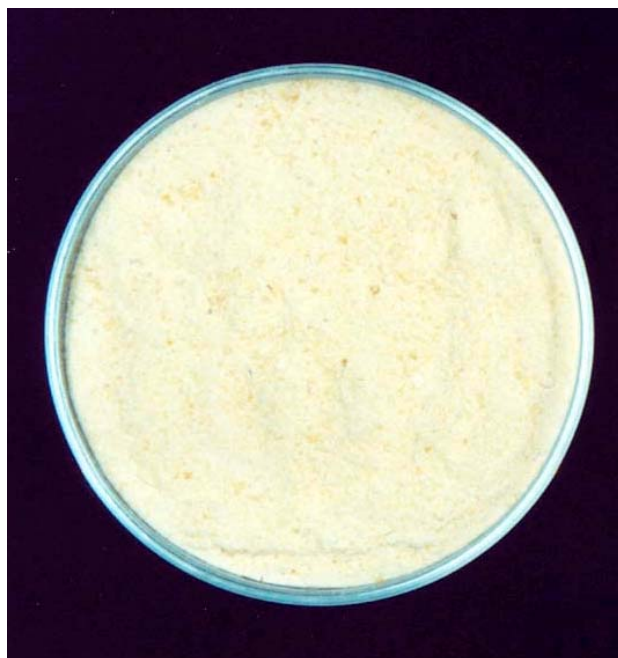




รูปที่ 12 สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตในชุดทดลองที่ใช้แอลคาไลน์โปรตีเอสหลังกรองด้วย
กระดาษกรองเบอร์ 1



รูปที่13 โปรตีนผงแห้ง



รูปที่ 14 หม้อต้ม ขนาด 20 ลิตร



รูปที่ 15 หม้อต้ม ขนาด 130 ลิตร

5.6 ผลการตรวจหาเชื้อโรคที่ทำให้เกิดโรคปากและเท้าเปื่อย, แอนแทรกซ์, และเชื้อ *Salmonella* sp., *Shigella* sp. และ *E. coli* ในเศษหนังฟอกโครมและโปรตีนผงแห้ง

ผลการวิเคราะห์เชื้อโรคปากและเท้าเปื่อยและเชื้อแอนแทรกซ์โดยวิธี ELISA, typing isolation and typing และ PCR ที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ ไม่พบว่ามีเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคทั้งสอง ในเศษหนังฟอกโครมและโปรตีนผงแห้ง ส่วนการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* sp., *Shigella* sp. และ *E. coli* ในเศษหนังฟอกโครมและโปรตีนผงแห้ง โดยใช้ Differential media คือ SS Agar และ EMB Agar ไม่พบการเจริญของเชื้อทั้งสามชนิด

5.7 กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของผงโปรตีน

ผงโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังด้วยแอลคาไลน์โปรติเอส มีปริมาณไนโตรเจนประมาณร้อยละ 14 หรือคิดเป็นโปรตีนร้อยละ 88 เมื่อนำไปวิเคราะห์สัดส่วนกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ เปรียบเทียบกับกรดอะมิโนของคอลลาเจน ชนิด I (Collagen Type I) ชนิดที่เป็นองค์ประกอบในหนังสัตว์ การวิเคราะห์กรดอะมิโนใช้วิธี Water AccQ. Tag Amino Acid Analysis Method ผลการวิเคราะห์สัดส่วนกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ แสดงในตารางที่ 18

สัดส่วนกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากเศษหนังที่ใช้ทดลอง มีสัดส่วนที่ใกล้เคียงกับกรดอะมิโนของคอลลาเจน ชนิด I, กรดอะมิโนในโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังด้วยแอลคาไลน์โปรติเอสในงานวิจัยของ นภา ศิวรังสรรค์ (2542) และกรดอะมิโนในโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังด้วย ALKALASE™ .ในงานวิจัยของ Taylor และคณะ (1992) แม้ว่ากรดอะมิโนแต่ละชนิดที่ได้จะมีปริมาณแตกต่างกับคอลลาเจน แต่ว่ามีรูปแบบ (profile) ที่ใกล้เคียงกัน และพบว่าโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังโดยไม่ใช้เอนไซม์ มีปริมาณกรดอะมิโนต่ำกว่าโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังโดยใช้เอนไซม์ซึ่งมีผลทำให้โปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังโดยใช้เอนไซม์มีคุณภาพสูงกว่าโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังโดยไม่ใช้เอนไซม์

ตารางที่ 18 กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเสต

กรดอะมิโน	จำนวนกรัมของกรดอะมิโนต่อ 100 กรัมตัวอย่าง				
	(Collagen Type I)	ไม่ใช้ เอนไซม์	ใช้ เอนไซม์	นภา (2542)	Taylor และ คณะ 1992
แอสปาทิก (Asp)	4.60	4.23	4.22	3.90	5.10
ซีรีน (Ser)	3.10	1.55	1.90	2.81	4.10
กลูตามิก (Glu)	7.50	8.18	8.67	7.72	7.70
ไกลซีน (Gly)	32.7	22.07	22.96	23.20	33.00
ฮิสติดีน (His)	0.50	0	1.07 ¹	0	0.90
อาร์จินีน (Arg)	5.20	9.81	10.92	6.85	4.80
ธรีโอนีน (Thr)	1.60	0	1.261 ¹	1.55	2.10
อลานีน (Ala)	11.40	7.43	8.15	8.87	8.40
โพรลีน (Pro)	13.00	10.50	11.48	13.80	12.50
ซิสทีน (Cys)	0	0.04 ²	0.022 ²	0	0
ไทโรซีน (Tyr)	0.40	0.27	0.33	0	0.10
วาลีน (Val)	2.30	1.81	1.97	1.51	0.10
เมไทโอนีน (Met)	0.60	0.70	0.85	0.63	0.20
ไลซีน (Lys)	2.80	2.56	2.63	3.02	2.70
ไอโซลูซีน (Ile)	1.20	1.37	1.35	1.06	1.40
ลูซีน (Leu)	2.50	2.25	2.35	2.45	2.60
ฟีนิลอลานีน (Phe)	1.30	1.86	1.40	2.13	1.30
ทริปโตเฟน (Try)	8.60	0.01	0.02	0	10

¹วิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือคณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล,

²วิเคราะห์ที่บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหารจำกัด

วิเคราะห์ที่ฝ่ายเครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.8 การผลิตอาหารปลาและการทดลองเลี้ยงปลาดุกลูกผสม

หลังเลี้ยงปลาดุกลูกผสมด้วยอาหาร 4 สูตร ได้แก่สูตรที่ 1, 2, 3 และ 4 ซึ่งมีส่วนผสมของโปรตีนผงแห้งที่ใช้แทนปลาป่นในอาหารต่างกัน 4 ระดับ คือร้อยละ 0, 25, 50 และ 75 ตามลำดับเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เพื่อศึกษาอิทธิพลของอาหารต่ออัตราการเจริญเติบโต อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตรารอด และอัตราแลกเนื้อผลการทดลองปรากฏดังนี้

ผลการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1, 2, 3 และ 4 ซึ่งรายงานผลการศึกษาในรูปของน้ำหนักเพิ่ม (กรัม) ดังแสดงในตารางที่ 19 และรูปที่ 16a และ 16b ส่วนอัตรา

การเจริญเติบโตจำเพาะเป็นร้อยละต่อวัน แสดงในตารางที่ 20 และรูปที่ 17a และ 17b ซึ่งสามารถอธิบายผลการทดลองได้ดังนี้

น้ำหนักเพิ่ม (กรัม)

ในสัปดาห์ที่ 4 ปลาทดลองที่ได้รับอาหารแต่ละสูตรมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น (กรัม) 22.83, 27.07, 24.49 และ 26.53 ตามลำดับ ซึ่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม) ของปลาที่ได้รับแต่ละสูตรไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$)

ในสัปดาห์ที่ 8 ซึ่งเป็นสัปดาห์สุดท้ายของการทดลอง จะเห็นว่าปลาทดลองที่ได้รับอาหารสูตรที่ 4 มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น (กรัม) ต่ำที่สุดเท่ากับ 70.83 ส่วนปลาทดลองที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น (กรัม) สูงที่สุด คือ 84.16 รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 และ 3 มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น (กรัม) เท่ากับ 82.34 และ 77.28 ตามลำดับ ซึ่งน้ำหนักเพิ่มขึ้น (กรัม) ของปลาทดลองที่ได้รับอาหารทั้ง 4 สูตรไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$) จากรูปที่ 15b พบว่าค่า R^2 ของผลการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 มีค่าเท่ากับ 0.94 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 มาก แสดงว่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลาทดลองมีแนวโน้มลดลงเมื่อได้รับสูตรอาหารที่มีระดับโปรตีนผงแห้งที่ใช้แทนปลาป่นเพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเป็นร้อยละต่อวัน

