขึ้นลายจุดจะจางลง ลำตัวมีสีเทาอมเหลืองและมีลักษณะต่าง โคนครีบท้องมีแถบสีขาวจางๆ ท้ายทอยแหลม ส่วนท้องได้หัวถึงครีบท้องแนวกลางลำตัวเป็นสีขาว ด้านข้างเป็นสีเหลือง ครีบท้องมีก้านครีบใหญ่แข็งแรงหนึ่งอัน ยาวไม่เกินก้านครีบท้อง การเลี้ยงปลาดุกลูกผสมสามารถเลี้ยงได้ทั้งในบ่อดินและบ่อซีเมนต์ ซึ่งการเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ ควรปล่อยในอัตรา 50-70 ตัวต่อตารางเมตร ปลาจะเจริญเติบโตขนาดประมาณ 100-200 กรัมต่อตัว ในระยะเวลาเลี้ยงประมาณ 90 วัน โดยให้อาหารเม็ดใส่ไก่ หรือปลาเป็ดผสมเศษอาหาร (มานพ ตั้งตรงไพโรจน์และคณะ, 2533) ส่วน พรพนศรี จริโมภาสและสุจินต์ หนูขวัญ (2535) ได้ศึกษาผลผลิตปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงในบ่อคอนกรีตขนาด 50 ตารางเมตร ปล่อยลูกปลาขนาด 0.02 กรัม ในอัตรา 25, 50 และ 75 ตัวต่อตารางเมตร ให้อาหารเม็ดโปรตีนร้อยละ 30 ในเดือนแรก หลังจากนั้นให้อาหารเม็ดโปรตีนร้อยละ 25 ใช้เวลาเลี้ยงทั้งหมด 4 เดือน พบว่า การปล่อยในอัตรา 50 ตัวต่อตารางเมตร ให้ผลดีที่สุด กล่าวคือ ปลาเมื่ออัตราการเจริญเติบโตสูงสุด มีอัตราการแลกเนื้อต่ำสุด มีอัตราการรอดตายสูงสุด ตลอดจนมีกำไรสุทธิสูงสุดอีกด้วย

การเจริญเติบโตของปลาสามารถตรวจสอบได้ด้วยการวัดขนาดและน้ำหนักในช่วงเวลาใดเวลาหนึ่ง ซึ่งการเจริญเติบโตที่แท้จริงนั้นเป็นการเพิ่มขึ้นของเนื้อเยื่อโครงสร้าง เช่น กล้ามเนื้อ กระดูก รวมทั้งอวัยวะต่างๆ และเป็นการเพิ่มขึ้นของโปรตีน แร่ธาตุ และน้ำในร่างกาย การเจริญเติบโตตามปกติ ปลาจะต้องได้รับโปรตีน พลังงาน วิตามินและแร่ธาตุอย่างเพียงพอกับความต้องการภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม (Watanabe, 1988)

Lovell (1989) ได้แนะนำว่า อาหารปลาที่มีระดับโปรตีนต่ำสุดนั้นควรมีกรดอะมิโนที่จำเป็นในสัดส่วนที่สมดุล ระดับโปรตีนที่ปลาต้องการเพื่อการเจริญเติบโตตามปกติโดยทั่วไปอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 25-50 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น ชนิด ขนาดของปลา อุณหภูมิ น้ำ พลังงานที่ไม่ใช่โปรตีนในอาหาร คุณภาพโปรตีนและอาหารธรรมชาติที่สัตว์จะได้รับ ซึ่งในช่วงแรกปลาต้องการอาหารที่มีโปรตีนสูงกว่าช่วงท้ายของการเจริญเติบโต ความต้องการโปรตีนของปลาเพิ่มมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิของน้ำสูงขึ้นและจะน้อยลงเมื่ออุณหภูมิต่ำลง

เนื่องจากโปรตีนเป็นสารอาหารที่มีราคาแพงกว่าสารอาหารอื่น ในการประกอบสูตรอาหาร เราควรคำนึงถึงต้นทุนของค่าอาหารด้วย ดังนั้นอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำ ควรมีปริมาณโปรตีนน้อยที่สุดที่ทำให้สัตว์น้ำที่มีการเจริญเติบโตดีที่สุด ระดับโปรตีนที่ต้องการและเหมาะสมเพื่อการเจริญเติบโตของปลาดุกด้าน คือมีระดับโปรตีนร้อยละ 30 บัญญัติ ศิริธนาวงศ์ (2532) ได้ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของลูกปลาดุกที่อยู่ในเลี้ยงด้วยอาหารที่มีระดับโปรตีนร้อยละ 33.6 และมีอัตราส่วนโปรตีนต่อพลังงานเท่ากับ 84.4 มิลลิกรัมโปรตีนต่อกิโลแคลลอรี่ มีอัตราการเจริญเติบโตดีที่สุด

Reis และคณะ (1989) ได้รายงานการศึกษาอัตราส่วนโปรตีนต่อพลังงานในอาหารปลา แชนเนลแคทฟิช (channel catfish) โดยให้อาหารที่มีโปรตีนร้อยละ 26, 31, 35 และ 39 ตามลำดับ และมีระดับพลังงาน 91, 107, 120 และ 127 มิลลิกรัมโปรตีนต่อกิโลแคลลอรี่ ตามลำดับ เป็นเวลา 123 วัน ผลการทดลองพบว่า อัตราส่วนโปรตีนต่อพลังงานที่ระดับ 120 มิลลิกรัมโปรตีนต่อกิโลแคลลอรี่ ทำให้ปลาทดลองมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว อัตราการแลกเนื้อต่ำ และมีอัตราส่วนโปรตีนต่อไขมันที่เพิ่มขึ้นในเนื้อปลาสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ ส่วนกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนต่อพลังงานที่ระดับ 91 มิลลิกรัมโปรตีนต่อกิโลแคลลอรี่ พบว่ามีการสะสมของไขมันในตัวปลาสูงที่สุดคือร้อยละ 9.3 และต่ำที่สุดในกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีโปรตีนต่อพลังงาน 120 มิลลิกรัมโปรตีนต่อกิโลแคลลอรี่คือร้อยละ 7.5 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

แร่ธาตุหลักที่ปลามีความต้องการในปริมาณมากได้แก่ แคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม ส่วนแร่ธาตุอื่นซึ่งปลาต้องการในปริมาณเพียงเล็กน้อย เช่น ทองแดง ไอโอดีน เหล็ก แมงกานีส ซีลีเนียม และสังกะสี เป็นต้น ปลาแต่ละชนิดมีความต้องการแร่ธาตุในปริมาณแตกต่างกัน หากได้รับไม่เพียงพอกับความต้องการตามปกติ ปลาจะชะงักการเจริญเติบโต หรือแสดงอาการขาดธาตุอาหารให้เห็น Takeshi และคณะ (1988) ได้สรุปให้เห็นว่า ปลามีความต้องการฟอสฟอรัสและแมกนีเซียมในปริมาณค่อนข้างสูงกว่าแร่ธาตุอื่น ซึ่งในปลา common carp, rainbow trout และ channel catfish ต้องการแร่ธาตุฟอสฟอรัสในปริมาณร้อยละ 0.6-0.7, 0.7-0.8 และ 0.33-0.45 ตามลำดับ ส่วนแร่ธาตุแมกนีเซียมต้องการในปริมาณร้อยละ 0.04-0.05, 0.05-0.07 และ 0.04 ตามลำดับ สำหรับแร่ธาตุแคลเซียมนั้นแม้ว่าปลามีความต้องการในปริมาณมาก แต่เป็นการยากที่จะกำหนดได้ถูกต้องในอาหาร เนื่องจากปลาสามารถดูดซึมแคลเซียมจากส่วนที่ละลายอยู่ในน้ำผ่านเหงือกได้โดยตรง แต่ Halver (1989) รายงานว่า ปลาไหล ปลา rainbow trout และปลา catfish ต้องการธาตุในอาหารร้อยละ 0.34 หรือน้อยกว่า

ความสามารถในการใช้ประโยชน์ได้จากแร่ธาตุของปลาแตกต่างกันขึ้นกับ ชนิดของปลา แหล่งของวัตถุดิบ เช่นในปลาป่นที่ทำจากปลาไวท์ (white fish) พบว่าปลา rainbow trout ซึ่งมีกระเพาะ (stomach) ที่สามารถผลิตน้ำย่อยที่เป็นกรด (acidic gastric juice) สามารถใช้

ประโยชน์แร่ธาตุฟอสฟอรัสได้ร้อยละ 60-72 ซึ่งดีกว่าปลา common carp ซึ่งไม่มีกระเพาะ (stomachless) สามารถใช้ประโยชน์ได้ร้อยละ 10-26 นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ประโยชน์ได้ของ ธาตุสังกะสีในปลา rainbow trout จะต่ำลงเมื่อปริมาณไตรแคลเซียมฟอสเฟต (tricalcium phosphate) ในอาหารสูงขึ้น และผลของไตรแคลเซียมฟอสเฟตต่อความสามารถในการใช้ ประโยชน์ของธาตุสังกะสีสำหรับปลาที่ไม่มีกระเพาะ มีน้อยกว่าปลาที่มีกระเพาะ ส่วนแมกนีเซียม ที่ได้จากปลาป่นที่ทำจากปลาไวท์ (white fish) นั้น ปลานำมาใช้ประโยชน์ได้ต่ำมาก (Takeshi และคณะ, 1988) สำหรับในกากถั่วเหลือง ปลาแซนเนลฟิช (channel catfish) สามารถใช้ ประโยชน์แร่ธาตุฟอสฟอรัสได้ร้อยละ 29

### งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Jauhari (1989) ทำการเลี้ยงปลาดุกอุยผสม (*Clarias macrocephalus* x *Clarias gariepinus*) ด้วยอาหารที่มีโปรตีน 2 ระดับคือร้อยละ 28.6 และ 34.9 แต่ละระดับประกอบด้วย พลังงานที่ใช้ประโยชน์ได้ 303, 340 และ 363 กิโลแคลอรีต่ออาหาร 100 กรัม โดยใช้แป้งมัน สำปะหลังเป็นแหล่งพลังงาน ผลการทดลองพบว่า การเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหาร เพิ่มขึ้นตามระดับพลังงานที่เพิ่มจนถึงระดับพลังงานที่ 340 กิโลแคลอรีต่ออาหาร และถัดจากนั้น จะลดลงทุกระดับโปรตีน ที่ระดับโปรตีนร้อยละ 28.6 และระดับพลังงาน 340 กิโลแคลอรีต่อ 100 กรัม การเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารดีกว่ากลุ่มอื่นๆ การสะสมไขมันในซากจะเพิ่ม ขึ้นเมื่อระดับโปรตีนและไขมันในอาหารเพิ่มขึ้น

วิมล จันทรโรทัย (2538) ได้ศึกษาพบว่า ค่าประเมิณของโปรตีนที่ทำให้ปลาเจริญเติบโตสูง สุดเท่ากับ 41% ในขณะที่ระดับโปรตีนที่ให้ผลตอบแทนทางเศรษฐศาสตร์สูงสุดอยู่ในช่วงระหว่าง 33-36% และโปรตีนที่ 33.2% เป็นจุดที่มีความเหมาะสมทางเศรษฐศาสตร์มากที่สุด เมื่อคำนวณ จากราคาอาหารปลาและราคาปลาในปัจจุบัน

วิมล จันทรโรทัย และคณะ (2538) ได้ศึกษาระดับโปรตีนที่ทำให้ปลาดุกอุยผสมเจริญเติบโต และใช้ประโยชน์จากอาหารสูงสุด โดยการใช้อาหารที่มีปลาป่นและกากถั่วเหลืองเป็นส่วนผสม หลัก และมีระดับโปรตีนระหว่าง 25-45% มีพลังงานที่ย่อยได้เท่ากัน คือ 280 กิโลแคลอรี/100 กรัม เลี้ยงปลาดุกอุยผสมขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 2.5 กรัม ในตู้กระจกขนาดความจุ 80 ลิตร จำนวน 18 ตู้ โดยให้อาหารอย่างเต็มที่วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 10 สัปดาห์ ผลปรากฏว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีโปรตีน 40% มีการเจริญเติบโตและอัตราการแลกเปลี่ยนเนื้อดีที่สุด ปลาที่ได้รับอาหารที่มีโปรตีน 35 และ 40% มีค่าประสิทธิภาพของโปรตีนในอาหารและค่าโปรตีนที่เพิ่มขึ้นในตัวปลาสูงกว่า ( $P < 0.05$ ) ปลาในกลุ่มอื่นๆ และปลาที่ได้รับอาหารที่มีโปรตีน 25% มีในตัวสูง แต่ปลาในกลุ่มอื่นๆ มีในตัวไม่แตกต่างกัน

วิมล จันทรโรทัย และคณะ (2539) ได้นำอาหารทดลอง 4 สูตร ที่มีโปรตีน (35%) และพลังงานที่ย่อยได้ (310 kcal/100 g) คงที่ และใช้โปรตีนข้าวโพด (corn gluten meal) ทดแทนปลาป่นในสูตรด้วยปริมาณ 0%, 3.33%, 6.66% และ 10.00% (สูตรที่ 1-4 ตามลำดับ) ไปเลี้ยงปลาตุลุกผสมเพื่อศึกษาผลของอาหารต่อการเจริญเติบโตและการปรับสีผิวและเนื้อของปลา โดยการให้อาหารอย่างเต็มที่วันละ 2 ครั้ง แก่ปลาขนาดน้ำหนักเฉลี่ยตัวละ 1.56 กรัม ซึ่งเลี้ยงไว้ในตู้กระจกขนาด 120 ลิตร จำนวน 12 ตู้ๆ ละ 15 ตัวเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ผลปรากฏว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 2, 3 และ 4 เจริญเติบโตดีกว่า ( $P < 0.05$ ) ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 1 อย่างไรก็ตามอัตราการกินอาหาร อัตราการแลกเนื้อ ประสิทธิภาพของโปรตีน โปรตีนเพิ่มในตัวปลา อัตรารอด และองค์ประกอบของปลา ในแต่ละกลุ่มทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $P > 0.05$ )

ปลาทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 3 และ 4 มีผิวและเนื้อสีเหลืองคล้ายกับสีของปลาตุลุกอุยและอาหารที่มีโปรตีนข้าวโพดไม่มีผลทำให้สีของอวัยวะภายในของปลาผิดปกติแต่อย่างใด

การศึกษานี้สรุปได้ว่า การใช้โปรตีนข้าวโพดทดแทนปลาป่นในอาหารปลาตุลุกผสมในปริมาณ 3.33-10.00% ช่วยเร่งการเจริญเติบโตของปลา แต่ปริมาณเหมาะสมที่ทำให้ปลามีผิวและเนื้อสีเหลืองคล้ายปลาตุลุกอุยเท่ากับ 6.66-10.00%

นอกจากนี้วิมล จันทรโรทัย และคณะ (2539) ยังได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอาหารปลาตุลุกผสมที่ผลิตโดยอ้างอิงข้อมูลความต้องการโภชนาการของปลากับอาหารปลาตุลุกสำเร็จรูป (ลอยน้ำ) จากโรงงานได้ดำเนินการเป็น 2 การทดลอง การทดลองที่ 1 เป็นการคัดเลือกตัวแทนอาหารสำเร็จรูปจากโรงงานจำนวน 4 ชนิด ซึ่งมีโปรตีนไม่ต่ำกว่า 30% (COM 1- COM4) โดยนำไปเลี้ยงปลาตุลุกผสมขนาด น.น.เฉลี่ย 15.7 กรัม ในถังศึกษาการย่อยจำนวน 12 ถังๆ ละ 10 ตัว โดยการให้อาหารลอยน้ำแต่ละชนิดแก่ปลาจำนวน 3 ถัง อย่างเต็มที่วันละ 1 ครั้ง ในตอนเช้า เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทุกเช้าของวันถัดไปทำการรวบรวมมูลปลาก่อนการให้อาหาร เพื่อนำไปศึกษาสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของโปรตีน ผลปรากฏว่า สัมประสิทธิ์การย่อยได้ของโปรตีนของอาหารทั้ง 4 ชนิดมีค่าใกล้เคียงกันเท่ากับ 95% และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) อย่างไรก็ตาม อาหาร COM 2 ทำให้ปลาที่มีน้ำหนักเพิ่มและอัตราแลกเนื้อดีที่สุด จึงนำไปใช้เปรียบเทียบกับอาหารที่ผลิตเองจำนวน 10 ชนิด ในการทดลองครั้งที่ 2 อาหารที่ผลิตประกอบด้วยวัตถุดิบอาหารที่หาง่าย อาหารสูตรที่ 1-4, 5-8, 9 และ 10 ใช้ปลาป่นเดนมาร์ก ปลาป่นไทย หัวไก่สด และปลาเบ็ด เป็นแหล่งโปรตีนจากสัตว์ตามลำดับ อาหารสูตรที่ 1, 2, 5 และ 6 ถูกกำหนดให้มีโปรตีน 35% สูตรที่ 3, 4, 7, 8, 9 และ 10 ถูกกำหนดให้มีโปรตีน 32% พลังงานที่ย่อยได้ในอาหารมี 2 ระดับ คือ 330 กิโลแคลอรี/100 กรัม (สูตรที่ 1, 2, 5, 6 และ 9) และ 290 กิโลแคลอรี/100 กรัม (สูตรที่ 3, 4, 7, 8 และ 10) นำอาหารแต่ละชนิดไปเลี้ยงปลาตุลุกผสมขนาด 5-6 กรัม ที่เลี้ยงไว้ในตู้กระจก จำนวน 33 ตู้ๆ ละ 15 ตัว โดยให้อาหารอย่างเต็มที่ วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 8 สัปดาห์

จากการทดลองสรุปได้ว่า อาหารทั้ง 10 สูตรที่ผลิตขึ้นเองทำให้ปลาเจริญเติบโตดีกว่าอาหารสำเร็จรูปจากโรงงาน (COM 2) ปลาอุกถูกผสมใช้ประโยชน์จากอาหารที่ผลิตขึ้นเองได้ดีกว่าหรือเทียบเท่าอาหารจากโรงงาน หากเปรียบเทียบระหว่างอาหารที่ผลิตเองทั้ง 10 สูตร พบว่า อาหารที่ใช้หัวไก่เป็นแหล่งโปรตีน (สูตรที่ 9) มีพลังงานสูงเกินไปทำให้ปลากินอาหารได้น้อยและเจริญเติบโตช้า ปลาอุกถูกผสมใช้ประโยชน์จากอาหารที่มีปลาป่นไทยเป็นแหล่งโปรตีน (สูตรที่ 5-8) ได้น้อยกว่าอาหารที่มีปลาป่นนอกหรือปลาเบ็ดเป็นส่วนผสม (สูตรที่ 1, 2, 3 และ 10) อาหารที่ใช้โปรตีนคุณภาพดีที่ระดับ 35% (สูตรที่ 1 และ 2) ทำให้ปลาเจริญเติบโตได้ดีกว่าอาหารที่มีโปรตีน 32% (สูตรที่ 3 และ 4) ที่ระดับพลังงานเดียวกัน ส่วนที่ระดับโปรตีนเดียวกัน การเพิ่มพลังงานจาก 290 เป็น 330 กิโลแคลอรี/100 กรัม ไม่มีผลช่วยให้ปลาเจริญเติบโตมากขึ้น อย่างไรก็ตามอาหารที่มีโปรตีน 32% และพลังงาน 330 กิโลแคลอรี/100 กรัม (สูตรที่ 3) ทำให้ปลาเจริญเติบโตและใช้ประโยชน์จากอาหารได้ดีเท่ากับอาหารที่มีโปรตีน 35% และพลังงาน 290 กิโลแคลอรี/100 กรัม (สูตรที่ 2) ดังนั้นหากคำนึงถึงผลของอาหารต่อการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์อาหารของปลา อาหารสูตรที่ 1, 2, 3 และ 10 มีความเหมาะสมสำหรับปลาอุกถูกผสม เมื่อพิจารณาคุณภาพของตัวปลาร่วมด้วยอีกปัจจัยหนึ่ง อาหารสูตรที่ 2 และ 10 มีความเหมาะสมมากกว่า เพราะอาหารสูตรที่ 1 และ 3 ทำให้ไขมันในตัวปลาสูง แต่สำหรับผู้เลี้ยงปลาแล้วต้นทุนการผลิตเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดต่อการกำไรหรือขาดทุน และอาหารที่มีต้นทุนการผลิตต่ำ ได้แก่ อาหารสูตรที่ 1, 3 และ 10

เจลิยว บุญมัน (2536) ได้ศึกษาการเติมมูลไก่ไข่แห้งลงในอาหารหลักที่ประกอบด้วยเคซีน เจลลาติน ปลาป่น กากถั่วเหลือง ปลาเยี้ยวในอัตราร้อยละ 0, 12, 24 และ 36 สำหรับเลี้ยงปลาอุกถูกผสมขนาดน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 2.33 กรัม ในถังไฟเบอร์ที่จัดให้มีระบบน้ำไหลผ่านในอัตรา 1 ลิตรต่อนาที ให้อาหารที่มีระดับโปรตีนและพลังงานเท่ากันเป็นเวลา 10 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่าปลาในกลุ่มควบคุมมีการเจริญเติบโตดีที่สุด รองลงมาได้แก่ปลาที่ได้รับอาหารที่มีมูลไก่ไข่แห้งเพิ่มขึ้น โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้น 19.15, 18.75, 15.23 และ 11.93 กรัม ตามลำดับ ปลาที่ได้รับอาหารที่มีมูลไก่ไข่แห้งในอัตราร้อยละ 0, 12 และ 24 มีน้ำหนักเพิ่มเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ( $P>0.05$ ) ซึ่งให้ผลในลักษณะเดียวกับอิทธิพลของอาหารที่มีต่ออัตราแลกเนื้อและประสิทธิภาพโปรตีนในอาหาร ส่วนอัตรารอด ปริมาณแก้ว ปริมาณโปรตีน และโปรตีนที่เพิ่มขึ้นในตัวปลา พบว่าทุกกลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างกัน ( $P>0.05$ ) สำหรับปริมาณไขมันที่สะสมในตัวปลาและพลังงานที่เพิ่มขึ้นในตัวปลา ปรากฏว่ามีปริมาณลดลงตามปริมาณมูลไก่ไข่แห้งที่เติมลงไป ในอาหารหลักและมีความแตกต่างกัน ( $P<0.05$ ) ผลการศึกษครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าสามารถนำมูลไก่ไข่แห้งมาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงปลาอุกถูกผสมได้ในอัตราไม่เกินร้อยละ 24 เพื่อ

ทดแทนสัดส่วนโปรตีนและพลังงานในปลายข้าวและกากถั่วเหลือง โดยไม่มีผลทำให้ปลา มีอัตราการเจริญเติบโต อัตราแลกเนื้อและอัตราการรอดแตกต่างกัน

ไพรัตน์ กอสุธารักษ์ (2542) ได้นำปลาดุกลูกผสม (*Clarias macrocephalus* x *Clarias gariepinus*) น้ำหนักเฉลี่ย 2.60 กรัม มาเลี้ยงในตู้กระจกขนาดความจุ 120 ลิตร จำนวน 15 ตู้ๆ ละ 20 ตัว โดยสุ่มออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 3 ตู้ เพื่อทดลองกับอาหารจำนวน 5 สูตร คือ 1) อาหารสูตรควบคุม (อาหารผสมปลาสด 20%) 2) อาหารผสมหัวไก่สด 25% 3) อาหารผสมหัวไก่หมัก 25% 4) อาหารผสมหัวไก่สด 25% + น้ำมันปลา 1.3% และ 5) อาหารผสมหัวไก่หมัก 25% + น้ำมันปลา 1.3% โดยให้อาหารอย่างเต็มทีวันละ 2 ครั้ง เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ผลการทดลอง พบว่า ปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร 3 (หัวไก่หมัก 25%) มีน้ำหนักตัวเฉลี่ย เปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัวปลาที่เพิ่มขึ้น การเจริญเติบโตเฉพาะ มีค่าเท่ากับ 19.03% , 597% และ 4.08% ต่อวัน ตามลำดับ ซึ่งค่าดัชนีดังกล่าวมีค่าสูงกว่า ( $p < 0.05$ ) ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรอื่นๆ ทั้งหมด ส่วนปลาที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารควบคุม มีค่าดัชนีต่ำที่สุด คือ 11.82 %., 327% และ 3.09% ต่อวัน ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับค่าทั้งสามของปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร 2, 4 และ 5 พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) อัตราการกินอาหาร อัตราแลกเนื้อ และอัตราการรอดของปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทุกสูตร พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 4.51 – 5.32% ต่อวัน, 1.50-2.04 และ 97-100% ตามลำดับ

### บทที่ 3

#### ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์

##### 3.1 ครุภัณฑ์

| ครุภัณฑ์                                                                   | รุ่นที่ผลิต                           | บริษัท/ประเทศที่ผลิต                                 |
|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 1.เครื่องวัดและบันทึกการดูดกลืนแสง (UV Spectrophotometer)                  | DU 650                                | Beckman, USA                                         |
| 2.เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Visible Spectrophotometer)                      | Jenwey6400                            | Labquip Co.,Inc.,England                             |
| 2. เครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Refrigerate centrifuge)     | J-21C                                 | Beckman, USA                                         |
| 3.เครื่องอบนิ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)                                        | HA-30                                 | Hirayama Manufacturing Corporation ,Japan.           |
| 3.ถังหมัก (Fermenter) ขนาด 5 ลิตร                                          | BIO FLO II C                          | New Brunswick Scientific Co.,Inc.,Edison ,N.J. ,USA. |
| 4. เครื่องเขย่าให้อากาศควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำ ( Gyrotary water bath shaker) | G 76D                                 | New Brunswick, Scientific, USA                       |
| 5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter)                                   | PHM 83<br>Autocal                     | Radiometer, Denmark                                  |
| 6. เครื่องชั่งสารอย่างละเอียด                                              | AE-200S                               | Mettler Instrument AG, Switzerland                   |
| 7. เครื่องตัดเฉือนความเร็วสูง (Blender)                                    | X13                                   | Moulinex, France                                     |
| 8.เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน                                           |                                       | Buchi, Switzerland                                   |
| 9. เครื่องระเหิดน้ำอุณหภูมิต่ำ (Lyophilizer)                               | Fleix-Dry                             | Systems stone ridge, USA                             |
| 10. เครื่องระเหยแห้ง (Spraydry)                                            |                                       | Buchi, Switzerland                                   |
| 11. เครื่องสกัดซอกซ์เลต (Soxhlet Extraction)                               |                                       | LABCONCO, USA                                        |
| 12. เตาเผา (Muffle Furnance)                                               | Thermolyne<br>Furnator II<br>CP-13310 | Sybron Corporation, USA                              |
| 13.Thimble ขนาด 22mm x 80 mm                                               |                                       | Whatman, England                                     |

| ครุภัณฑ์                          | รุ่นที่ผลิต | บริษัท/ประเทศที่ผลิต                  |
|-----------------------------------|-------------|---------------------------------------|
| 14.แผ่นกรอง Filter paper No.1     |             | Whatman, England                      |
| 15.ถุงไดอะไลซิส Dialysis tubing   |             | Sigma, USA                            |
| 16.ถังไฟเบอร์ ขนาดความจุ 200 ลิตร |             | บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด(มหาชน) |
| 17.เครื่องบดอาหาร                 |             | บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด(มหาชน) |
| 18.เครื่องผสมอาหาร                |             | บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด(มหาชน) |
| 19.เครื่องอัดเม็ดอาหาร            |             | บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด(มหาชน) |