ในสัปดาห์ที่ 8 ซึ่งเป็นสัปดาห์สุดท้ายของการทดลอง จะเห็นว่าปลาทดลองที่ได้รับอาหารสูตรที่ 4 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ร้อยละต่อวัน) ต่ำที่สุดเท่ากับ 2.94 ส่วนปลาทดลองที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุด คือ 3.33 รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 และ 3 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 3.25 และ 3.19 ตามลำดับ ซึ่งอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ร้อยละต่อวัน) ของปลาทดลองที่ได้รับอาหารทั้ง 4 สูตรไม่มีความแตกต่างกัน และจากรูปที่ 16 b พบว่าค่า R^2 ของผลการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 มีค่าเท่ากับ 0.89 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 มาก แสดงว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเป็นร้อยละต่อวันของปลาทดลองมีแนวโน้มลดลงเมื่อได้รับสูตรอาหารที่มีระดับโปรตีนผงแห้งที่ใช้แทนปลาป่นเพิ่มขึ้น

อัตราการรอด

อัตราการรอดของปลาทดลองที่ได้รับอาหารสูตรต่างๆ ทั้ง 4 สูตร เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า อัตราการรอดคิดเป็นร้อยละ 100, 99.5, 100 และ 98.25 ตามลำดับ ซึ่งอัตราการรอดของปลาในทุก กลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 19

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ

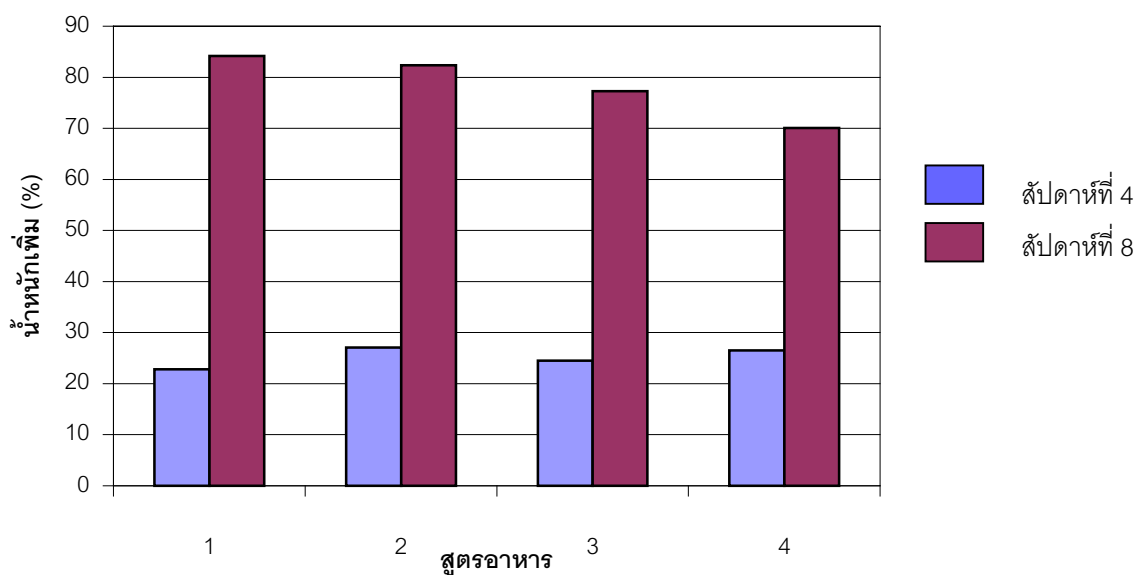
ปลาทดลองที่ได้อาหารสูตรที่ 1, 2, 3 และ 4 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า ปลาทดลองที่ได้รับอาหารสูตรที่ 4 มีอัตราแลกเนื้อสูงที่สุด คือ 1.37 รองลงมาได้แก่ปลาทดลองที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1, 2 และ 3 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.03, 1.12 และ 1.15 ตามลำดับ อัตราการแลกเนื้อของปลาทดลองที่ได้รับอาหารทั้ง 4 สูตรไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม) ตลอดการทดลองที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนผงแห้งแตกต่างกัน

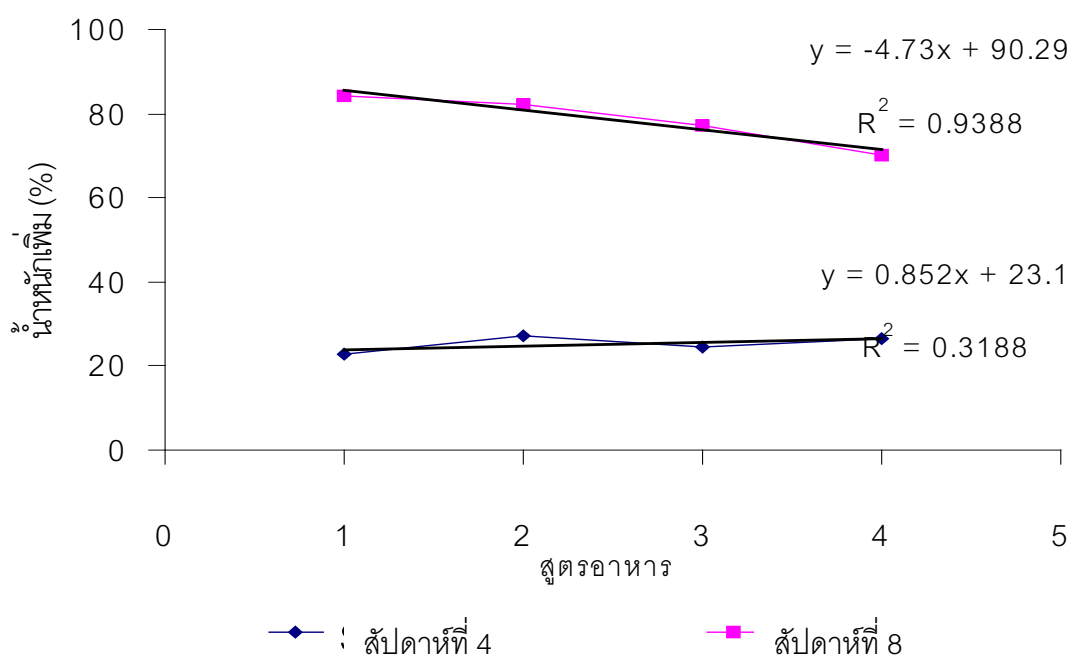
สัปดาห์ที่	อาหารสูตรที่			
	1	2	3	4
4	22.83 $\pm$ 5.78 (a)	27.07 $\pm$ 2.75 (a)	24.49 $\pm$ 4.51 (a)	26.53 $\pm$ 2.64 (a)
8	84.16 $\pm$ 8.05 (a)	82.34 $\pm$ 7.26 (a)	77.28 $\pm$ 10.78 (a)	70.08 $\pm$ 15.41 (a)

$\pm$ = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a = ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)



รูปที่ 16 a แสดงน้ำหนักเพิ่ม (กรัม) ของปลาทดลองที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนผงแห้งแตกต่างกัน



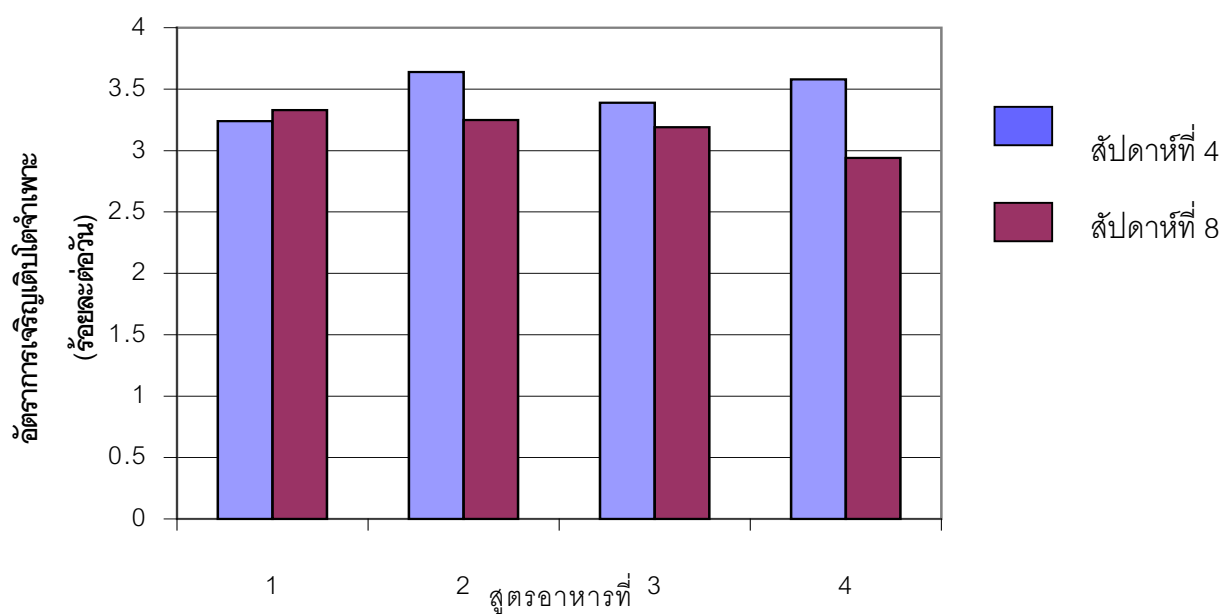
รูปที่ 16 b แสดงน้ำหนักเพิ่ม (กรัม) ของปลาทดลองที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนผงแห้งแตกต่างกัน