### 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        |                             |
| Magnesium standard solution      |                             |
| Sulfuric acid                    |                             |
| Lanthanum oxide                  |                             |
| Sodium thiosulphate pentahydrate |                             |
| Petroleum ether                  | Mallinckrodt, USA           |
| Phosphoric acid                  |                             |
| Sodium hydrogen carbonate        | BDH Chemicals Ltd., England |
| Magnesium sulphate               |                             |
| Coomassie Blue G-250             |                             |
| Nitric acid                      |                             |
| Hydrochloric acid                |                             |

| สารเคมี                    | บริษัท / ประเทศ              |
|----------------------------|------------------------------|
| Yeast Extract              | Scharlau Chemie ,Spain.      |
| Ammonium sulphate          |                              |
| Magnesium oxide            | Riedel-de Haen, Germany      |
| Bovine Serum Albumin (BSA) | Sigma Chemical Co, Ltd., USA |
| Glucose                    |                              |
| Antifoam                   | Fluka AG. Buch, Switzerland  |
| Trichloroacetic acid (TCA) |                              |
| Sodium hydroxide           | Eka Nobel, Sweden            |
| Phenolphthalene            | May & Baker Ltd., England    |
| Potassium iodide           | AJAX Chemicals, Australia    |

### 3.3 วัสดุที่ใช้ในการทดลอง

เศษหนังวัวที่ผ่านการฟอกโครม จากขั้นตอนการชุบบาง (Chrome shaving) ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานฟอกหนังอุดมพรพรณ กม. 30 จังหวัดสมุทรปราการ

### 3.4 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

*Bacillus subtilis* TISTR25 ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย TISTR (Thailand Institute of Scientific and Technology Research) Culture Collection เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย

### 3.5 ปลาที่ใช้ในการทดลอง

ปลาดุกกลมผสม (*Clarias macrocephalus* X *Clarias gariepinus*) ขนาดน้ำหนักเฉลี่ยอยู่ที่ 15.4 กรัม จำนวน 480 ตัว

## บทที่ 4

### วิธีการทดลอง

#### 4.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (Starter inoculum)(เกษม พงษ์มณี, 2536)

เชื้อเชื้อที่เก็บไว้ใน 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 นำไปบ่มด้วยเครื่องเขี่ยที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ประมาณ 12-16 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างวัดความขุ่นของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ให้ได้ประมาณ 0.6

#### 4.2 การผลิตแอลคาไลน์โปรตีนจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 ระดับถังหมัก 5 ลิตร (วรรณวิมล, 2540)

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 4.1 ปริมาณ 35 มิลลิลิตร ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตแอลคาไลน์โปรตีน (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 3,500 มิลลิลิตร ควบคุมสภาวะในการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราในการกวน 250 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 7.0 ด้วย 2N NaOH ควบคุมการเกิดฟองด้วย Antifoam A ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตรา 1:3 ใช้เวลาในการหมัก 84 ชั่วโมง กรองเอากากตัวเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันออกแล้ว แบ่งน้ำหมักจำนวน 20 มิลลิลิตร ไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกนำส่วนที่เป็นน้ำใสไปวัดแอลคาไลน์โปรตีนแอสคิตวิธี

#### 4.3 การเตรียมแอลคาไลน์โปรตีนในรูปผงโดยวิธีการระเหิดแห้ง (Lyophilization) (ดัดแปลงจาก วิธีของ จันทิมา, 2539)

นำน้ำหมักจากข้อ 4.2 ไปเหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ ด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เอาส่วนน้ำใสมาแช่ในอ่างน้ำแข็ง ตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยค่อยๆ เติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดทีละน้อย ให้ความเข้มข้นสุดท้าย 70% (472 กรัมต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร) คนเบาๆ ตลอดเวลาจนแอมโมเนียมซัลเฟตละลายหมดแล้ว จึงนำไปทิ้งไว้ในตู้เย็น 1 คืน เหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วแยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอนมาละลายในคาร์บอนเนต-ไบคาร์บอนเนต pH 10.5 แล้วกำจัดเกลือส่วนเกินออกโดยการทำ dialysis ในสารละลายคาร์บอนเนต-ไบคาร์บอนเนต

บัฟเฟอร์ จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่ได้ มาทำให้แห้งด้วยวิธีการระเหิดแห้ง (Lyophilization) เก็บรักษาผงแอลคาไลน์โปรตีนที่ได้ ในภาชนะปิดสนิทเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### 4.4 การวัดแอกติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีนเอส

นำส่วนน้ำใส (Crude enzyme) หรือสารละลายแอลคาไลน์โปรตีนเอสมาหาแอกติวิตี โดย บ่มตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร กับสารละลาย 0.2% Azocasein 1 มิลลิลิตร และคาร์บอนเนต-ไบคาร์บอนเนตบัฟเฟอร์ pH 10.5 จำนวน 0.9 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างที่ควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำขึ้นจากอ่างน้ำอุ่นไปแช่ในอ่างน้ำเย็นทันที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 10% จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเหวี่ยง ตกตะกอนที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาแอกติวิตีของเอนไซม์ กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร เปลี่ยนแปลงไป 0.1 หน่วยต่อนาทีในสภาวะที่กำหนดโดยมี Azocasein เป็นสารตั้งต้น

#### 4.5 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด

ทำตามวิธี microprotein assay ของ Bradford (1976)

สารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Bradford (Bradford working solution) 1 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบกับกราฟสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีปริมาณ 0-100 ไมโครกรัม

#### 4.6 การเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเศษหนัง

บดเศษหนังที่ได้จากขั้นตอนการชุบยาง (chrome shavings) ด้วยเครื่องตัดเฉือนความเร็วสูง (blender) แล้ววิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น เถ้า ไนโตรเจน ไขมัน โครเมียม

##### 4.6.1 การหาค่าความเป็นกรด-ด่าง ของตัวอย่างเศษหนัง (ASTM D 2810-72)

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

##### 4.6.2 การหาปริมาณความชื้น (ASTM D 3790-79)

ชั่งตัวอย่าง 2-5 กรัมให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ในถ้วยกระเบื้องที่อบแห้ง และชั่งน้ำหนักแล้ว นำไปอบไล่ความชื้น ในตู้อบที่อุณหภูมิ  $100 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา  $16 \pm 1/2$  ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น นำไปชั่งหาน้ำหนัก คำนวณหาปริมาณความชื้น จากสมการ

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

#### 4.6.3 การหาปริมาณเถ้าทั้งหมด (ASTM D 2617-69)

ชั่งตัวอย่าง 1-5 กรัม ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ในถ้วยกระเบื้องทนความร้อนสูง ที่อบและชั่งน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว นำไปเผาในเตาเผา  $600 \pm 25$  องศาเซลเซียส โดยเริ่มเผาตัวอย่างตั้งแต่ตัวอย่างยังไม่ร้อน เมื่ออุณหภูมิสูงถึง 600 องศาเซลเซียส แล้วให้เผาต่อไปอีก 30-45 นาที หรือจนน้ำหนักคงที่ เอาออกจากเตาเผา ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักหาปริมาณเถ้าทั้งหมด

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

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

#### 4.6.4 การหาปริมาณโครมิกออกไซด์โดยวิธีเปอร์คลอริกแอซิดออกซิเดชัน (ASTM D 2807-93)

ชั่งตัวอย่าง 1-5 กรัม ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไปเผาหาปริมาณเถ้าตามวิธี 3.6.3 (ASTM D 2617-69) หลังจากนั้น ถ้ายเถ้าที่ได้ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร หรือในหลอดย่อย ถ้าย่อยด้วยเครื่องย่อย เติมกรดไนตริก กรดเปอร์คลอริกและกรดซัลฟิวริก ปริมาตร 20, 15 และ 10 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 4:3:2) ตามลำดับ ใส่ลูกแก้ว 4-5 ลูก ต้มตัวอย่างบนเตาไฟฟ้าในตู้ดูดควัน ภายใต้ภาวะรีฟลักซ์ จนกระทั่งสารอินทรีย์ถูกย่อยสลาย และโครเมียมถูกออกซิไดซ์ จนได้สารละลายใสสีส้ม ต้มต่อไปอีก 2 นาที ยกออกจากเตา และทำให้เย็นลง ล้างด้านข้างของขวดย่อย และเจือจางให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ต้มต่อไปอีก 7 นาที แล้วทำให้เย็นลง หลังจากนั้นเติมสารละลาย 40% กรดฟอสฟอริก 30 มิลลิลิตร และสารละลาย 10% โพแทสเซียมไฮโอไดต์ 20 มิลลิลิตร ปิดขวดรูปชมพู่ด้วยจุกยาง นำไปตั้งทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 5 นาที แล้วไตเตรทจนสารละลายมีสีเหลืองปนเขียว แล้วจึงเติมสารละลายน้ำแป้ง ความเข้มข้น 2% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ไตเตรทต่อไปจนสารละลายเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเข้มเป็นสีเขียวใส บันทึกปริมาตรสารละลาย

มาตรฐาน 0.1 นอร์มอล โซเดียมไฮโอซัลเฟตที่ใช้ คำนวณปริมาณโครมิกออกไซด์เป็นเปอร์เซ็นต์จากสูตร

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

เมื่อ

A = ปริมาตรสารละลายมาตรฐาน 0.1 นอร์มอล โซเดียมไฮโอซัลเฟตที่ใช้ (มิลลิลิตร)

B = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮโอซัลเฟตที่ใช้ (นอร์มอล)

C = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ (กรัม)

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

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

เมื่อ D = ความชื้นของตัวอย่าง (เปอร์เซ็นต์)

#### 4.6.5 การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธี Kjeldahl

ชั่งน้ำหนักแน่นอนของตัวอย่างมา 0.1-2 กรัมลงในหลอดใส่สารตัวอย่าง (ขึ้นอยู่กับปริมาณไนโตรเจนในสารตัวอย่าง) เติมตัวเร่งปฏิกิริยาผสมปริมาณ 3 กรัม และเติมกรดซัลฟูริกปริมาณ 20 มิลลิลิตร นำไปย่อยด้วยเครื่องย่อยไนโตรเจน ต้มเคี่ยวจนมีกลุ่มควันสีขาวเกิดขึ้นได้ สารละลายใส ประมาณ 20-30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร โดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 35% ประมาณ 30-50 มิลลิลิตร นำตัวอย่างของเหลวในขวดเจลาตัทไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่นไอน้ำ โดยจุ่มปลายท่อลงในกรดบอริก 2% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่เติมอินดิเคเตอร์ผสม (ดังภาคผนวก) เก็บสารละลายส่วนที่กลั่นออกมา ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มัล เมื่อถึงจุดยุติ สารละลายจะเปลี่ยนจากสารละลายสีเขียวย่อนเป็นสารละลายสีม่วงอ่อน (Pale lavender) จดปริมาตรของกรดซัลฟูริกมาตรฐานที่ใช้ทำแบลงค์โดยใส่สารรีเอเจนต์ยกเว้นสารตัวอย่างแล้วนำไปกลั่น

การคำนวณ

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

เมื่อ N = ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายกรดซัลฟูริก (นอร์มัล)

A = มิลลิลิตรของกรดซัลฟูริกมาตรฐานที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง

B = มิลลิลิตรของกรดซัลฟูริกมาตรฐานที่ใช้ในการไตเตรทกับแบลงค์

W = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ (กรัม)

#### 4.6.6 การหาปริมาณไขมัน โดยวิธีสกัดซอกซ์เลต (Soxhlet Extraction)

อบขวดสกัดไขมันที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน (A) ชั่งตัวอย่าง 0.2-1.0 กรัม ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ถึงเทคนิค 4 ตำแหน่ง ใส่ใน thimble เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ในขวดสกัด ประมาณ 200 มิลลิลิตร และนำ thimble ที่ใส่ตัวอย่างไปประกอบกับเครื่อง Soxhlet Extraction เปิดสวิตช์ของจานให้ความร้อน (hot plate) ตั้งอุณหภูมิที่ไว้ ที่ 150 องศาเซลเซียส โดยขณะให้ความร้อนจะต้องเปิดน้ำเข้า condenser ให้น้ำหล่อเย็นตลอดเวลา สกัดไขมันต่อเนื่องเป็นเวลา 3-6 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำขวดสกัดไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำขวดสกัดไปทิ้งให้เย็น ในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก (B) คำนวณปริมาณไขมันจากสมการ

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

#### 4.6.7 การหาปริมาณโครเมียม, แคลเซียม และแมกนีเซียม โดยวิธี Atomic Absorption Spectrophotometry

ชั่งตัวอย่าง 0.1-0.2 กรัม ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไปเผาเพื่อให้ได้เถ้าตามวิธี ASTM D 2617-69 นำเถ้าที่ได้ถ่ายใส่หลอดย่อยสำหรับเครื่องย่อย เติมกรดไนตริก 5 มิลลิลิตร กรดเปอร์คลอริก 4 มิลลิลิตร และกรดซัลฟริก 3 มิลลิลิตร ใส่ลูกแก้ว 4-5 ลูก นำไปย่อยบนเตาหลุมที่อุณหภูมิ 250 – 300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง จนได้ควันสีขาวของกรดเปอร์คลอริก จางหายไปเกือบหมด หลังจากนั้นทิ้งให้เย็นลง แล้วเติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ปริมาตรธาตุ ด้วยเครื่องอะตอมมิคแอบซอร์บชันสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 357.9, 422.7 และ 285.2 นาโนเมตร สำหรับวิเคราะห์โครเมียม แคลเซียม และแมกนีเซียม ตามลำดับ เทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก จ)

ทุกตัวอย่างที่จะวัดปริมาณ Ca และ Mg ให้เติมสารละลาย  $\text{La}_2\text{O}_3$  ให้มี La 10,000 ppm

#### 4.7 ชนิดและปริมาณของเกลือแอลคาไลน์-เอิร์ท ที่เหมาะสมในการปรับความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในช่วงการทำงานของแอลคาไลน์โปรดิวส ที่ระดับ 8.5 และ 10.5

นำเศษหนึ่ง 2.5 กรัม มาแช่ในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมเกลือแอลคาไลน์-เอิร์ท โดยการแปรผันชนิด และปริมาณเกลือแอลคาไลน์-เอิร์ท 3 ชนิด ได้แก่ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) แมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Mg(OH)}_2$ ) และแมกนีเซียมออกไซด์ ( $\text{MgO}$ ) ในปริมาณ 0-12 % โดยน้ำหนักของเศษหนึ่งนำของผสมไปเขย่าและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 71 องศา-