ตารางที่ 20 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ร้อยละต่อวัน) ของปลาที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนผงแห้งแตกต่างกัน

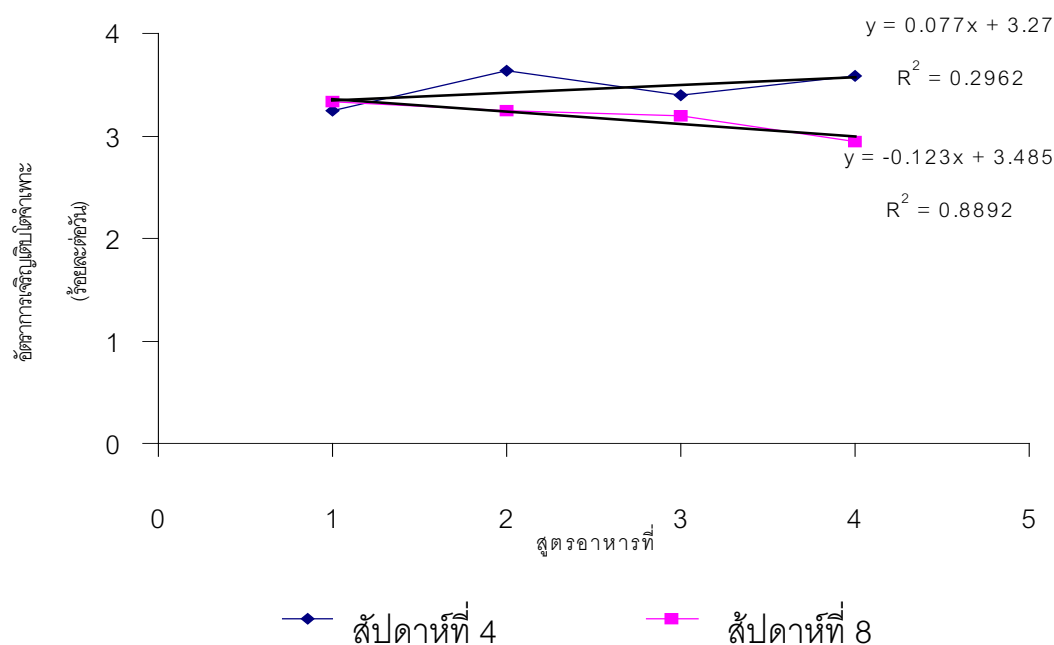
สัปดาห์ที่	อาหารสูตรที่			
	1	2	3	4
4	3.24 ± 0.54 (a)	3.64 ± 0.23 (a)	3.39 ± 0.41 (a)	3.58 ± 0.37 (a)
8	3.33 ± 0.15 (a)	3.25 ± 0.14 (a)	3.19 ± 0.21 (a)	2.94 ± 0.37 (a)

$\pm$ = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a = ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)



รูปที่ 17 a แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ร้อยละต่อวัน) ของปลาที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนผงแห้งแตกต่างกัน



รูปที่ 17 b แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ร้อยละต่อวัน) ของปลาที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนผงแห้งแตกต่างกัน

ตารางที่ 21 ผลของอิทธิพลอาหารต่ออัตราการรอด (SR) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) ของปลาทดลองที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนผงแห้งแตกต่างกัน

อิทธิพลของอาหาร	สัปดาห์ที่	อาหารสูตรที่			
		1	2	3	4
อัตราการรอด	4	100 ± 0 (a)	100 ± 0 (a)	100 ± 0 (a)	100 ± 0(a)
	8	100 ± 0 (a)	99.5 ± 1.00(a)	100 ± 0 (a)	98.25 ± 2.36 (a)
อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ	4	1.24 ± 0.34 (a)	1.03 ± 0.05 (a)	1.09 ± 0.11 (a)	1.07 ± 0.13 (a)
	8	1.03 ± 0.05 (a)	1.12 ± 0.05 (a)	1.15 ± 0.08 (a)	1.37 ± 0.30 (a)

± = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a = ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

การตรวจหาโครเมียมในตัวปลา

ปริมาณโครเมียมในเนื้อและเครื่องในของปลาทดลองมีการสะสมต่ำกว่า 1 ppm



รูปที่ 18 แสดงลักษณะของอาหารปลาที่ใช้ในการทดลอง



รูปที่ 19 สถานที่ที่ใช้ทดลอง



รูปที่ 20 ปลาดุกกลุ่มผสมในบ่อที่ใช้ทดลอง

5.8 ต้นทุนของการผลิตตามสเกล (ปริมาณอาหาร 3 ลิตร) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ตารางที่ 22 ต้นทุนของการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต

Cost Element	Cost in Fermenter (บาท)	
	คิดค่าไฟฟ้า	ไม่คิดค่าไฟฟ้า
อาหารเลี้ยงเชื้อ (บาท)	40	40
สารอนุโภคะ (บาท)	1,492.34	766.58
ค่าใช้จ่ายทั้งหมด (บาท)	1,532.34	806.58
Enzyme yield per batch 4,000 (Unit)		
Unit cost (U/บาท)	2.61 Unit/บาท	4.96 Unit/บาท

ต้นทุนการผลิตโปรตีนผงในระดับ flask 250 มิลลิลิตร

ค่าเอนไซม์			3.83 บาท
ค่าไฟฟ้า			65.03 บาท
ค่าสารเคมีและค่าน้ำ			1.96 บาท
รวม			70.82 บาท
ได้โปรตีน	1.115 g	ใช้ต้นทุน	70.82 บาท
โปรตีน	1 g	ใช้ต้นทุน	63.52 บาท
*โปรตีน	1 g	ใช้ต้นทุน	3.57 บาท (ไม่คิดค่าไฟฟ้า)

ต้นทุนการผลิตโปรตีนผงในหม้อ 20 ลิตร

ค่าเอนไซม์			1,532.57 บาท
ค่าไฟฟ้า			307.14 บาท
ค่าสารเคมีและค่าน้ำ			60.48 บาท
รวม			1,900.19 บาท
ได้โปรตีน	345.70 g	ใช้ต้นทุน	1,993.62 บาท
โปรตีน	1 g	ใช้ต้นทุน	5.68 บาท
*โปรตีน	1 g	ใช้ต้นทุน	2.51 บาท (ไม่คิดค่าไฟฟ้า)

ต้นทุนการผลิตโปรตีนผงในนมอ 130 ลิตร

ค่าเอนไซม์			12,260.54 บาท
ค่าไฟฟ้า			854.23 บาท
ค่าสารเคมีและค่าน้ำ			486.40 บาท
รวม			13,601.17 บาท
ได้โปรตีน	3,220.19 g	ใช้ต้นทุน	14,348.76 บาท
โปรตีน	1 g	ใช้ต้นทุน	4.22 บาท
*โปรตีน	1 g	ใช้ต้นทุน	2.15 บาท (ไม่คิดค่าไฟฟ้า)

บทที่ 6

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ความชื้นในเศษหนังตัวอย่างเป็นปัจจัยสำคัญในการแปรผันปริมาณการใช้เกลืออัลคาไลน์-เอิร์ทและปริมาณการใช้เอนไซม์ โดยเศษหนังที่เพิ่งออกจากเครื่องชุบบางใหม่จะมีความชื้นสูงกว่าร้อยละ 50 และความชื้นจะลดลงเมื่อทิ้งไว้ในอากาศ (open air) ดังนั้นควรเก็บเศษหนังไว้ในภาชนะปิดที่สามารถรักษาความชื้นไว้ได้ เช่น กล่องพลาสติกแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น แต่ไม่ควรเก็บเศษหนังโดยการอบแห้ง เพราะจะทำให้ต้องเสียเวลาแช่เศษหนัง และต้องเพิ่มเวลาในการย่อยเศษหนังในสารละลายต่าง เศษหนังที่ใช้ในการวิจัยนี้มีความชื้นประมาณร้อยละ 51 และมี pH อยู่ประมาณ 3.26

เศษหนังที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็น chrome shavings ที่มีลักษณะเป็นแถบยาว มีขนาดแตกต่างกันซึ่งจะทำให้มีพื้นที่ผิวที่จะทำปฏิกิริยากับสารเคมี และเอนไซม์ต่างกัน ดังนั้นจึงต้องลดความแปรปรวนนี้โดยการเพิ่มพื้นที่ผิวด้วยการตัดและบดสับเศษหนังให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดเท่าๆ กัน ก่อนนำมาใช้ แต่สำหรับ chrome shavings ที่มีลักษณะเหมือนมะพร้าวชุบ เป็นเม็ดเล็กๆ หรือ เศษหนังที่ได้จากขั้นตอนการขัดหนัง (buffing dust) จะไม่ต้องผ่านการบดสับ

เหตุผลในการเลือกใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ในการปรับ pH ของของผสม เนื่องจากแคลเซียมไฮดรอกไซด์ สามารถปรับ pH ได้ในช่วงกว้าง โดย pH จะแปรผันตามปริมาณการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ในขณะที่แมกนีเซียมออกไซด์ และแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ สามารถปรับ pH ได้อย่างจำกัด ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติเฉพาะตัวของสาร โดยแมกนีเซียมออกไซด์ และแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ จะสามารถปรับ pH สูงสุดประมาณ pH 9.5 แต่แคลเซียมไฮดรอกไซด์สามารถปรับ pH 10.5 ได้ และการที่ไม่ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ช่วยปรับ pH เพราะผลการวิจัยของ Taylor และคณะ (1994) แสดงให้เห็นว่าการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ แม้จะทำให้การย่อยสลายเกิดได้ดีขึ้น แต่กลับทำให้ผลิตภัณฑ์โปรตีนที่ได้มีปริมาณต่ำลงและมีโครเมียมอยู่ในโปรตีนไฮโดรไลเสตในปริมาณสูงขึ้น นอกจากนี้อะตอมของแคลเซียมยังเป็น cofactor ของเอนไซม์ และจะทำให้เอนไซม์เสถียรยิ่งขึ้น (เกษม พงษ์มณี, 2536) ในการใช้เกลืออัลคาไลน์-เอิร์ทต่างชนิดกัน จะทำให้ได้เกลือซัลเฟตต่างชนิดกันเกิดขึ้น ซึ่งเกลือแต่ละชนิดจะมีค่าการละลาย (solubility) ต่างกัน เกลือแคลเซียมซัลเฟต มีค่าการละลาย 0.21 กรัมต่อน้ำ 100 กรัม ที่อุณหภูมิ 20 °C ในขณะที่แมกนีเซียมซัลเฟต มีค่าการละลาย 33 กรัมต่อน้ำ 100 กรัม ดังนั้นเป็นไปได้ว่าการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์น่าจะทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีปริมาณต่ำลงกว่า ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีกว่า

ปฏิกิริยาการย่อยสลายเศษหนัง ในสถานะที่ใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ในการละลาย โปรตีนและการปรับ pH จะสามารถย่อยได้ดีกว่า การใช้แมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ หรือ แมกนีเซียมออกไซด์ เปรียบเทียบปริมาณ chrome cake จะเหลือน้อยที่สุดเมื่อใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์

แคลเซียมไฮดรอกไซด์ มีราคาถูกกว่าแมกนีเซียมไฮดรอกไซด์ และ แมกนีเซียมออกไซด์ รวมทั้งในกระบวนการฟอกหนังมีการใช้น้ำปูนขาวอยู่แล้ว ดังนั้นการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์จะไม่เป็นการเพิ่มต้นทุนให้กับโรงงานฟอกหนังอีก หากโรงงานขนาดเล็กจะทำการบำบัดเศษหนังเอง ก็สามารถทำได้เอง

แอลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เป็นเอนไซม์ที่มีช่วงการทำงานใน pH ที่เป็นด่าง สามารถย่อยสลายโปรตีนในหนังสัตว์ และเนื่องจากคุณสมบัติของโปรตีนที่สามารถละลายได้ดีในสารละลายด่าง แต่โครเมียมจะละลายได้ที่ pH ต่ำ ๆ หรือในสารละลายกรด แต่จะไม่ละลายหรือละลายได้น้อยที่ pH ที่เป็นด่าง ประมาณ pH 8.5 โดยแอลคาไลน์โปรติเอสจะสามารถย่อยเศษหนังและละลายโปรตีน ในขณะเดียวกันโครเมียมจากเศษหนัง จะตกตะกอนในสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ได้ตะกอนโครเมียมไฮดรอกไซด์ ($\text{Cr}(\text{OH})_3$) ซึ่งจะสามารถละลายกลับมาสู่สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตได้อีก

งานวิจัยของ นภา ศิวรังสรรค์ (2542) มีการใช้น้ำมากถึง 20 เท่า (w/v) เนื่องจากเศษหนังที่ใช้ได้ผ่านขั้นตอนการบดสับทำให้เศษหนังมีลักษณะฟู เบา และดูดซับน้ำได้ดี หากใช้น้ำปริมาณน้อย จะไปลดการละลายของเกลืออัลคาไลน์-เอิร์ท และเอนไซม์ที่ใช้ แต่การใช้น้ำปริมาณมากทำให้ต้องใช้เวลา และพลังงานในการทำให้โปรตีนเป็นผงแห้งมากยิ่งขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้มีการใช้น้ำลดลงเหลือ 15 เท่า (w/v) เพื่อลดปริมาณน้ำที่ใช้, เวลา และพลังงานในการทำให้โปรตีนเป็นผงแห้ง รวมทั้งมีการเปลี่ยนชนิดของน้ำที่ใช้จากน้ำกลั่นเป็นน้ำประปา ซึ่งนอกจากจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการผลิตน้ำกลั่นแล้ว ผลการทดลองที่ได้พบว่าการใช้น้ำประปาในการต้มจะเหลือ chrome cake น้อยกว่า การทดลองที่ใช้น้ำกลั่นด้วย

โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนัง ด้วยแอลคาไลน์โปรติเอส 10 unit ต่อหนัง 2.5 กรัม (w/w) เมื่อต้มในหม้อต้ม 130 ลิตร จะได้ผลผลิตโปรตีนผงโดยเฉลี่ย 40.25% มีปริมาณไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบโดยเฉลี่ย 14.13 % มีปริมาณโปรตีนประมาณ 88% สูงกว่าโปรตีนจากพืชทุกชนิด และสูงกว่าโปรตีนจากปลาป่น (55-66%) เนื้อและกระดูกป่น (55-60 %) (ทวี แก้วคง, 2527) อาหารโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังไม่เพียงแต่มีปริมาณโปรตีนสูง แต่ยังมีกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของคอลลาเจน ชนิด I อย่างครบถ้วน และเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับสัตว์อยู่ถึง 10 ชนิด คือ ฮิสติดีน ลูซีน ไอโซลูซีน อาร์จินีน ไลซีน เมทไธโอนีน ทรีโอนีน เบนิลอะลานีน ทริปโตเฟน และแวลีน เปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Taylor (1992)

ในงานวิจัยนี้ นำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังมาเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารเลี้ยงปลาตุ๊กตาส้มโดยใช้แทนที่ปลาป่นในระดับต่างๆ เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังเพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ประเภทอื่นต่อไป จากผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าปลาตุ๊กตาส้มที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปรตีนไฮโดรไลเสตเป็นส่วนผสมโดยแบ่งอาหารเป็น 4 สูตร คือ สูตรอาหารที่ 1 เป็นอาหารที่ไม่ใส่โปรตีนไฮโดรไลเสตในอาหารทดลอง (สูตรควบคุม) , สูตรอาหารที่ 2 แทนที่ปลาป่นในอาหารทดลองด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตอัตราร้อยละ 25 , สูตรอาหารที่ 3 แทนที่ปลาป่นในอาหารทดลองด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตอัตราร้อยละ 50 และสูตรอาหารที่ 4 แทนที่ปลาป่นในอาหารทดลองด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตอัตราร้อยละ 75 นั้นเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ปลาตุ๊กตาสมน้ำหนักตัวเฉลี่ย 40 กรัมที่เลี้ยงโดยอาหารสูตรควบคุมนั้นจะมีค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (%) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ร้อยละต่อวัน) สูงที่สุด ตามด้วยสูตรที่ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ อัตราการรอดของปลาตุ๊กตาส้มที่เลี้ยงด้วยอาหารทั้ง 4 สูตร มีอัตราการรอดสูงมากคือสูงกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ โดยปลาตุ๊กตาส้มที่เลี้ยงอาหารสูตรที่ 4 มีอัตราการรอดต่ำสุด ส่วนอัตราแลกเนื้อนั้นปลาตุ๊กตาส้มที่เลี้ยงอาหารสูตรที่ 4 มีอัตราการแลกเนื้อสูงสุด รองมาคือสูตรที่ 3, 2 และ 1 ตามลำดับ ดังนั้นสรุปได้ว่าอาหารสูตรควบคุมใช้เลี้ยงปลาตุ๊กตาส้มได้ดีที่สุด รองมาคือ สูตรที่ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ ผลที่เกิดขึ้นน่าจะเป็นผลมาจาก คุณภาพโปรตีนในอาหารแต่ละสูตร ซึ่งวัดโดยองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็นเนื่องจากการทดลองครั้งนี้ใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังทดแทนปลาป่นในปริมาณที่สูงตั้งแต่ 25-75% ทำให้ความสมดุลของกรดอะมิโนในอาหารเปลี่ยนแปลงไปมาก ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณกรดอะมิโนที่มีอยู่ในอาหารไม่อยู่ในสัดส่วนที่ตรงกับความต้องการของปลาตุ๊กตาส้มหรือมีอยู่ในปริมาณที่ไม่เพียงพอ จึงทำให้ปลาตุ๊กตาส้มที่ใช้ในการทดลองมีการเจริญเติบโตลดลงเมื่อใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตทดแทนปลาป่นในอาหารมากขึ้น แต่ถ้าดูจากค่าความแตกต่างทางสถิติพบว่าค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น(%), อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ(ร้อยละต่อวัน), อัตราการรอด และอัตราแลกเนื้อ ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ดังนั้นระดับโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ใช้แทนที่ในอาหารปลาตุ๊กตาส้มควรอยู่ในช่วง 25-50 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก และเมื่อนำปลาตุ๊กตาส้มที่ทดลองมาหาการสะสมของโครโมเมียมพบว่าการสะสมของโครโมเมียมในเนื้อเยื่อและเครื่องในต่ำกว่า 1 ppm แสดงว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังสามารถใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์อย่างปลอดภัย

การทดลองโดยการนำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังเพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารปลานั้นมีน้อยมาก พบเพียงการทดลองของ Nogami และคณะ (2000) ได้ทำการทดลองใช้โปรตีนจากเศษหนังฟอกโครมที่มีโครโมเมียมเป็นส่วนประกอบในอาหารทดลองเลี้ยงปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เพื่อดูการสะสมและผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโตของปลา โดยวัด

จากขนาด, น้ำหนัก, และการสะสมโครเมียมในร่างกายเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยมีระยะเวลาในการเลี้ยง 16 เดือน ซึ่งผลการทดลองนั้นสามารถสังเกตความแตกต่างของขนาดและน้ำหนักของปลาที่เลี้ยงในอาหารทดลองและชุดควบคุมได้อย่างเด่นชัดเมื่อเวลาผ่านไป 16 เดือน และไม่พบความเป็นพิษหรือการตายของปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง โดยโครเมียมจะมีการสะสมมากที่สุดในส่วนไส้ของปลา ขณะที่ในประเทศไทยยังไม่พบรายงานที่มีการนำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังด้วยเอนไซม์เพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารปลาเลย

การวิจัยครั้งนี้มีอุปสรรคที่สำคัญคือ การผลิตเอนไซม์ให้เพียงพอต่อการทดลองในหม้อต้มขนาด 130 ลิตร เนื่องจากการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ทดลองอยู่ในระดับห้องปฏิบัติการ ทำให้เสียค่าใช้จ่ายในการผลิตเอนไซม์สูงรวมทั้งเสียเวลาในการผลิตเอนไซม์มาก อาจแก้ไขด้วยการขยายขนาดการผลิตเอนไซม์ในถังหมักขนาด 100 ลิตร เพื่อผลิตเอนไซม์ได้มากพอต่อการใช้ในระดับอุตสาหกรรม เป็นการประหยัดทั้งเวลาและอาจช่วยลดต้นทุนของการผลิตเอนไซม์ หรืออาจเปลี่ยนไปใช้เอนไซม์ทางการค้า ซึ่งเอนไซม์ที่นิยมใช้ในการทดลองเกี่ยวกับการผลิตโปรตีนจากเศษหนังฟอกโครมนิยมใช้ คือ ALKALASE™ นั้นถ้าเราจะใช้ ALKALASE™ อาจติดปัญหาสิทธิบัตรของ Taylor ได้ ดังนั้นควรเลือกเอนไซม์ทางการค้าที่มีความสามารถทำงานได้ใน pH ที่ 10.5 เพื่อการผลิตโปรตีนที่มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับการใช้แอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 จากงานวิจัยของ Taylor และคณะ (1997) พบว่าถ้าไม่ใช้เอนไซม์ในกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจะทำให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนที่ได้มีปริมาณต่ำกว่า, ปริมาณโครเมียมได้สูงกว่าและโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนต่ำกว่าการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ใช้เอนไซม์

สรุปผลการทดลอง

1. แอลคาไลน์โปรตีนเอสที่ผลิตได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70% แล้วทำ dialyzed กำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตบางส่วน เมื่อนำไปทำให้เป็นผงโดยวิธี lyophilization จะได้แอลคาไลน์โปรตีนผง 3.5 กรัมต่อน้ำหนัก 3 ลิตร มีแอกติวิตีจำเพาะ 23.74 ยูนิตต่อ มิลลิกรัมโปรตีน
2. ชนิดและปริมาณเกลือแอลคาไลน์-เอิร์ท ที่เหมาะสมในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ของ เซษแห้งเพื่อการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ คือการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ 6.5% โดยน้ำหนัก ของเซษแห้งในการปรับ pH เป็น 10.5
3. สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเซษแห้งด้วยแอลคาไลน์โปรตีนเอส คือ การใช้แคลเซียม ไฮดรอกไซด์ในการปรับ pH เป็น 10.5 เวลาที่เหมาะสมในการย่อยคือ 3 ชั่วโมงและที่อุณหภูมิ 45 °C ปริมาณแอกติวิตีแอลคาไลน์โปรตีนเอสที่ใช้ คือ 10 ยูนิตต่อน้ำหนักแห้ง 2.5 กรัม
4. เวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายเซษแห้งด้วยเอนไซม์คือ 3 ชั่วโมง
5. น้ำที่เหมาะสมในการทดลองคือน้ำประปา ปริมาณ 15 เท่าต่อน้ำหนักแห้ง
6. โปรตีนไฮโดรไลเสตผงแห้งที่ได้จากการทดลองใน flask 250 มิลลิลิตร ประกอบไปด้วย ไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) 14.95 % ปริมาณไขมัน 0.728 % ปริมาณเถ้า 17.14 % ปริมาณ แคลเซียม 552.7 ppm และปริมาณโครเมียม 7 ppm เปอร์เซนต์ ผลผลิตของโปรตีนไฮโดรไล เสตผงแห้งที่ได้เท่ากับ 44.6 %
7. โปรตีนไฮโดรไลเสตผงแห้งที่ได้จากการทดลองในหม้อต้มขนาด 20 ลิตร ประกอบไปด้วย ไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) 14.89 % ปริมาณไขมัน 2.26 % ปริมาณเถ้า 16.05 % ปริมาณ เส้นใย 0.03 % ปริมาณแคลเซียม 703.40 ppm ปริมาณฟอสฟอรัส 0.01 ppm ปริมาณ โครเมียม 15 ppm และเปอร์เซนต์ผลผลิตของโปรตีนไฮโดรไลเสตผงแห้งที่ได้เท่ากับ 34.57 %
8. โปรตีนไฮโดรไลเสตผงแห้งที่ได้จากการทดลองในหม้อต้มขนาด 130 ลิตร ประกอบไปด้วย ไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) 14.19 % ปริมาณไขมัน 1.99 % ปริมาณเถ้า 20.43 % ปริมาณ เส้นใย 0.10 % ปริมาณแคลเซียม 1145.7 ppm ปริมาณฟอสฟอรัส 0.04 ppm ปริมาณ โครเมียม 14 ppm และเปอร์เซนต์ผลผลิตของโปรตีนไฮโดรไลเสตผงแห้งที่ได้เท่ากับ 40.29 %
9. ต้นทุนการผลิตโปรตีนผงโดยคิดค่าไฟฟ้าในระดับ flask 250 มิลลิลิตร, หม้อต้ม 20 และ 130 ลิตรเท่ากับ 63.52, 5.68 และ 4.22 บาท/กรัม ตามลำดับ แต่ต้นทุนที่ไม่คิดค่าไฟฟ้าจะเท่ากับ 3.57, 2.51 และ 2.15 บาท/กรัม ตามลำดับ
10. ไม่พบเชื้อที่ทำให้เกิดโรคปากและเท้าเปื่อย, แอนแทรกซ์, และเชื้อ *Salmonella sp.*, *Shigella sp.* และ *E. coli* ในเซษแห้งฟอกโครมและโปรตีนผงแห้ง

11. เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเสตไปแทนที่ปลาป่นในอาหารปลาดุกกลุ่มผสมในระดับ 0%, 25%, 50% และ 70% (w/w) พบว่าการนำอาหาร 4 สูตรนี้ไปเลี้ยงปลาดุกกลุ่มผสมขนาดเริ่มต้น 40 กรัม ไม่มีผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) คือ น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ร้อยละต่อวัน) อัตราการรอด และอัตราแลกเนื้อ โดยระดับโปรตีนที่เหมาะสมในการแทนที่ปลาป่นอยู่ในช่วง 25-50 % (w/w)

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เกษม พงษ์มณี. 2536. การผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส โดย *B. subtilis* TISTR 25 .

วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

จู่อะดี พงศ์มณีรัตน์, มะลิ บุญยรัตผลิน, ชุติศักดิ์ บริสุทธิ์ และสุจินต์ บุญช่วย. 2539. องค์ประกอบทาง
เคมีของปลาป่นไทย. เอกสารวิชาการฉบับที่ 10. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง : สงขลา

เจลิยว บุญมัน. 2536. การใช้มูลไก่แห้งเป็นแหล่งทดแทนโปรตีนและพลังงานบางส่วนใน
อาหารปลาดุกลูกผสม. ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การประมง บัณฑิต-
วิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดวงหทัย สาทรานุวัฒน์. 2539. การใช้ Alkaline protease จากเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 ในการ
ผลิตยางพาราแผ่น. Senoir Project ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะ
วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ทวี แก้วคง. 2527. โภชนศาสตร์สัตว์เบื้องต้นและการให้อาหารสัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 2

กรุงเทพมหานคร: กรุงเทพมหานครพิมพ์.