เซลเซียส ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำ ที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที แล้วยกออกจากเครื่องเขย่า ทิ้งให้เย็นลง นำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของของผสม

#### 4.8 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนออกจากเศษหนังโดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

4.8.1 ศึกษาปริมาณการใช้เอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอส เพื่อหาปริมาณเอนไซม์ที่เพียงพอสำหรับการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อ *B. subtilis* TISTR25 ที่อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมต่อสภาวะการทำงานของเอนไซม์ (Optimum activity) (นภา ศิวรังสรรค์, 2542)

นำเศษหนัง 2.5 กรัม มาแช่ในน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 6.5 % (w/v) โดยน้ำหนักของเศษหนัง นำไปเขย่าและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 71°C ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker) ด้วยน้ำ ที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที ยกออกจากเครื่องเขย่าทิ้งให้เย็นลง แล้วเติมเอนไซม์ โดยการแปรผันปริมาณเอนไซม์ ในช่วง 0-8% โดยน้ำหนักของเศษหนัง นำไปเขย่าโดยควบคุมอุณหภูมิ ที่ 45°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ยกออกจากเครื่องเขย่า ตั้งทิ้งไว้ในห้องเย็น 1 คืน แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำไปอบไล่ความชื้น ชั่งน้ำหนักตะกอนโครเมียมและเศษหนังที่เหลืออยู่ (Chrome cake)

4.8.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ โดยแปรผันอุณหภูมิเป็น 3 ระดับคือ 30, 37 และ 45°C

ชั่งเศษหนัง 2.5 กรัม แช่ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมเกลือแอลคาไลน์-เอิร์ทที่เหมาะสม (จากข้อ 4.7 ) นำไปเขย่าและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 71°C ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที หลังจากนั้นยกออก ทำให้ของผสมมีอุณหภูมิลดลง เติมแอลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตโดยเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 ในปริมาณที่เหมาะสม (จากข้อ 4.8.1) แล้วนำไปเขย่าในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 30, 37 และ 45°C แล้วยกออกจากเครื่องเขย่าเก็บของผสมไว้ 1 คืน ในตู้เย็น แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เพื่อแยกสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต ออกจากตะกอนโครเมียมที่มีโปรตีนซึ่งไม่ละลาย (chrome cake) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยทุกการทดลองจะเปรียบเทียบกับทดลองควบคุมซึ่งจะเหมือนกันแต่ไม่มีการใส่เอนไซม์

4.8.3 เปรียบเทียบการใช้เกลือแอลคาไลน์-เอิร์ท (ในข้อ 4.7) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายด้วยแอลคาไลน์โปรติเอส จากข้อ 4.8.1, 4.8.2

โดยการแปรผันชนิดเกลือแอลคาไลน์-เอิร์ท 3 ชนิด คือ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Ca(OH)}_2$ )

แมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ) และแมกนีเซียมออกไซด์ ( $\text{MgO}$ ) ในปริมาณ 6.5% โดยน้ำหนักของเศษแห้ง

#### 4.8.4 เวลาที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.8.1 โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม (จากข้อ 4.8.1) ติดตามวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของของผสม หลังการเติมเอนไซม์ ทุกๆ 1 ชั่วโมง จนกระทั่งค่าความเป็นกรด-ด่างของของผสมเริ่มคงที่ จะเป็นเวลาที่เพียงพอสำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในการทดลองต่อไป

4.8.5 การลดปริมาณการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายเศษแห้ง ทำการแปรผันปริมาณการใช้เอนไซม์ โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม (จากข้อ 4.7, 4.8.1, 4.8.2 และ 4.8.4 )

4.8.6 ชนิดและปริมาตรน้ำที่เหมาะสมสำหรับการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยแปรผันชนิดของน้ำเป็น 2 ชนิดคือน้ำกลั่นและน้ำประปา ส่วนปริมาตรน้ำนั้นแปรผันเป็น 3 ระดับคือ 10, 15 และ 20 เท่าของน้ำหนักแห้งเริ่มต้น 2.5 กรัม (v/w) โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม (จากข้อ 4.7, 4.8.1, 4.8.2, 4.8.4 และ 4.8.5 )

4.8.7 ขยายขนาดการทดลองการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ในหม้อต้มขนาด 20 ลิตร และขนาด 130 ลิตร โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 4.7, 4.8.1, 4.8.2; 4.8.4 และ 4.8.5) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการเพิ่มปริมาณการผลิตโปรตีนจากเศษแห้งระดับอุตสาหกรรมต่อไป

4.8.8 นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

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

#### 4.9.1 การหาปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS)

ปิเปตตัวอย่างสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต (protein hydrolysate solution) 10-50 มิลลิลิตร ใส่ในถ้วยกระเบื้องที่อบและชั่งน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว อบตัวอย่างในตู้อบที่ตั้งอุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นอบที่อุณหภูมิ 93 องศาเซลเซียส ต่อไปอีกเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเอาออกจากตู้อบ ทิ้งให้เย็น ในโถดูดความชื้น นาน 1 ชั่วโมง จนอุณหภูมิเท่ากับ

อุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนัก แล้วนำไปอบต่อที่อุณหภูมิ 93 องศาเซลเซียส อีกครั้งละ 1 ชั่วโมง จนได้น้ำหนักคงที่ หรือน้ำหนักเปลี่ยนแปลงไม่เกิน 0.1 เปอร์เซนต์ คำนวณปริมาณของแข็งทั้งหมด

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

#### 4.9.2 การหาปริมาณเถ้า

นำตัวอย่างที่หาปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) จากข้อ 3.8.1 ไปเผาที่อุณหภูมิ  $600 \pm 25$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักหาปริมาณเถ้า

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

#### 4.10 ทำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตให้เป็นผงแห้ง โดยวิธีการอบแห้ง

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผงโปรตีน ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความชื้น เถ้า ไนโตรเจน ไขมัน โครเมียม แคลเซียม แมกนีเซียม ฟอสฟอรัสและเส้นใย ตามวิธีในข้อ 4.6.1, 4.6.2, 4.6.3, 4.6.5, 4.6.6, 4.6.7, 4.9.1 และ 4.9.2 ตามลำดับ

##### 4.10.1 การหาปริมาณฟอสฟอรัสโดยวิธี ICP atomic emission spectrometry

ชั่งตัวอย่าง 1-2 กรัม ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ใส่หลอดย่อยสำหรับเครื่องย่อยเติมกรดไนตริก 2 มิลลิลิตร และน้ำ 20 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาหลุมที่อุณหภูมิ 250 – 300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง จนได้สารละลายใส หลังจากนั้นทิ้งให้เย็นลง ถ่ายใส่ขวดปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณธาตุ ด้วยเครื่อง Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometer Model Perkin Elmer PLASMA-1000

##### 4.10.2 การหาปริมาณไฟเบอร์ โดยวิธี Acid Detergent Digestion

ชั่งตัวอย่างประมาณ 2 กรัม ใส่ในบีกเกอร์สำหรับย่อย ใส่ glass bead 3 เม็ด แล้วเติม 1.25%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ที่ต้มเดือดประมาณ 200 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนเดือดนาน 30 นาที นำมารองผ่านผ้ากรองแล้วล้างกากด้วยน้ำร้อนประมาณ 200 มิลลิลิตร จนหมดกรดแล้วถ่ายกากลงในบีกเกอร์สำหรับย่อย เติม 1.25% NaOH ที่ต้มเดือดประมาณ 200 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนเดือดนาน 30 นาที นำมารองผ่านผ้ากรองแล้วล้างกากด้วยน้ำร้อนประมาณ 200 มิลลิลิตร จนหมดด่าง เอา glass bead ออกมาแล้วล้างกากด้วย 95 % alcohol ประมาณ 16-20 มิลลิลิตร ถ่ายกากลงใน crucible ใช้ 95% alcohol เล็กน้อยชะกากจากผ้ากรองลงใน crucible แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง นำมาทิ้งให้เย็นใน desiccator ชั่งน้ำหนัก ( $W_1$ ) นำ crucible และ

กากหลังจากอบแห้งแล้วไปเผาใน furnace ที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส นานประมาณ 30 นาที นำมาทิ้งให้เย็นใน desiccator และชั่งน้ำหนัก ( $W_2$ )

วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณไฟเบอร์ (\%)} = \frac{(W_1 - W_2) \times 100}{W}$$

เมื่อ  $W$  คือน้ำหนักของตัวอย่าง

$W_1$  คือน้ำหนักของ crucible และกากหลังจากอบแห้งแล้ว

$W_2$  คือน้ำหนักของ crucible และเถ้าหลังจากเผาแล้ว

#### 4.11 ตรวจหาเชื้อที่ทำให้เกิดโรคปากและเท้าเปื่อย, แอนแทรกซ์, และเชื้อ *Salmonella sp.*, *Shigella sp.* และ *E. Coli* ในเศษหนังฟอกโครมและโปรตีนผงแห้ง

นำเศษหนังฟอกโครมและโปรตีนผงแห้งไปส่งวิเคราะห์โรคปากและเท้าเปื่อยและแอนแทรกซ์ที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ โดยวิธี ELISA, typing isolation and typing และ PCR ส่วนการตรวจเชื้อ *Salmonella sp.*, *Shigella sp.* และ *E. coli* ทำโดยใช้ Differential media (ในภาคผนวก ข)

#### 4.12 วิเคราะห์สัดส่วนกรดอะมิโนแต่ละชนิด (Amino acid composition)

นำโปรตีนไฮโดรไลเสตผงแห้ง จากข้อ 4.10 ไปวิเคราะห์สัดส่วนกรดอะมิโนแต่ละชนิด ด้วยเครื่อง HPLC (High performance liquid chromatography) ที่ฝ่ายเครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง อาคารปฏิบัติการวิจัยกลาง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

#### 4.13 นำโปรตีนผงแห้งที่ได้ขึ้นรูปเป็นอาหารเม็ดตามสูตรที่เหมาะสมจำนวน 4 สูตร

ในตารางที่ 4 และ 5 และวิเคราะห์สัดส่วนกรดอะมิโนแต่ละชนิด ด้วยเครื่อง HPLC (High performance liquid chromatography) ในตารางที่ 6 นอกจากนี้มีการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเป็นร้อยละของน้ำหนักแห้งอาหารทดลองแต่ละสูตรในตารางที่ 7

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบ (% ของนน.แห้ง) ของอาหารที่ใช้ในการทดลอง

| วัตถุดิบ               | อาหารสูตรที่ |       |       |       |
|------------------------|--------------|-------|-------|-------|
|                        | 1            | 2     | 3     | 4     |
| ปลาป่น                 | 20.20        | 15.10 | 10.10 | 5.10  |
| โปรตีนไฮโดรไลเสต       | -            | 3.70  | 7.40  | 11.10 |
| กากถั่วเหลือง          | 32.80        | 31.76 | 31.66 | 31.35 |
| รำสด                   | 15.00        | 15.00 | 15.00 | 15.00 |
| ข้าวโพดป่น             | 19.60        | 21.10 | 20.60 | 19.90 |
| มันสำปะหลัง            | 7.50         | 7.50  | 7.50  | 7.50  |
| น้ำมันปลา              | 3.40         | 3.70  | 4.00  | 4.30  |
| ไลซีน (Lysine 78%)     | -            | -     | 0.03  | 0.16  |
| เมไทโอนีน (DL-Met 99%) | -            | 0.04  | 0.11  | 0.19  |
| ไดแคลเซียมฟอสเฟต       | -            | 0.60  | 2.10  | 3.90  |
| วิตามินและแร่ธาตุผสม   | 1.50         | 1.50  | 1.50  | 1.50  |

ตารางที่ 5 ชนิดและปริมาณของวิตามินและแร่ธาตุที่ใช้ในการทดลอง

| ชื่อ                       | ปริมาณต่ออาหาร 1 กิโลกรัม |
|----------------------------|---------------------------|
| Vitamin A                  | 4,000 หน่วยสากล           |
| Vitamin B <sub>12</sub>    | 0.2 มิลลิกรัม             |
| D <sub>3</sub>             | 2,000 หน่วยสากล           |
| Vitamin E                  | 50 หน่วยสากล              |
| Menadione sodium bisulfite | 10 มิลลิกรัม              |
| Thiamine                   | 20 มิลลิกรัม              |
| Riboflavin                 | 20 มิลลิกรัม              |
| Niacin                     | 150 มิลลิกรัม             |
| Calcium panthothenate      | 200 มิลลิกรัม             |
| Folic acid                 | 5 มิลลิกรัม               |
| Pyridoxine                 | 20 มิลลิกรัม              |
| Choline chloride           | 2,000 มิลลิกรัม           |
| Biotin                     | 2 มิลลิกรัม               |
| Inositol                   | 400 มิลลิกรัม             |
| Manganese                  | 25 มิลลิกรัม              |
| Zinc                       | 20 มิลลิกรัม              |
| Copper                     | 5 มิลลิกรัม               |
| Iodine                     | 5 มิลลิกรัม               |
| Cobalt                     | 0.05 มิลลิกรัม            |
| Selenium                   | 0.3 มิลลิกรัม             |
| Iron                       | 30 มิลลิกรัม              |

ตารางที่ 6 กรดอะมิโนที่จำเป็นชนิดต่าง ๆ คิดเป็นร้อยละของน้ำหนักแห้งในอาหารแต่ละสูตร  
จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

| กรดอะมิโน   | จำนวนกรัมของกรดอะมิโนต่อ 100 กรัมตัวอย่าง |                |                |                |
|-------------|-------------------------------------------|----------------|----------------|----------------|
|             | อาหารสูตรที่ 1                            | อาหารสูตรที่ 2 | อาหารสูตรที่ 3 | อาหารสูตรที่ 4 |
| แอสปาทิก    | 3.331                                     | 2.962          | 3.036          | 2.684          |
| ซีรีน       | 1.544                                     | 1.398          | 1.453          | 1.263          |
| กลูตามิก    | 5.739                                     | 5.179          | 5.472          | 4.778          |
| ไกลซีน      | 1.870                                     | 2.256          | 3.094          | 3.287          |
| ฮิสติดีน    | 0.927                                     | 0.845          | 0.971          | 0.725          |
| อาร์จินีน   | 2.309                                     | 2.170          | 2.734          | 2.621          |
| ธรีโอนีน    | 1.470                                     | 1.250          | 1.228          | 0.914          |
| อลานีน      | 1.840                                     | 1.784          | 2.038          | 1.916          |
| โพรลีน      | 1.886                                     | 1.941          | 2.432          | 2.331          |
| ซีสตีลน     | 0.396                                     | 1.156          | 0.642          | 0.293          |
| ไทรโรซีน    | 0.966                                     | 0.862          | 0.772          | 0.684          |
| แวลีน       | 1.571                                     | 1.386          | 1.369          | 1.212          |
| เมไทโอนีน   | 0.626                                     | 0.612          | 0.604          | 0.560          |
| ไลซีน       | 1.942                                     | 1.765          | 1.839          | 1.684          |
| ไอโซลูซีน   | 1.457                                     | 1.265          | 1.315          | 1.138          |
| ลูซีน       | 2.458                                     | 2.152          | 2.226          | 1.902          |
| ฟีนอลอลานีน | 1.533                                     | 1.149          | 1.468          | 1.227          |
| ทรีปโตเฟน   | 0.435                                     | 0.463          | 0.389          | 0.329          |

วิเคราะห์ที่ฝ่ายเครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัย  
เกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (ร้อยละ) ของน้ำหนักแห้งอาหารทดลองแต่ละสูตร

| ชนิด<br>( % ) | อาหารสูตรที่ |      |      |      |
|---------------|--------------|------|------|------|
|               | 1            | 2    | 3    | 4    |
| ความชื้น      | 5.90         | 7.00 | 5.80 | 6.50 |
| โปรตีน        | 34.9         | 33.7 | 34.2 | 33.9 |
| ไขมัน         | 7.71         | 7.53 | 7.23 | 7.04 |
| เยื่อใย       | 2.93         | 2.88 | 2.78 | 2.57 |
| เถ้า          | 8.60         | 8.38 | 8.89 | 9.46 |
| แคลเซียม      | 1.25         | 1.22 | 1.38 | 1.53 |
| ฟอสฟอรัส      | 1.27         | 1.22 | 1.38 | 1.59 |

#### 4.13.1 การวางแผนการทดลอง

จัดการทดลองโดยสุ่มตลอด ( Completely random design ) การทดลองแบ่งเป็น 4 ทรีตเมนต์ แต่ละทรีตเมนต์มี 4 ซ้ำ โดยมีปัจจัยที่ต้องศึกษาคือ ระดับโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ใช้แทนที่ปลาป่นในอาหารทดลองระดับต่างๆกัน ดังนี้

ทรีตเมนต์ที่ 1 ใช้สูตรอาหารที่ 1 ที่ใส่โปรตีนไฮโดรไลเสตในอาหารทดลอง(สูตรควบคุม)

ทรีตเมนต์ที่ 2 ใช้สูตรอาหารที่ 2 ที่ใส่โปรตีนไฮโดรไลเสตแทนที่ปลาป่นในอาหารทดลอง อัตราร้อยละ 25

ทรีตเมนต์ที่ 3 ใช้สูตรอาหารที่ 3 ที่ใส่โปรตีนไฮโดรไลเสตแทนที่ปลาป่นในอาหารทดลอง อัตราร้อยละ 50

ทรีตเมนต์ที่ 4 ใช้สูตรอาหารที่ 4 ที่ใส่โปรตีนไฮโดรไลเสตแทนที่ปลาป่นในอาหารทดลอง อัตราร้อยละ 75

#### 4.13.2 การทดลอง

ปลาในแต่ละถังทดลองได้รับอาหารแต่ละสูตรวันละ 3 ครั้ง เวลา 8.00 น. 11.00 น. และ 16.00 น. ทุกวันยกเว้นวันทำการซึ่งวัดจะงดให้อาหาร แต่แต่ละครั้งทำการนับและชั่งน้ำหนักรวมในแต่ละถังทดลองทุก ๆ 4 สัปดาห์ เพื่อตรวจสอบอัตราการรอดและการเจริญเติบโต ปรับอาหารตามขนาดของปลาภายหลังการชั่งวัดแต่ละครั้ง (เมื่อครบ 8 สัปดาห์ ทำการตรวจนับจำนวนปลาที่เหลือและชั่งน้ำหนักรวมพร้อมทั้งทำการเก็บตัวอย่างปลาทดลอง ถึงละ 5 ตัว เพื่อนำไปวิเคราะห์โครเมียม)

#### 4.13.3 การศึกษาอิทธิพลของอาหาร

การวัดการตอบสนองของปลาต่ออาหารทดลองแต่ละสูตร พิจารณาจาก

1. น้ำหนักเพิ่มเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ( weight Gain, WG )

น้ำหนักเพิ่ม = น้ำหนักเฉลี่ยของปลาหลังการทดลอง-น้ำหนักเฉลี่ยของปลาเมื่อเริ่มการทดลอง

2. อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่อวัน (Specific Growth Rate, SGR)

$$SGR = [ \ln (\text{น้ำหนักสุดท้าย}) - \ln (\text{น้ำหนักเริ่มต้น}) / \text{จำนวนวัน} ] \times 100$$

3. อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Feed Conversion Ratio, FCR)

$$FCR = \frac{\text{น้ำหนักอาหารแห้งที่ปลากิน}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}$$

4. อัตรารอด

$$\text{อัตรารอด (ร้อยละ)} = \frac{\text{จำนวนปลาที่เหลือ}}{\text{จำนวนปลาที่เริ่มการทดลอง}} \times 100$$

#### 4.13.4 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การเปรียบเทียบข้อมูลอันเกิดจากความแตกต่างกันของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงปลาทดลอง วิเคราะห์โดยวิธีวาเรียนซ์ (analysis of variance) และการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของการตอบสนองใช้วิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ

95

#### 4.13.5 สถานที่และเวลาในการทดลอง

ทำการทดลองที่บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์จำกัด (มหาชน) จ.สมุทรสาคร โดยเริ่ม  
ทำการทดลองระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ.2545 – กุมภาพันธ์ พ.ศ.2546

## บทที่ 5

### ผลการทดลอง

#### 5.1 การเตรียมแอลคาไลน์โปรติเอสให้บริสุทธิ์บางส่วน

การแยกแอลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่ชั่วโมงที่ 36 โดยการปั่นแยกเอาเฉพาะส่วนน้ำใส ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่เรียก “crude enzyme” นำ crude enzyme มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยการตกตะกอนด้วย 70% แอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำไปปั่นตกตะกอน ละลายตะกอนด้วยสารละลายคาร์บอเนตไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 10.5 แล้วทำ dialyzed ในสารละลายคาร์บอเนตไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 10.5 เพื่อเอาเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออก นำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นไปทำให้เป็นผงแห้ง โดยวิธีการระเหิดแห้ง (Lyophilization) ปริมาณเอนไซม์ผงที่ได้เท่ากับ 3.5 กรัม ต่อปริมาตรน้ำหมัก 3 ลิตร หลังจากนั้นนำเอนไซม์ผงแห้งมาหาค่าแอกติวิตี้ได้ค่าแอกติวิตี้ประมาณ 1.187 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและมีปริมาณโปรตีน 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าแอกติวิตี้จำเพาะเป็น 23.74 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน



(ก)

(ข)

รูปที่ 1 แอลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25

(ก) crude enzyme      (ข) lyophilized enzyme



(ก)

(ข)

รูปที่ 2 เศษหนังฟอกโครมจากขั้นตอนการชุบบาง

(ก) ก่อนบด

(ข) หลังบด

## 5.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเศษหนัง

เศษหนังที่ได้จากขั้นตอนการชุบบางมีลักษณะและองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำ การนำเศษหนังมาบดสับด้วยเครื่องตัดเนื้อความเร็วสูง (blender) จะทำให้เศษหนังมีขนาดสม่ำเสมอใกล้เคียงกัน และเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารเคมี และเอนไซม์ นอกจากนี้เศษหนังที่มีอายุแตกต่างกัน จะมีปริมาณความชื้นแตกต่างกันด้วย โดยเศษหนังที่ได้จากเครื่องชุบบางใหม่ๆจะมีความชื้นกว่าร้อยละ 50 ดังนั้นในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเศษหนังจึงต้องหาปริมาณความชื้นและทดสอบค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างเพื่อให้สามารถแปรผันการเติมต่างได้อย่างเหมาะสม ผลการวิเคราะห์แสดงเป็นค่าร้อยละโดยน้ำหนักของเศษหนังที่ปราศจากความชื้น (moisture free basis) ในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 องค์ประกอบทางเคมีของเศษหนังจากขั้นตอนการชุบยาง

| องค์ประกอบ                     | ค่าเฉลี่ย <sup>1</sup> $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน |
|--------------------------------|---------------------------------------------------|
| pH                             | $3.26 \pm 0.01$                                   |
| Moisture (%)                   | $51.04 \pm 0.05$                                  |
| Ash <sup>2</sup> (%)           | $7.27 \pm 0.09$                                   |
| Chromic oxide <sup>2</sup> (%) | $3.00 \pm 0.05$                                   |
| Chromium <sup>2,5</sup> (%)    | $2.05 \pm 0.04$                                   |
| TKN <sup>2,3,4</sup> (%)       | $11.13 \pm 0.07$                                  |
| Fat <sup>2</sup> (%)           | $0.85 \pm 0.44$                                   |
| Calcium <sup>2</sup> (ppm)     | $0.80 \pm 0.44$                                   |
| Magnesium <sup>2</sup> (ppm)   | $0.08 \pm 0.02$                                   |

<sup>1</sup>ค่าเฉลี่ยจากจำนวนตัวอย่าง 3 ซ้ำ

<sup>2</sup>เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง

<sup>3</sup>Total Kjeldahl Nitrogen

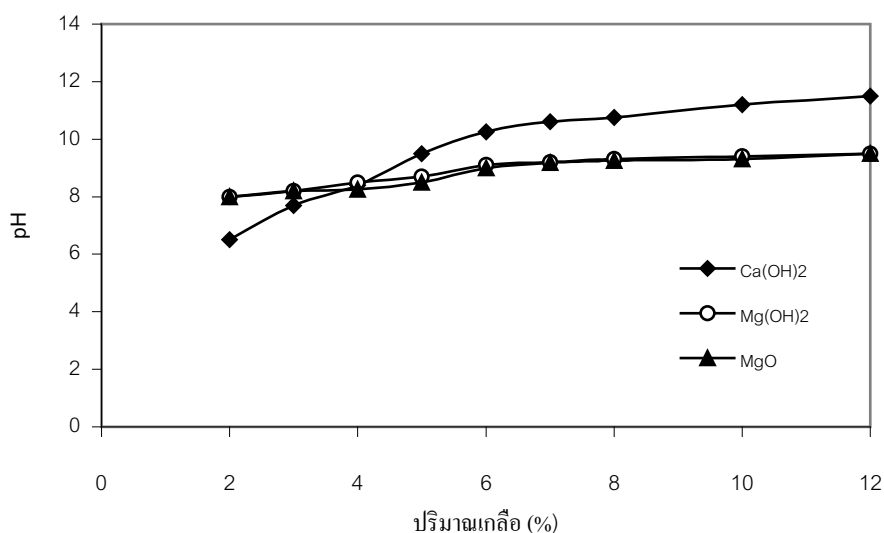
<sup>4</sup>หาปริมาณโปรตีนโดยการคูณ TKN ด้วย 6.25

<sup>5</sup>คำนวณโดยการคูณ Chromic oxide ด้วย 0.6842

### 5.3 การปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเกลืออัลคาไลน์-เอิร์ท

การปรับ pH ของของผสมเศษหนังในน้ำกลั่น โดยศึกษาการใช้เกลืออัลคาไลน์-เอิร์ท 3 ชนิดคือ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) แมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ) และแมกนีเซียมออกไซด์ ( $\text{MgO}$ ) ในปริมาณ 1-12% โดยน้ำหนักของเศษหนัง เพื่อให้ของผสมมี pH ตามต้องการที่ระดับ 8.5 และ 10.5 โดยทำการเขย่าของผสมในอ่างควบคุมอุณหภูมิ  $71^\circ\text{C}$  ด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที พบว่าการปรับ pH ของของผสมให้ได้ระดับ 8.5 จะต้องใช้แมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ ปริมาณ 5% โดยน้ำหนักของเศษหนังหรือใช้แมกนีเซียมออกไซด์ปริมาณ 4% โดยน้ำหนักของเศษหนัง แต่ทั้งแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์และแมกนีเซียมออกไซด์จะไม่สามารถปรับ pH ของของผสมให้ได้ระดับ 10.5 ได้ แม้จะใช้ในปริมาณสูงถึง 12% ก็ตาม สำหรับการปรับ pH ของของผสมจะได้ทั้ง 2 ระดับที่ 8.5 และ 10.5 โดยใช้ปริมาณแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 4% และ 6.5% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ดังนั้นสำหรับการทดลองต่อไปจะเลือกใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ในการปรับ pH ของของผสมก่อนเติมเอนไซม์ รูปที่ 3 แสดงการปรับ pH

โดยการแปรผันปริมาณเกลือ 1-12% โดยน้ำหนักของเศษหนังด้วยเกลืออัลคาไลน์-เอิร์ท ทั้ง 3 ชนิด จากรูปจะเห็นว่า การใช้แมกนีเซียมไฮดรอกไซด์และแมกนีเซียมออกไซด์จะให้ผลในการปรับ pH ไม่แตกต่างกัน



รูปที่ 3 ค่าความเป็นกรด-ด่างของของผสม เมื่อแปรผันชนิด และปริมาณเกลืออัลคาไลน์-เอิร์ท