นภา ศิวรังสรรค์. 2542. การสกัดโครเมียมจากเศษหนังโครมโดยวิธีการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพื่อ
การนำโปรตีนกลับมาใช้ประโยชน์. รายงานผลการวิจัย. ทุนวิจัยกองทุนรัชดาภิเษกสมโภชน์.

บัญญัติ ศิริธนาวงศ์. 2532. อัตราการเจริญเติบโตของปลาดุกที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมที่มีอัตรา
ส่วนโปรตีนต่อพลังงานต่างกัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปกรณ จิโรจน์กุลกิจ. 2532. การแยกให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของอัลคาไลน์โปรติเอสจาก
เชื้อ *B. subtilis* TISTR 25. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี บัณฑิต-
วิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

พรพนศรี จริโมภาส และสุจินต์ หนูขวัญ. 2535. ผลผลิตการเลี้ยงปลาดุกอุยเทศในบ่อคอนกรีต
ด้วยอัตราการเลี้ยงต่างกัน. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 14 น.

ไพรัตน์ กอสุธารักษ์. 2542. การใช้หัวไก่หมักเป็นอาหารสำหรับปลาดุกลูกผสม. กองควบคุมและ
พัฒนาอาหารสัตว์น้ำ, กรมประมง. กรุงเทพฯ. 13 น.

มานพ ตั้งตรงไพโรจน์, สุจินต์ หนูขวัญ, ปกรณ์ ชุ่มประเสริฐ และกำชัย สารวัลย์วุฒิ. 2533.

การเพาะเลี้ยงปลาอุกบักโดยวิธีผสมเทียม. เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เรื่อง บักอุกปลาเศรษฐกิจใหม่. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 12 น.

วิทย์ ธารชลาณกิจ, เวียง เชื้อโพธิ์หัก, ประวิทย์ สุรนิรมารท และอุทัยรัตน์ ณ นคร. 2525. การเพาะเลี้ยงปลาอุกอุย. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 29 น.

วิมล จันทโรทัย. 2538. การประเมินค่าโปรตีนในอาหารปลาอุกกลุ่มผสมที่ระดับให้ผลตอบแทนทางเศรษฐศาสตร์สูงสุด. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) ปีที่ 29: 38-44.

วิมล จันทโรทัย, ประเสริฐ สีตะสิทธิ์ และ อมรรัตน์ ณ นคร. 2538. การศึกษาระดับโปรตีนที่ทำให้ปลาอุกกลุ่มผสมเจริญเติบโตและใช้ประโยชน์จากอาหารสูงสุด. เอกสารวิชาการฉบับที่ 164. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด : กรุงเทพมหานคร.

วิมล จันทโรทัย, ทวี วิบุตธานุมาศ และ พิศมัย สมสืบ. 2539. การทดแทนปลาป่นบางส่วนด้วยโปรตีนข้าวโพดช่วยเร่งการเจริญเติบโตและปรับสีผิวและเนื้อของปลาอุกกลุ่มผสม. เอกสารวิชาการฉบับที่ 178. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด : กรุงเทพมหานคร.

วิมล จันทโรทัย, ประเสริฐ สีตะสิทธิ์ และทัศนีย์ ภูพิพัฒน์. 2539. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของปลาอุกกลุ่มผสมที่ผลิตโดยอ้างอิงข้อมูลความต้องการสารอาหารกับอาหารสำเร็จรูปจากโรงงาน. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 179. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด : กรุงเทพมหานคร.

วิมล จันทโรทัย และ วิมล ตี๋พานิช. 2541. ผลของใยอาหารและระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของปลาอุกกลุ่มผสม. ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.) ปีที่ 32 : 13-23.

ศรีสกุล วรจันทรา และรณชัย สิทธิไกรพงษ์. 2539. โภชนศาสตร์สัตว์. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

สุรวงศ์ วงษ์ศิริ. 2536. การสกัดแทนนินจากเปลือกเงาะ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต ภาควิชาเคมีเทคนิค คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

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

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2533. การเจริญพัฒนาของไข่ปลาอุกและปัญหาพ่อแม่พันธุ์. เอกสารประกอบการบรรยายในการประชุม A/C.C. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ, บางเขน, กรุงเทพฯ. 1-9.

ภาษาอังกฤษ

- Alves Dos Reis, M. and Beleza, V. 1997. Utilization of leather waste-animal feed stuff from chrome shaving : part 1, pilot plant study. Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists. 75: 15-19.
- ASTM. 1993 Annual Book of ASTM Standards, section 15 , vol. 15.04. American Society for Testing and Material. Philadelphia.
- Bollag, D.M. and Edelstein, S.J. .1991. Protein methods. New York : Wiley-Liss.
- Cot, J; Manich, A.M. and Aramon, C. .1991. Design of a pilot plant for complete processing of by-product of the tanning industry : Preparation of a collagenic material with “zero” chrome content. Journal of the American Leather Chemistry Association. 86 :141-156.
- Boon, J.H., R.W.A. Oorschor, A.M. Hengen and J.H. Vandoesum. 1987. Ruptured intestine syndrome of unknown etiology in young Afarican catfish, *Clarias gariepinus* (Buurchell), and its relation to the feeding level. Aquaculture. 63: 283-300.
- Brown, E.M., Thompson, C.J. and Taylor, M.M. 1994. Molecular size and conformation of protein recovered from chrome shavings. Journal of the American Leather Chemistry Association. 89 : 215-220.
- Brown, E.M., Taylor, M.M. and Marmer, W.N. 1996. Production and potential uses of co-products from solid tannery waste. Journal of the American Leather Chemistry Association. 91 : 270-276.
- Cabeza, L.F., Taylor, M.M., Dimaio, G.L. Dimaio., Brown, E.M. and Marmer, W.N.1998. Processing of leather waste: pilot scale studies on chrome shavings. Isolation of potentially valuable protein products and chromium. Waste Management. 18 : 211-218.
- Cabeza, L.F., Mcaloon, A.J., Yee, W.C., Taylor, M.M., Brown, E.M. and Marmer, W.N. . 1998. Process simulation and cost estimation of treatment of chromium-containing leather waste. Journal of the American Leather Chemistry Association. 93 : 83-98.

- Cabeza, L.F., Taylor, M.M., Dimaio, G.L., Brown, E.M. and Marmer, W.N. 1998. Processing of leather waste: pilot scale studies on chrome shavings. Part II. Purification of chrome cake and tanning trials. Journal of the American Leather Chemistry Association. 93 : 299-315.
- Cabeza, L.F., Taylor, M.M., Brown, E.M. and Marmer, W.N. 1999. Potential application for gelatin isolated from chromium-containing solid tannery waste: microencapsulation. Journal of the American Leather Chemistry Association. 94 :182-189
- Cantera, C.S., Giuste, M.D. and Sofia, A. 1997. Hydrolysis of chrome shavings : application of collagen hydrolysate and “acrylic-protein” in post tanning operations. Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists, 81: 183-191.
- Claudia C. Kimura, Edivaldo E. Garcia, Ariovaldo C. Martins and Jorge Nozaki. 1999. Chemical and enzymatic hydrolysis of chrome shavings. Anales De La Asociacion Quimica Argentina. Vol. 87. No. 3/4. 97-103.
- Degani, G., Ben-zvi, Y. and Levanon, D. 1989. The effect of different protein levels and temperature on feed utilization, growth and body composition of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). Aquaculture. 76 : 293-301.
- Eilers, E. and Sander, A. 1997. Process for the production of low-chromium protein hydrolyzates. U.S. Patent 5,602,002 Feb 11, 1997.
- Eurica M. Nogami, Claudia C.M. Kimura, Andrea R. Malagutti, Dirceu Galli, Tania J. Castilho, Claudenice Rodrigues and Jorge Nozaki. 2000. Recovery of protein from chrome shavings and application as a food supplement for Tilapia *Oreochromis Niloticus*. Jalca. Vol. 95. 119-124.
- Garcia, E.E., Kimura, C.C. Martins, A.C., Rocha, G.O. and Nozaki, J. 1999. Chromatographic characterization of products isolated from chrome shavings. Brazilian Archives of Biology and Technology. 42 : 281-289.
- Halver, J.E. 1989. Fish Nutrition. Academic Press, INC., San Diego, California, U.S.A. 798 p.
- Heidemann, E. 1991. Disposal and recycling of chrome-tanned materials. Journal of the American Leather Chemistry Association. 86 : 331-333.