## 5.4 สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเศษหนังด้วยแอลคาไลน์โปรติเอส

### 5.4.1 ปริมาณการใช้แอลคาไลน์โปรติเอสที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายเศษหนัง

การใช้แอลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในปริมาณที่เหมาะสม โดยแปรผันปริมาณเอนไซม์ในช่วง 0-8% โดยน้ำหนักของเศษหนัง โดยก่อนการเติมเอนไซม์จะเตรียมเศษหนังให้เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ภายใต้สภาวะการทำงานของเอนไซม์ (optimal activity) ที่อุณหภูมิ 45 °C และ pH 10.5 โดยการทำให้โปรตีนในเศษหนังเสียสภาพทางธรรมชาติ ด้วยสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ติดตามวัดค่า pH ของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต และปริมาณเศษหนังที่ไม่ถูกสลายซึ่งมีตะกอนโครเมียมรวมอยู่ด้วย (chrome cake) พบว่าค่า pH ของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตลดลงเมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นและมีแนวโน้มคงที่ ส่วนปริมาณเศษหนังที่ไม่ถูกย่อย (chrome cake) นั้นการทดลองที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 2% (w/v) จะมี chrome cake เหลือน้อยที่สุด การทดลองที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.5% (w/v) และ 8% (w/v) มีปริมาณ chrome cake ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญและเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองอื่นพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ การทดลองที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 1, 1.5, 4 และ 6% (w/v) มีปริมาณ chrome cake ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และการทดลองที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 1.5, 2, 4 และ 6% (w/v) มีปริมาณ chrome cake ไม่แตกต่างกัน

อย่างมีนัยสำคัญ แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างการทดลองที่ใช้เอนไซม์ปริมาณ 1% (w/v) กับ 2% (w/v) ดังแสดงใน (ตารางที่ 9) ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณเอนไซม์ 2 % (w/v) ในการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากต้องการให้มีปริมาณเอนไซม์มากเพียงพอ เพราะอาจมีการสูญเสีย แอคติวิตีของเอนไซม์ไประหว่างการดำเนินการทดลอง เนื่องจากสภาวะในการทดลอง เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง รวมทั้งระยะเวลาที่ทำการศึกษาวิจัย

ตารางที่ 9 ปริมาณ chrome cake และ pH ของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตเมื่อแปรผันปริมาณ การใช้แอลคาไลน์โปรติเอส

| ปริมาณเอนไซม์ (%) | Chrome cake (g) $\pm$ SD <sup>1</sup> | Chrome cake (%) | pH    |
|-------------------|---------------------------------------|-----------------|-------|
| 0                 | 1.786 $\pm$ 0.01 (a)                  | 71.44           | 10.28 |
| 0.5               | 1.138 $\pm$ 0.04 (b)                  | 45.52           | 9.05  |
| 1.0               | 1.050 $\pm$ 0.06 (c)                  | 42.00           | 8.81  |
| 1.5               | 1.044 $\pm$ 0.02 (cd)                 | 41.76           | 8.74  |
| 2.0               | 0.994 $\pm$ 0.02 (d)                  | 39.76           | 8.67  |
| 4.0               | 1.019 $\pm$ 0.03 (cd)                 | 40.76           | 8.66  |
| 6.0               | 1.015 $\pm$ 0.03 (cd)                 | 40.60           | 8.66  |
| 8.0               | 1.112 $\pm$ 0.02 (b)                  | 44.48           | 8.66  |

<sup>1</sup>เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามแนวตั้ง ตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

#### 5.4.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายด้วยแอลคาไลน์โปรติเอส

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

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายเศษหนังด้วยเอนไซม์ที่ 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 10) พบว่าเมื่ออุณหภูมิในการย่อยสลายสูงขึ้น ปริมาณเศษหนังที่ไม่ถูกย่อยจะมีค่าลดลง เปรียบเทียบระหว่างระดับ pH 8.5 และ

10.5 พบว่าปริมาณ chrome cake ที่ pH 10.5 ต่ำกว่าที่ระดับ 8.5 ทุกระดับอุณหภูมิ และให้ค่าต่ำที่สุดที่อุณหภูมิ 45 °C โดยจะมีค่าร้อยละ 46.51, 43.11 และ 40.09 สำหรับการย่อยสลายที่อุณหภูมิที่ 30, 37 และ 45 °C ตามลำดับ

ตารางที่ 10 ปริมาณ chrome cake เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่ pH 8.5 และ 10.5

| อุณหภูมิ (°C) | ค่าเฉลี่ยปริมาณ chrome cake |           |                  |           |
|---------------|-----------------------------|-----------|------------------|-----------|
|               | pH 8.5                      |           | pH 10.5          |           |
|               | (g) $\pm$ SD                | (%)       | (g) $\pm$ SD     | (%)       |
| 30            | 2.175 $\pm$ 0.01            | 87.32 (a) | 1.153 $\pm$ 0.05 | 46.51 (d) |
| 37            | 2.100 $\pm$ 0.02            | 83.88 (b) | 1.069 $\pm$ 0.03 | 43.11 (e) |
| 45            | 2.054 $\pm$ 0.01            | 82.80 (c) | 1.015 $\pm$ 0.04 | 40.09 (f) |

<sup>1</sup> เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งและแนวนอน ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลทางสถิติ ดังแสดงในตารางผนวกที่ 2 ปรากฏว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณ chrome cake ที่ระดับ pH ต่างกัน จะให้ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) แสดงในตารางที่ 10

สำหรับระดับอุณหภูมิที่ต่างกันที่ 45 °C ให้ค่าปริมาณ chrome cake ต่ำที่สุดทั้งที่ pH 8.5 และ 10.5 แตกต่างกับค่าปริมาณ chrome cake ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 °C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณ chrome cake ต่อปัจจัยร่วมระหว่างอุณหภูมิและ pH พบว่าให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อทดสอบโดยวิธี DMRT ปรากฏว่าที่อุณหภูมิ 45 °C และ pH 10.5 จะให้ค่าเฉลี่ยปริมาณ chrome cake ต่ำที่สุด แตกต่างจากเมื่อใช้อุณหภูมิ 45 °C และ pH 8.5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้อุณหภูมิ 45 °C และ pH 10.5

5.4.3 เปรียบเทียบความสามารถในการละลายของโปรตีนในเศษหนัง ในการย่อยสลายเศษหนังด้วยแอลคาไลน์โปรติเอส ในภาวะที่มีการปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยเกลืออัลคาไลน์-เอิร์ทต่างชนิดกัน

การเปรียบเทียบความสามารถในการละลายของโปรตีนในเศษหนัง ในสภาวะการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โดยการปรับ pH ของของผสมเป็น 10.5 ด้วยเกลือต่างชนิดกัน 3 ชนิดคือ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ แมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ และแมกนีเซียมออกไซด์ ปริมาณ 6.5 % โดยน้ำหนักของเศษหนัง แต่ในการใช้แมกนีเซียมไฮดรอกไซด์และแมกนีเซียมออกไซด์จะต้องใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ในการปรับ pH ของของผสมให้ถึง 10.5 ก่อนเติมเอนไซม์ พบว่าการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์จะเหลือตะกอน chrome cake น้อยที่สุด รองลงมาคือ แมกนีเซียมออกไซด์และแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ โดยจะเหลือปริมาณตะกอนร้อยละ 40.21, 50.39 และ 46.79 ตามลำดับ หรือมีความสามารถในการละลายของโปรตีนได้ร้อยละ 59.79, 49.61 และ 53.21 ตามลำดับ (ตารางที่ 11) และเมื่อทดสอบค่า pH ของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้พบว่า pH ของไฮโดรไลเสตจะลดลงเมื่อความสามารถในการละลายของเศษหนังเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 11 ปริมาณ chrome cake และความสามารถในการละลายโปรตีนเศษหนัง

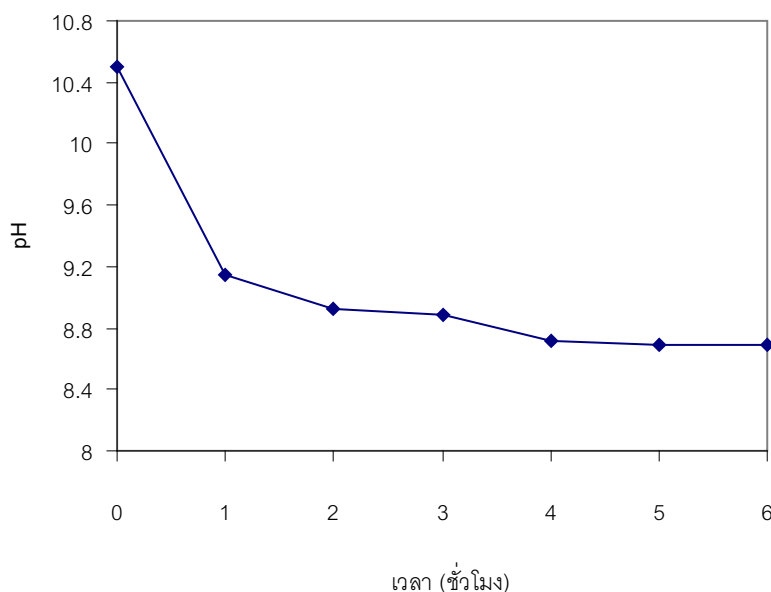
| อัลคาไลน์-เอิร์ท               | ค่าเฉลี่ย <sup>1</sup> chrome cake |       | Solubility of shaving (%) | pH ของโปรตีนไฮโดรไลเสต |
|--------------------------------|------------------------------------|-------|---------------------------|------------------------|
|                                | (g) $\pm$ SD                       | (%)   |                           |                        |
| Ca(OH) <sub>2</sub>            | 1.005 $\pm$ 0.01(a)                | 40.21 | 59.79                     | 8.89                   |
| Mg(OH) <sub>2</sub> $\pm$ NaOH | 1.267 $\pm$ 0.10 (b)               | 50.39 | 49.61                     | 9.43                   |
| MgO $\pm$ NaOH                 | 1.162 $\pm$ 0.03 (c)               | 46.79 | 53.21                     | 9.35                   |

<sup>1</sup>เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งตัวอักษรที่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

5.4.4 เวลาที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายด้วยอัลคาไลน์โปรติเอส

การย่อยสลายเศษหนังด้วยเอนไซม์ภายใต้สภาวะการเตรียมเศษหนังในน้ำกลั่นให้มี pH 10.5 ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 6.5% โดยน้ำหนักของเศษหนัง (ผลจากข้อ 5.3) โดยใช้แอลคาไลน์โปรติเอส 2% โดยน้ำหนักของเศษหนัง (ผลจากข้อ 5.4.1) เขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 45 °C โดยการแปรผันเวลาในการเขย่าในช่วง 0-6 ชั่วโมง วัดค่า pH ของของผสมทุกๆ 1 ชั่วโมง

ตั้งแต่อ่อนเต็มเอนไซม์ (ชั่วโมงที่ 0) พบว่า pH ของของผสมมีค่า 10.5 ซึ่งก็คือ pH สุดท้ายของของผสมหลังการย่อยตัวอย่างด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 6.5% พบว่าค่า pH ของของผสมจะลดลงอย่างมากในช่วงชั่วโมงที่ 0-2 หลังการเติมเอนไซม์ (ภาพที่ 8) จาก pH 10.5 ลงมาที่ระดับ 8.47 และค่า pH มีแนวโน้มจะคงที่ เมื่อใช้เวลาในการย่อย 4 ชั่วโมงขึ้นไป โดยมีค่า pH ในชั่วโมงที่ 1 ถึง 6 เป็น 9.15, 8.92, 8.89, 8.72, 8.69 และ 8.69 ตามลำดับ



รูปที่ 4 ค่าความเป็นกรด-ด่างของของผสม เมื่อแปรผันเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายเศษหนังด้วย แอลคาไลน์โปรติเอส

เมื่อวิเคราะห์พารามิเตอร์หรือองค์ประกอบทางเคมีบางตัว หลังจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างการใช้เวลาในการย่อยที่ 3 หรือ 6 ชั่วโมง ด้วยวิธี t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงในตารางผนวกที่ 3-8 พบว่า pH ของของผสมและ pH ของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต ที่กรองออกจาก chrome cake ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ความสามารถในการละลายของเศษหนังหรือปริมาณน้ำหนักแห้งของ chrome cake และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่นำไปทำแห้งโดยวิธีการอบแห้งก็มีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโครเมียมใน chrome cake ในรูป  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  โดยวิธีเปอร์คลอริกแอซิดออกซิเดชัน พบว่าเมื่อใช้เวลาในการย่อยสลายน้อยจะมีโครเมียมอยู่ใน chrome cake มากกว่า โดยจะมีค่า  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  ร้อยละ 15.36 และ 14.63 สำหรับการย่อยเศษหนังด้วยเวลา 3 และ 6 ชั่วโมงตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี t-test พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ ส่วนผลการวิเคราะห์ปริมาณโครเมียมในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยวิธีอะตอมมิกแอบซอร์ปชัน พบว่าการย่อยสลายด้วยแอลคาไลน์โปรติเอสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะมีปริมาณโครเมียมในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตไม่ถึง 1 ppm ซึ่งน้อยกว่าการย่อยสลายที่ใช้เวลานานถึง 6 ชั่วโมง โดยมีปริมาณโครเมียมในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต 0.02 และ 0.09 ppm สำหรับการย่อยเศษหนังด้วยเวลา 3 และ 6 ชั่วโมงตามลำดับ

ตารางที่ 12 พารามิเตอร์บางตัวที่ใช้ในการตัดสินใจลดเวลาในการย่อยสลายด้วยแอลคาไลน์ โปรติเอส

| พารามิเตอร์                                       | เวลาที่ใช้ในการย่อยสลายด้วยแอลคาไลน์โปรติเอส<br>(ชั่วโมง) |                  |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------|
|                                                   | 3                                                         | 6                |
| pH ของของผสม                                      | $9.15 \pm 0.03$                                           | $9.00 \pm 0.10$  |
| pH ของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต                    | $8.86 \pm 0.05$                                           | $8.94 \pm 0.03$  |
| ปริมาณ chrome cake (%)                            | $40.05 \pm 0.40$                                          | $41.73 \pm 0.55$ |
| Solubility of shaving (%)                         | $59.95 \pm 0.40$                                          | $58.27 \pm 0.55$ |
| ปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสตผงแห้ง (%)                  | $45.60 \pm 1.06$                                          | $45.93 \pm 0.45$ |
| ปริมาณ $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ใน chrome cake (%) | $15.36 \pm 0.52$                                          | $14.63 \pm 0.66$ |
| ปริมาณ Cr (ppm) ในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต        | $0.02 \pm 0.004$                                          | $0.09 \pm 0.02$  |