- Helrich, K. .1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. vol 1. 15th ed . Virginia : Association of Official Analytical Chemists.
- Henrickson, R.L., Turgut, H. and Rao, B.R. 1984. Hide protein as a food additive. Journal of the American Leather Chemistry Association. 79 : 132-145
- Jantrarotai, W., Sitasit, P., Jantrarotai, P., Viputhanumas, T. and Srabua, P. 1996. Protein and energy level for maximum growth, diet utilization, yield of edible flesh, and protein sparing of hybrid *Clarias Catfish* (*Clarias macrocephalus* x *Clarias gariepinus*). Technical Paper. No.177.
- Jauhari, R.Z. 1989. The effect of dietary and protein levels of practical diet on growth response of the hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*). Master Thesis, Asian Institute of Technology, Bangkok, Thailand.
- Jiang Tingda, Mo Dihua, Chen Yiwan and Zhang Chunping. 1992. Nutrition of feed collagen protein powder from the reclamation treatment of chrome leather scarp. Animal Feed Science and Technology. 37. 175-184.
- Kimura, C.C., Garcia, E.E. Martins, A.C. and Nozaki, J. 1999. Chemical and enzymatic hydrolysis of chrome shavings. Anales de la Asociacion Quimica Argentina. 87 : 97-103.
- Kolomaznik, K., Mladek, M., Langmaier, F., Janacova, D. and Taylor, M.M. 1999. Experience in industrial practice of enzymatic dechromation of chrome shavings. Journal of the American Leather Chemistry Association. 94 : 55-63.
- Kumaraguru, S., Sastry, T.P. and Rose, C. 1998 . Hydrolysis of tannery fleshings using pancreatic enzymes: a biotechnological tool for solid waste management. . Journal of the American Leather Chemistry Association. 93: 32-39.
- Lovell, T. 1989. Nutrition and Feeding of Fish. Auburn University, Van Nostrand Reinhold, New York. 259 p.
- Menden, E.E.; Rutland, F.H. and Kallenberge, W.E. .1994. Chromium leachability from blue shavings by the TCLP procedure. Journal of the American Leather Chemistry Association. 89 : 2-13.

- Montoneri, E., Rizzi, G., Rizzi, A, et. al. 1994. Hydrolysis of tannery waste to protein meal for animal feedstuffs: a process and product evaluation. Journal of Chemistry and Technology Biotechnology. 59 :91-99.
- Ng, Wing-Keong. and Wilson, R.P. 1997. Chromic oxide inclusion in the diet does not affect glucose utilization or chromium retention by channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Journal of Nutrition. 127: 2537-2362.
- Nogami, E.M., Kimura, C.M., Malagutti, A.R., et.al. 2000. Recovery of protein from chrome shavings and application as a food supplement for Tilapia *Oreochromis Niloticus*. Journal of the American Leather Chemistry Association. 95 : 119-124
- Piez, K.A. and Reddi, A.H.. 1984. Extracellular Matrix Biochemistry. New York : Elsevier.
- Raju, A.A., Chandrababu, N.K., Samivelu, N., Rose, C. and Rao, N.M. 1996. Eco-friendly enzymatic dehairing using extracellular proteases from a *bacillus* species isolate. Journal of the American Leather Chemistry Association. 91 : 115-119
- Reis, J.M., Reutebuch, E.M. and R.T. Lovell. 1989. Protein to energy ratios in production diets and growth, feed conversion and body composition of catfish, *Ictalurus punctatus*, Aquaculture. 77: 21-27.
- Robinson, E.H. and Li, M.H. 1995. Catfish nutrition Part I : Nutrition and Feeds. Aquaculture magazine. May/June.44-53.
- Rutland, F.H. 1991. Environmental compatibility of chromium-containing tannery and other leather product wastes at land disposal sites. Journal of the American Leather Chemistry Association. 86 : 364-373.
- Takeshi, W., S. Shushi and T. Toshio. 1988. Availability of minerals in fish meal to fish. Asian Fish. Science. 1: 175-195.
- Taylor, M.M.; Diefendorf, E.J. and Na, G.C. 1990. Enzymic treatment of chrome shavings. Journal of the American Leather Chemistry Association. 85 : 264-275.
- Taylor, M.M.; Diefendorf, E.J., Marmer, W.N. and Brown, E.M. . 1992. Enzymatic processing of materials containing chromium and protein. U.S. Patent 5,094,946 Mar 10, 1992.
- Taylor, M.M.; Diefendorf, E.J., Marmer, W.N. and Brown, E.M. 1992. Characterization of products isolated by enzyme treatment of chromium-containing leather waste. Journal of the American Leather Chemistry Association. 87 : 380-389.

- Taylor, M.M.; Diefendorf, E.J., Marmer, W.N. and Brown, E.M. . 1993a. Enzymatic processing of materials containing chromium and protein. U.S. Patent 5,271,912, December 21, 1993.
- Taylor, M.M.; Diefendorf, E.J., Thompson, C.J., Brown, E.M. and Marmer, W.N. 1993b. Effect of processing variables on ash content of gelable and hydrolyzed protein products isolated from treatment of chromium leather waste. Journal of the American Leather Chemistry Association. 88 : 358-367.
- Taylor, M.M.; Diefendorf, E.J., Marmer, W.N. and Brown, E.M. 1994. Effect of various alkalinity-inducing agents on chemical and physical properties of protein products isolated from chromium-containing leather waste. Journal of the American Leather Chemistry Association. 89 : 221-228.
- Taylor, M.M.; Diefendorf, E.J., Thompson, C.J., Brown, E.M., Marmer, W.N and Cabeza L.F. 1997. Extraction of value added byproducts from the treatment chromium containing collagenous leather industry waste. Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists, 81: 5-13
- Taylor M.M., Cabeza L.F, DiMaio G.L, et.al.1998. Processing of leather waste : Pilot-scale studies on chrome shavings. Part 1 . Isolation and characterization of protein products and separation of chrome cake. Journal of the American Leather Chemistry Association. 93: 61-82.
- Taylor M.M., Cabeza L.F., Marmer, W.N., Brown, E.M. and Kolomaznik, K. 1998. Function properties of hydrolysis products from collagen. Journal of the American Leather Chemistry Association. 93 : 40-50.
- Taylor M.M., Cabeza L.F., Brown, E.M. and Marmer, W.N. 1999. Chemical modification of protein products isolated from chromium-containing solid tannery waste and resultant influence on physical and functional properties. Journal of the American Leather Chemistry Association. 94 : 171-181.
- Tingda, J., Dihua, M., Yiwang, C. and Chunping, Zhang. 1992. Nutrition of feed collagen protein powder from the reclamation treatment of chrome leather scrap. Animal Feed Science and Technology. 37 : 175-184.
- Tingda, J., Chun-ping, Z. and Fei, Q. 2000. Reclamation treatment of the chrome leather scrap. Journal of Environmental Science. 12 : 375-379.

- Teugels, G.G. 1984. The nomenclature of African *Clarias* species used in aquaculture. Aquaculture 38 : 373-374.
- UNEP-IE/PAC (United Nations Environment Programme Industry and Environment Programme Activity Centre). 1994. Tanneries and the environment : A technical guide to reducing the environment impact of tannery operations. France : United Nations Publication.
- Watnabe, T. 1988. Fish Nutrition and Marineculture.Tokyo University, Tokyo,Japan. 233p.
- Wecharatana, M. 1995. Hazardous waste management in US. Military installation. Workshop on Recent Environmental Technologies and Hazardous Waste Management. July 26-27, 1995, Faculty of Science, Chulalongkorn University.
- Zhuang, Y. 1992. Profitability of protein recovery from leather shavings with high level chrome content. Seminar on the profitability of clean technology in the leather tanning industries, October 20-21, 1992. Samutprakarn : Bangpoo Country Club.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1 การเตรียมสารละลาย

1.1 สารละลายสำหรับหาแอลคาไลน์โปรติเอสแอกติวิตี

- สารละลายคาร์บอเนต – ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 10.5

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

- สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก 10 เปอร์เซนต์

ชั่งกรดไตรคลอโรอะซิติก 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในขวดสีชา เก็บในตู้เย็นก่อนนำไปใช้

- สารละลาย Azocasien 0.2 %

ละลาย Azocasien 1 กรัม ใน absolute ethanol 2 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร โทลูอีน 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

1.2 สารละลายสำหรับหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total Kjeldahl Nitrogen)

- น้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนียม

- ตัวเร่งปฏิกิริยาประกอบด้วยโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) ต่อกอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) อัตราส่วน 10:1

- กรดซัลฟูริกเข้มข้น (Conc. HSO_4)

- โซเดียมไฮดรอกไซด์ 32%

ชั่ง 320 กรัม โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ละลายในน้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนีย 1 ลิตร

- สารละลายกรดบอริก 2%

ชั่ง 20 กรัม กรดบอริก (H_3BO_3) แล้วละลายด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

- สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มัล

กรดซัลฟูริกปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร เทียบความเข้มข้นที่แน่นอนด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.1 นอร์มัล จำนวน 25 มิลลิลิตร โดยใช้เมทิลเรด (อินดิเคเตอร์) บอกจุดยุติ จากสีส้มเป็นสีชมพู

- สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.1 นอร์มัล

อบโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมงทำให้เย็นในโถทำแห้ง ซึ่ง Na_2CO_3 ที่อบแล้ว 5.299 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