#### 5.4.5 การลดปริมาณการใช้แอลคาไลน์โปรติเอส

เนื่องจากแอลคาไลน์โปรติเอสที่ใช้ในการทดลองมีต้นทุนสูงดังนั้นจึงได้ศึกษาการลดปริมาณการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายเศษหนัง โดยเปลี่ยนปริมาณการใช้เอนไซม์เป็น unit แทนการใช้เอนไซม์เป็นเปอร์เซ็นต์เนื่องจากเอนไซม์ที่ผลิตได้ในแต่ละครั้งมีแอกติวิตีไม่เท่ากันและอาจมีการสูญเสียแอกติวิตีไประหว่างการเก็บรักษา ทำให้การทดลองที่ใช้ปริมาณเอนไซม์เป็นเปอร์เซ็นต์อาจได้ผลการทดลองที่ไม่แน่นอน การใช้เอนไซม์เป็น unit นั้นจะทำให้ได้ปริมาณเอนไซม์ที่แน่นอนสำหรับการย่อยสลายเศษหนังเพื่อผลิตโปรตีน จากผลการทดลองข้อ 5.4.1 ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมคือ 2 % (w/v) คิดเป็น 59.35 unit การทดลองนี้จึงทำการแปรผันแอกติวิตีของเอนไซม์ในช่วง 0-60 unit ซึ่งได้ผลการทดลองดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ปริมาณ chrome cake เมื่อแปรรูปแอคติวิตีของเอนไซม์ในช่วง 0-60 unit

| เอนไซม์ | Chrome cake |      |      |                              |       |
|---------|-------------|------|------|------------------------------|-------|
| (unit)  | 1           | 2    | 3    | เฉลี่ย $\pm$ SD <sup>1</sup> | (%)   |
| 0       | 1.62        | 1.70 | 1.63 | $1.65 \pm 0.04$ (a)          | 66.08 |
| 5       | 1.02        | 1.09 | 1.03 | $1.04 \pm 0.04$ (b)          | 41.92 |
| 10      | 0.97        | 0.99 | 0.97 | $0.98 \pm 0.01$ (c)          | 39.12 |
| 15      | 0.92        | 0.97 | 0.98 | $0.95 \pm 0.03$ (c)          | 38.16 |
| 20      | 0.95        | 0.96 | 0.91 | $0.94 \pm 0.03$ (c)          | 37.56 |
| 40      | 0.96        | 0.93 | 0.95 | $0.95 \pm 0.02$ (c)          | 37.80 |
| 60      | 0.93        | 0.95 | 0.97 | $0.95 \pm 0.02$ (c)          | 37.92 |

<sup>1</sup>เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามแนวตั้ง ตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับที่ความเชื่อมั่น 95%

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ chrome cake ในกลุ่มที่มีการใช้เอนไซม์ที่ทุกระดับแอคติวิตี กับการทดลองชุดควบคุมพบว่าการใช้เอนไซม์ทำให้เหลือปริมาณ chrome cake น้อยกว่าการทดลองที่ไม่มีการเติมเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางผนวกที่9) และพบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ที่ระดับแอคติวิตี 20 unit หรือแอคติวิตีจำเพาะ 400 unit/mg protein ปริมาณ chrome cake จะเหลือน้อยที่สุด โดยจะทำให้เหลือ chrome cake ประมาณ 37.56 % โดยน้ำหนักเริ่มต้นของเศษแห้ง เมื่อดูค่าทางสถิติพบว่ากลุ่มที่มีการใช้เอนไซม์ที่ระดับแอคติวิตี 5 unit ให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบทุกระดับแอคติวิตี และกลุ่มที่มีการใช้เอนไซม์ที่ระดับแอคติวิตี 10, 15, 20, 40 และ 60 unit ให้ค่าทางสถิติไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นระดับแอคติวิตีที่เลือกใช้ในการทดลองต่อไปนั้น จึงเลือก 10 unit เพราะเป็นระดับแอคติวิตีที่เพียงพอสำหรับการทดลอง

สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากกลุ่มที่ใช้เอนไซม์มีลักษณะใสและเหลืองกว่าสารละลายไฮโดรไลเสตที่ได้จากกลุ่มที่ไม่ใช้เอนไซม์ และพบว่า ตะกอน chrome cake ที่เหลือจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ มีลักษณะเป็นตะกอนขนาดเล็ก ละเอียดย และเป็นเนื้อเดียวกันคล้ายครีม เค้กต่างจาก chrome cake ที่ได้จากกลุ่มที่ไม่ใช้เอนไซม์ซึ่งจะได้ตะกอนที่หยาบกว่า และเมื่อนำ chrome cake ไปหาขนาดอนุภาคด้วยเครื่องสแกนิงอิเล็กตรอนไมโครสโคป (SEM) พบว่า chrome cake ที่ได้จากกลุ่มที่ใช้เอนไซม์ ขนาดอนุภาคเล็กกว่า chrome cake ที่ได้จากกลุ่มที่ไม่ใช้เอนไซม์ โดยมีขนาดอนุภาคประมาณอยู่ในช่วง 12-182 และ 100- 600 ไมโครเมตร ตามลำดับ



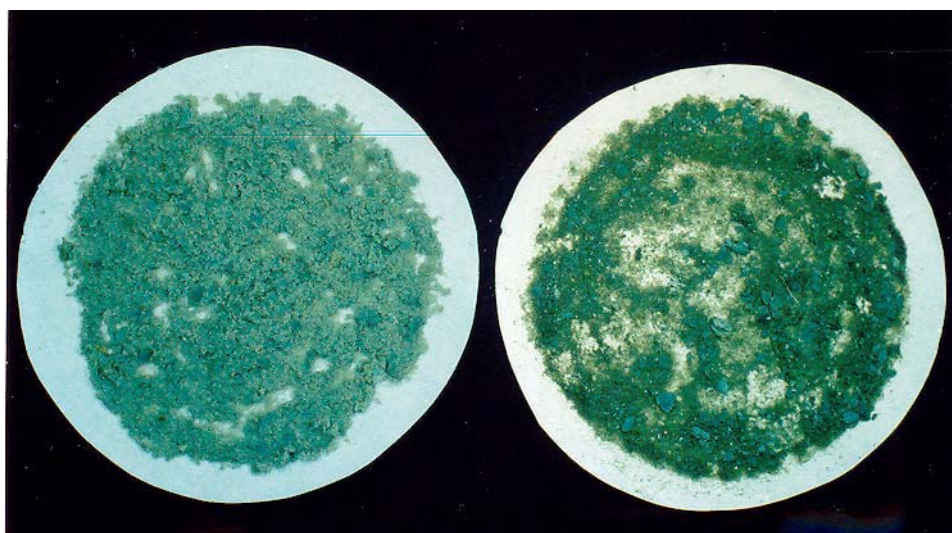
(ก)

(ข)

รูปที่ 5 สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการทดลองใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร

(ก) ไม่ใช้เอนไซม์

(ข) ใช้แอลคาไลน์โปรตีเอส 10 unit



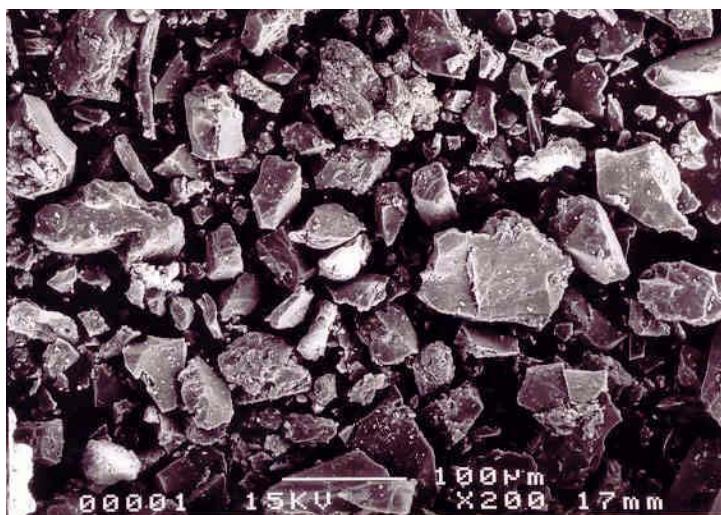
(ก)

(ข)

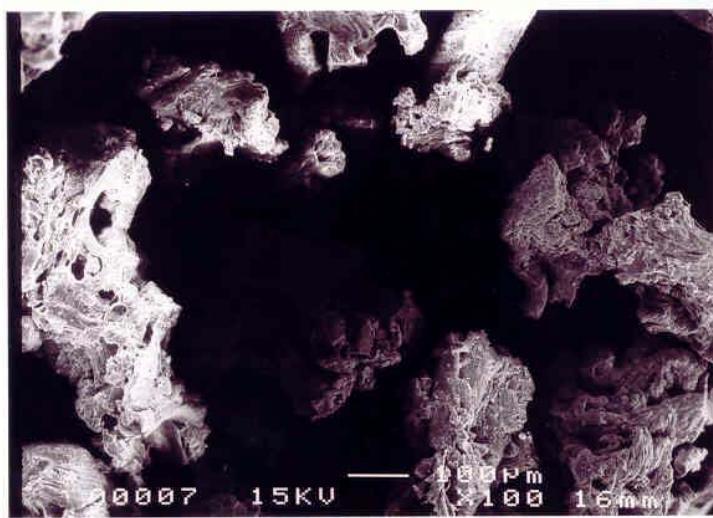
รูปที่ 6 ตะกอน chrome cake ที่กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์หนึ่ง

(ก) กลุ่มที่ไม่ใช้เอนไซม์

(ข) กลุ่มที่ใช้เอนไซม์



รูปที่ 7 ขนาดอนุภาค chrome cake ที่ได้จากกลุ่มที่ใช้เอนไซม์ตรวจสอบด้วยเครื่องสแกนนิ่งอิเล็กตรอนไมโครสโคป



รูปที่ 8 ขนาดอนุภาค chrome cake ที่ได้จากกลุ่มที่ไม่ใช้เอนไซม์ตรวจสอบด้วยเครื่องสแกนนิ่งอิเล็กตรอนไมโครสโคป

#### 5.4.6 การแปรผันชนิดและปริมาณของน้ำที่ใช้ในการต้มหมัก

เนื่องจากน้ำที่ใช้ในการทดลองเป็นน้ำกลั่น เมื่อจะทำการเพิ่มขนาดการทดลองเป็นระดับหลายลิตรจะก่อให้เกิดความยุ่งยากในการผลิตน้ำกลั่นให้เพียงพอต่อความต้องการ และต้องเสียค่าใช้จ่ายในการผลิตน้ำกลั่นสูง ดังนั้นการเปลี่ยนชนิดของน้ำจากน้ำกลั่นเป็นน้ำประปา และลดปริมาณน้ำที่ใช้ในการทดลองน่าจะช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในการผลิตโปรตีนให้ลดลงได้และเป็นการเพิ่มความสะดวกในการหาน้ำมาใช้ในการผลิตโปรตีนได้ โดยทดลองใช้น้ำ 2 ชนิดคือ น้ำกลั่นและน้ำประปา แปรผันปริมาณเป็น (10, 15 และ 20 เท่าต่อน้ำหนักแห้งเริ่มต้น) โดยใช้เอนไซม์

ตารางที่ 14 ปริมาณ chrome cake เมื่อแปรผันปริมาณน้ำในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในน้ำกลั่นและน้ำประปา (10, 15 และ 20 เท่า (w/v) )

| ปริมาณน้ำ (เท่า)<br>(w/v) | ค่าเฉลี่ยปริมาณ chrome cake (g) + SD <sup>1</sup> |                 |
|---------------------------|---------------------------------------------------|-----------------|
|                           | น้ำกลั่น                                          | น้ำประปา        |
| 10                        | 1.09 ± 0.01 (a)                                   | 1.02 ± 0.02 (d) |
| 15                        | 1.03 ± 0.03 (b)                                   | 0.96 ± 0.01 (e) |
| 20                        | 1.04 ± 0.04 (c)                                   | 1.00 ± 0.01 (f) |

<sup>1</sup>เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งและแนวนอน ตัวอักษรที่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เมื่อพิจารณาผลการทดลองจากน้ำหนักเศษแห้งที่ไม่ถูกย่อยในรูปของ chrome cake (ตารางที่ 14) พบว่า การทดลองที่ใช้น้ำปริมาณ 15 เท่า จะมีปริมาณ chrome cake ต่ำที่สุดทั้งในน้ำกลั่นและน้ำประปา โดยในน้ำประปาจะมีปริมาณ chrome cake ต่ำกว่าในน้ำกลั่น จะมีค่า 1.02, 0.96 และ 1.00 กรัม สำหรับการย่อยสลายที่ปริมาณน้ำ 10, 15 และ 20 เท่า (w/v) ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลทางสถิติ ดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ 3 ปรากฏว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณ chrome cake ในน้ำต่างชนิดกันจะให้ค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) สำหรับปริมาณน้ำที่ต่างกันนั้นการทดลองที่ใช้ปริมาณน้ำที่ 15 เท่า ให้ค่าเฉลี่ยปริมาณ chrome cake ต่ำที่สุด (0.96) แตกต่างกับค่าเฉลี่ยปริมาณ chrome cake ที่ปริมาณน้ำ 10 และ 20 เท่า (w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณ chrome cake ต่อปัจจัยร่วมระหว่างชนิดของน้ำและปริมาณ พบว่าให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อทดสอบโดยวิธี DMRT จากผลการทดลองปรากฏ

ว่าที่ปริมาณน้ำ 15 เท่า และ น้ำประปา จะให้ค่าเฉลี่ยปริมาณ chrome cake ต่ำที่สุด ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้น้ำประปาปริมาณ 15 เท่า(w/v)

#### 5.4.7 ขยายขนาดการทดลองการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ในหม้อต้มขนาด 20 ลิตร และขนาด 130 ลิตร

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายเศษหนังด้วยเอนไซม์ ( ผลจากข้อ 4.4.1, 4.4.2 4.4.3 และ 4.4.4 ) จึงทำการขยายขนาดการทดลองการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ในหม้อต้มขนาด 20 และ 130 ลิตรเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการเพิ่มปริมาณการผลิตโปรตีนจากเศษหนังระดับอุตสาหกรรมต่อไป ผลการศึกษาการย่อยสลายเศษหนังด้วยเอนไซม์ในหม้อต้มขนาด 20 และ 130 ลิตรนั้นได้ผลดังตารางที่ 15

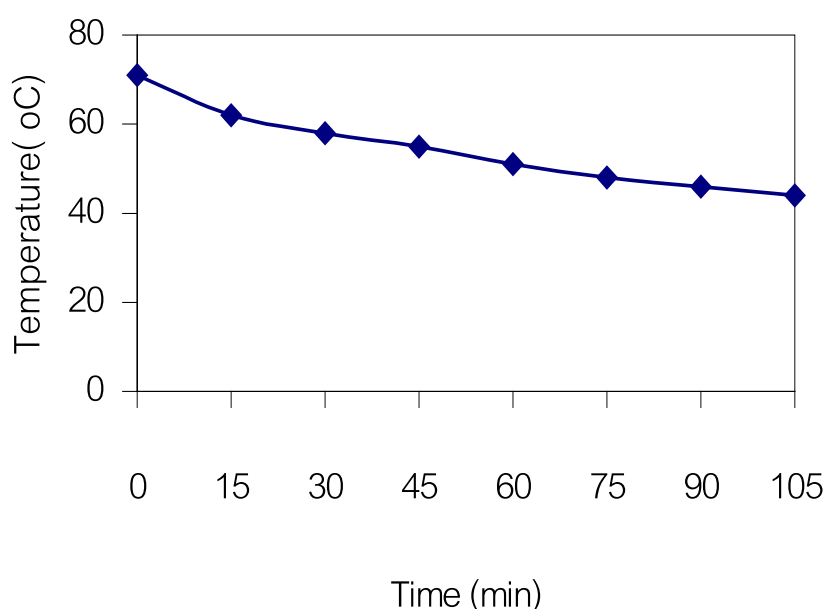
ตารางที่ 15 ปริมาณผลผลิต chrome cake, pH และปริมาณผลผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต เมื่อทดลองการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ในหม้อต้มขนาด 20 ลิตร (หนัง 1 กิโลกรัมต่อน้ำประปา 15 ลิตร) และ 130 ลิตร (หนัง 8 กิโลกรัมต่อน้ำประปา 120 ลิตร)

| ขนาดหม้อต้ม<br>( liter) | Chrome cake (g)<br>$\pm$ SD | Chrome<br>cake (%) | ผลผลิตโปรตีน<br>ไฮโดรไลเสต (g) | ผลผลิตโปรตีน<br>ไฮโดรไลเสต (%) | pH    |
|-------------------------|-----------------------------|--------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------|
| 20 ( ไม่ใช้เอนไซม์)     | 352.17 $\pm$ 7.97           | 35.22              | 225.95                         | 22.60                          | 11.16 |
| 20 (ใช้เอนไซม์)         | 285.67 $\pm$ 6.12           | 28.57              | 345.73                         | 34.57                          | 9.06  |
| 130 ( ไม่ใช้เอนไซม์)    | 3,195.00 $\pm$ 157.61       | 39.94              | 2,583.24                       | 32.29                          | 10.76 |
| 130 (ใช้เอนไซม์)        | 1740.26 $\pm$ 65.72         | 21.75              | 3,223.33                       | 40.29                          | 9.21  |

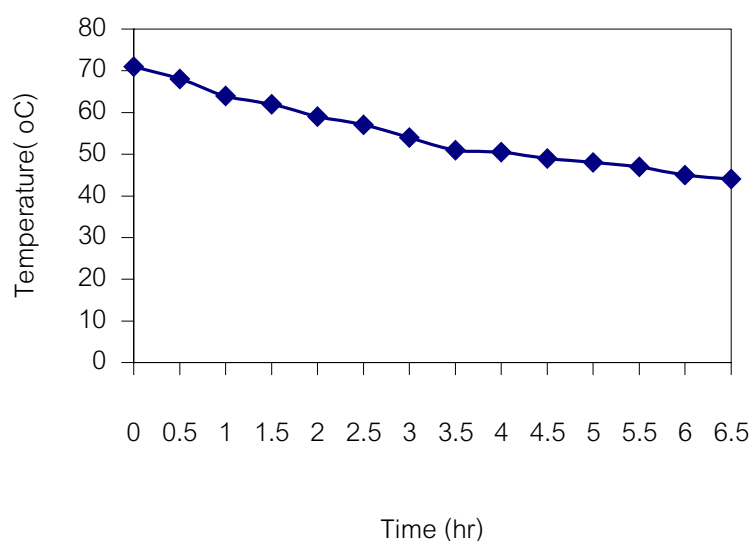
ผลการศึกษาการขยายขนาดการผลิตจากระดับ flask 250 มิลลิลิตร เป็นหม้อขนาด 20 ลิตร(ใช้หนัง จำนวน 1 กิโลกรัม ต่อน้ำประปา 15 ลิตร) โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้ศึกษามาแล้วพบว่า ในการทดลองที่ไม่ใช้เอนไซม์ มี ปริมาณ chrome cake , pH และ โปรตีนไฮโดรไลเสตเท่ากับ 35.22%, 11.16 และ 22.60% ตามลำดับ ส่วนในทดลองที่ใช้เอนไซม์ มีปริมาณ chrome cake, pH และ โปรตีนไฮโดรไลเสต เท่ากับ 28.57%, 9.06 และ 34.57 % ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มขนาดหม้อต้มเป็นขนาด 130 ลิตร (ใช้หนัง 8 กิโลกรัม ต่อน้ำประปา120 ลิตร) พบว่า ในการทดลองที่ไม่ใช้เอนไซม์ มี ปริมาณ chrome cake , pH และ โปรตีนไฮโดรไลเสต เท่ากับ 39.94%, 10.76 และ 32.29% ตามลำดับ ส่วนในการทดลองที่ใช้เอนไซม์มีปริมาณ chrome cake, pH และ

โปรตีนไฮโดรไลเซต เท่ากับ 21.75 %, 9.21 และ 40.29 % ตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นว่าในกลุ่มที่ใช้เอนไซม์ทั้งการทดลองในหม้อขนาด 20 และ 130 ลิตร จะทำให้เหลือปริมาณ chrome cake น้อยกว่าการทดลองที่ไม่ใช้เอนไซม์ และการทดลองในหม้อขนาด 130 ลิตรจะทำให้เหลือปริมาณ chrome cake น้อยกว่าการทดลองในหม้อขนาด 20 ลิตร

การลดลงของอุณหภูมิของของผสมในหม้อต้มขนาด 20 ลิตรจากอุณหภูมิ 71 °C จนเหลือ 45 °C ใช้เวลาประมาณ 105 นาที ส่วนการลดลงของอุณหภูมิของของผสมในหม้อต้มขนาด 130 ลิตร จากอุณหภูมิ 71 °C จนเหลือ 45 °C ใช้เวลาประมาณ 390 นาที หรือ 6.5 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 9 และ 10 ตามลำดับ ซึ่งจากผลดังกล่าวทำให้ปริมาณโปรตีนที่ได้จากการทดลองในหม้อต้มขนาด 130 ลิตรมีปริมาณสูงกว่าการทดลองในหม้อต้ม 20 ลิตร



รูปที่ 9 การลดลงของอุณหภูมิของของผสมในหม้อต้มขนาด 20 ลิตรจากอุณหภูมิ 71 °C จนเหลือ 45 °C



ภาพที่ 10 การลดลงของอุณหภูมิของของผสมในหม้อต้มขนาด 130 ลิตรจากอุณหภูมิ 71 °C จนเหลือ 45 °C

#### 5.5 องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต

สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการต้มใน flask ขนาด 250 มิลลิเมตร มีค่า pH อยู่ในช่วง 9.02-9.44 มีปริมาณโครเมียมละลายอยู่เพียง 0.22 ppm ปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) 27.24 mg/ml ปริมาณแอมโมเนีย 5.03 mg/ml หรือประมาณ 5,030 ppm มีปริมาณแคลเซียมและแมกนีเซียม 362.4 และ 0.11 ppm ตามลำดับ

สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการต้มในหม้อต้มขนาด 20 ลิตร มีค่า pH อยู่ในช่วง 8.68-8.92 มีปริมาณโครเมียมละลายอยู่เพียง 0.9 ppm ปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) 29.24 mg/ml ปริมาณแอมโมเนีย 5.12 mg/ml หรือประมาณ 5,120 ppm มีปริมาณแคลเซียมและแมกนีเซียม 398 และ 0.07 ppm ตามลำดับ

สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการต้มในหม้อต้มขนาด 130 ลิตร มีค่า pH อยู่ในช่วง 8.91-9.05 มีปริมาณโครเมียมละลายอยู่เพียง 0.4 ppm ปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) 36.86 mg/ml ปริมาณแอมโมเนีย 7.38 mg/ml หรือประมาณ 7,380 ppm มีปริมาณแคลเซียมและแมกนีเซียม 695 และ 0.04 ppm ตามลำดับ องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต แสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตเมื่อต้มใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร, หม้อต้มขนาด 20 และ 130 ลิตร

| องค์ประกอบ           | ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD <sup>1</sup> |                  |                  |
|----------------------|---------------------------------|------------------|------------------|
|                      | 250 มิลลิลิตร                   | 20 ลิตร          | 130 ลิตร         |
| pH                   | 9.23 $\pm$ 0.21                 | 8.80 $\pm$ 0.12  | 8.98 $\pm$ 0.07  |
| Total solids (mg/ml) | 27.24 $\pm$ 0.28                | 29.24 $\pm$ 0.16 | 36.86 $\pm$ 1.14 |
| Ash (mg/ml)          | 5.03 $\pm$ 0.04                 | 5.12 $\pm$ 0.04  | 7.38 $\pm$ 0.27  |
| Chromium (ppm)       | 0.22 $\pm$ 0.041                | 0.9 $\pm$ 0.21   | 0.4 $\pm$ 0.07   |
| Calcium (ppm)        | 362.4 $\pm$ 7.77                | 398 $\pm$ 4.81   | 695 $\pm$ 30.07  |
| Magnesium (ppm)      | 0.11 $\pm$ 0.02                 | 0.07 $\pm$ 0.02  | 0.04 $\pm$ 0.02  |

<sup>1</sup>ค่าเฉลี่ยจากจำนวนตัวอย่าง N = 9

เมื่อนำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการต้มใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตรไปทำให้เป็นผงแห้งโดยวิธีการอบแห้งจะได้ผงโปรตีนโดยเฉลี่ยร้อยละ 44.9 โดยน้ำหนักแห้งของเศษแห้งเป็นผงโปรตีนที่มีความชื้นโดยเฉลี่ยร้อยละ 12.55 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) ร้อยละ 14.95 ปริมาณแคลเซียม 552.7 ppm และมีโครเมียม 17 ppm

เมื่อนำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการต้มในหม้อต้มขนาด 20 ลิตรไปทำให้เป็นผงแห้งโดยวิธีการอบแห้งจะได้ผงโปรตีนโดยเฉลี่ยร้อยละ 34.57 โดยน้ำหนักแห้งของเศษแห้งเป็นผงโปรตีนที่มีความชื้นโดยเฉลี่ยร้อยละ 8.50 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) ร้อยละ 14.89 ปริมาณแคลเซียม 703.7 ppm และมีโครเมียม 15 ppm

เมื่อนำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการต้มในหม้อต้มขนาด 130 ลิตร ไปทำให้เป็นผงแห้งโดยวิธีการอบแห้งจะได้ผงโปรตีนโดยเฉลี่ยร้อยละ 40.29 โดยน้ำหนักแห้งของเศษแห้งเป็นผงโปรตีนที่มีความชื้นโดยเฉลี่ยร้อยละ 7.92 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) ร้อยละ 14.19 ปริมาณแคลเซียม 1145.70 ppm และมีโครเมียม 14 ppm องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสตแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ต้มใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร, หม้อต้มขนาด 20 และ 130 ลิตรแล้วทำแห้งโดยวิธีการอบแห้ง

| องค์ประกอบ                  | ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD |                   |                     |
|-----------------------------|--------------------|-------------------|---------------------|
|                             | 250 มิลลิลิตร      | 20 ลิตร           | 130 ลิตร            |
| Moisture (%)                | 12.55 $\pm$ 0.38   | 8.50 $\pm$ 0.20   | 7.92 $\pm$ 0.34     |
| Ash <sup>1</sup> (%)        | 17.14 $\pm$ 0.16   | 16.05 $\pm$ 0.21  | 20.43 $\pm$ 0.59    |
| TKN <sup>1,2,3</sup> (%)    | 14.95 $\pm$ 0.09   | 14.89 $\pm$ 0.26  | 14.19 $\pm$ 0.63    |
| Fat <sup>1</sup> (%)        | 0.73 $\pm$ 0.57    | 2.26 $\pm$ 0.64   | 1.99 $\pm$ 0.33     |
| Fiber (%)                   | -                  | 0.03 $\pm$ 0.01   | 0.10 $\pm$ 0.02     |
| Calcium <sup>1</sup> (ppm)  | 552.7 $\pm$ 0.71   | 703.40 $\pm$ 4.54 | 1145.70 $\pm$ 11.17 |
| Chromium <sup>1</sup> (pmm) | 7.00 $\pm$ 0.04    | 15.00 $\pm$ 0.05  | 14.00 $\pm$ 0.05    |
| Phosphorus (ppm)            | -                  | 0.01 $\pm$ 0.001  | 0.04 $\pm$ 0.003    |

<sup>1</sup>เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง

<sup>2</sup>Total Kjeldahl Nitrogen

<sup>3</sup>ปริมาณโปรตีน โดยคูณ TKN กับ 6.25



(ก)

(ข)

รูปที่ 11 สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการทดลองในหม้อต้มขนาด 20 ลิตร

(ก) ใช้แอลคาไลน์โปรติเอส

(ข) ไม่ใช้เอนไซม์