- สารละลายอินดิเคเตอร์ผสมระหว่างบรอมครีซอลกรีนกับเมทิลเรด

ละลายเมทิลเรด (Methyl red) จำนวน 1 กรัม และเมทิลีนบลู (Methylene blue) จำนวน 0.5 กรัม ในเอทานอล 95% หรือไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ จำนวน 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.3 สารละลายสำหรับหาปริมาณโครมิกออกไซด์ โดยวิธีเปอร์คลอริกแอซิดออกซิเดชัน

- สารละลายโพแตสเซียมไอโอไดด์ 10 เปอร์เซ็นต์

ซึ่งโพแตสเซียมไอโอไดด์ 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

- สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮโอซัลเฟต 0.1 นอร์มัล

ซึ่งโซเดียมไฮโอซัลเฟต ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 24.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่นต้มแล้ว และเติมโซเดียมคาร์บอเนต 1 กรัมแล้วเจือจางให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร หาความเข้มข้นที่แน่นอนโดยเทียบมาตรฐานกับ Potassium dichromate ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) (ภาคผนวก ข)

- สารละลายกรดฟอสฟอริก 40 เปอร์เซ็นต์

ตวงกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 45 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น ปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

- สารละลายน้ำแป้ง 2 เปอร์เซ็นต์

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

1.4 สารละลายสำหรับหาปริมาณโครเมียม แคลเซียม และแมกนีเซียม

- สารละลายมาตรฐาน โครเมียม 1,000 มิลลิกรัม ต่อลิตร

- สารละลายมาตรฐาน แคลเซียม 1,000 มิลลิกรัม ต่อลิตร

- สารละลายมาตรฐาน แมกนีเซียม 1,000 มิลลิกรัม ต่อลิตร

- สารละลายแลนทานัม 50 กรัม ต่อลิตร

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

ภาคผนวก ข

Eosin Methylene Blue (EMB) Agar

Peptone	10	กรัม
Lactose	5	กรัม
Sucrose	5	กรัม
Dipotassium phosphate	2	กรัม
Agar	13.5	กรัม
Eosin Y	0.4	กรัม
Methylene blue	0.065	กรัม
Distilled Water added to final volume	1000	มล.

pH 7.2 ต้มให้ละลายแล้ว sterile โดยวิธี autoclave

EMB จัดเป็น Differential Media สำหรับแยกพวก Enterobacteriaceae แต่ห้ามพวก ดิดส์กรัมบวกไม่ให้เจริญ EMB ยังใช้แยกพวกที่ใช้ Lactose กับพวกที่ไม่ใช้ Lactose ในพวก Enterobacteriaceae ที่ใช้น้ำตาลแล็คโตส โคโลนีของ *E. coli* จะสะท้อนเป็นแววโลหะ (Metallic Sheen) ส่วนของ *Enterobacter aerogenes* ไม่มีแววโลหะ แต่จะเห็นเป็นเมือก (Mucoid)

Salmonella-Shigella Agar

Beef extract	5	กรัม
Polypeptone	5	กรัม
Lactose	10	กรัม
Bile salt mixture	8.5	กรัม
Sodium citrate	8.5	กรัม
Sodium thiosulfate	8.5	กรัม
Ferric citrate	1	กรัม
Agar	13.5	กรัม
Brilliant green	0.33	กรัม
Distilled water added to final volume	1000	มล.

pH 7.0

อาหารชนิดนี้ มีประโยชน์ในการแยกพวกกรัมลบใน Genus *Salmonella* และ *Shigella* จากตัวอย่างอุจจาระ อาหารที่มีส่วนผสมของ Deoxycholate และ Citrate ถ้าหากความเข้มข้นของ Citrate เพิ่มขึ้น จะช่วยห้ามการเจริญของพวก Normal Coliform ในลำไส้ได้แก่ *Escherichia* และ *Enterobacter* การห้ามการเจริญยังขึ้นอยู่กับปริมาณของ inoculum ที่ใช้อีกด้วย ถ้าใช้ inoculum มากพวก Coliform เหล่านี้ก็สามารถขึ้นได้บ้าง บางสายพันธุ์ของ *Shigella* เช่น *Shigella dysenteriae* ไม่สามารถเจริญได้ โคโลนีที่ขึ้นในอาหารชนิดนี้จะให้สีแดงหรือชมพู แสดงว่าเป็นพวก Ferment Lactose

ภาคผนวก ค

อาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียม

1. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเก็บรักษา

Nutrient Agar Slant ประกอบด้วย

Beef Extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Bacto Agar	15	กรัม

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

2. อาหารที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อ (inoculum medium)

สูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (Basal medium) ประกอบด้วย

KH_2PO_4	1	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01	กรัม
Yeast extract	20	กรัม
Glucose	5	กรัม

ละลายส่วนผสมทุกตัว ยกเว้นกลูโคสในน้ำกลั่น แล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 7 เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที ส่วนกลูโคสแยกอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมเข้าไปโดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 %

3. อาหารที่ใช้ในการเตรียมเชื้อตั้งต้น (starter inoculum medium)

การเตรียม Skim milk agar plate

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

4. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตแอลกอฮอล์โปรตีน ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

สูตรอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

KH_2PO_4	1	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Glucose	5	กรัม

ภาคผนวก ง

การเทียบมาตรฐานสารละลาย

1. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มัล

การเตรียมสารละลายกรดซัลฟูริก

ปิเปตกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 96-98% จำนวน 2.8 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นในขวด ปริมาตรเจือจางให้ครบปริมาตร 1 ลิตร

ปิเปตมา 10 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ หยดฟีนอล์ฟธาไลน์ 2-3 หยด ไทเตรทกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล

การคำนวณ

$$N_1 = N_2 V_2 / V_1$$

เมื่อ N_1 = ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก (นอร์มัล)

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (นอร์มัล)

V_1 = ปริมาตรสารละลายกรดซัลฟูริก (มิลลิลิตร)

V_2 = ปริมาตรสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ (มิลลิลิตร)

2. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮโอซัลเฟต 0.1 นอร์มัล

2.1 การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟต

ซิงโซเดียมไฮโอซัลเฟต ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 24.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ต้มเดือด 20 นาที (CO_2 free) เติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 1 กรัม เจือจางให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร ในขวดปรับปริมาตร

2.2 การเทียบมาตรฐานสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟต 0.1 นอร์มัล

ซิงโพแทสเซียมไดโครเมต ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) ที่อบแห้งที่ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จำนวน 0.20 กรัม (ให้ทราบน้ำหนักละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ละลายน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (1:1) 4 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 10% โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) 20 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกยาง ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 5 นาที ไทเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮโอซัลเฟต 0.1 นอร์มัล จนสาร

ละลายมีสีจางลงเป็นสีน้ำตาลปนเขียว เติมสารละลาย 2 % น้ำแป้ง 2 มิลลิลิตร ไทเตรตต่อจน
สารละลายมีสีเขียวใส

การคำนวณ

$$\text{Normality of Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = A/(0.04903 \times B)$$

เมื่อ A = น้ำหนัก $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ที่ใช้ (กรัม)

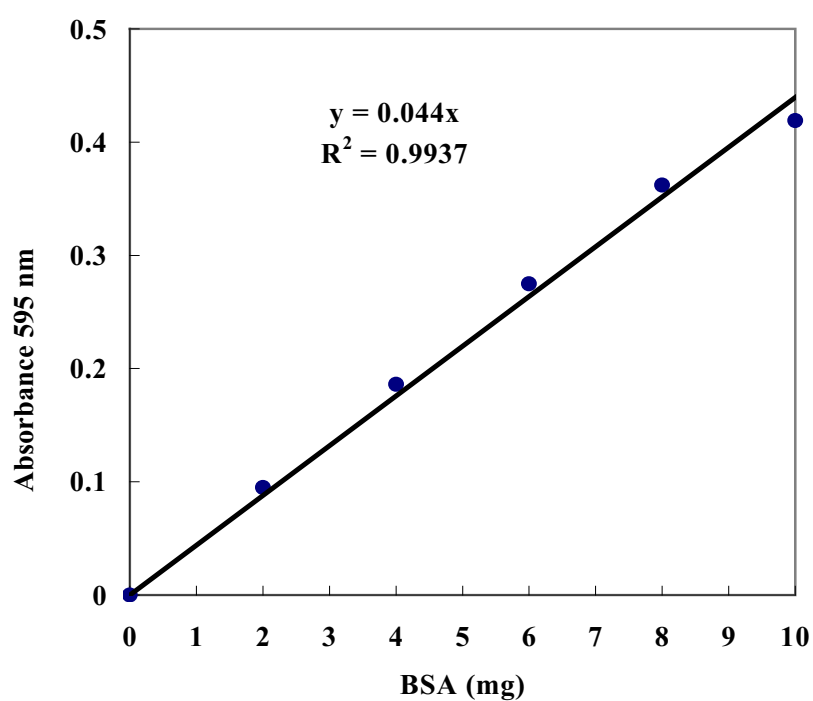
B = ปริมาตร $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ที่ใช้ (มิลลิลิตร)

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

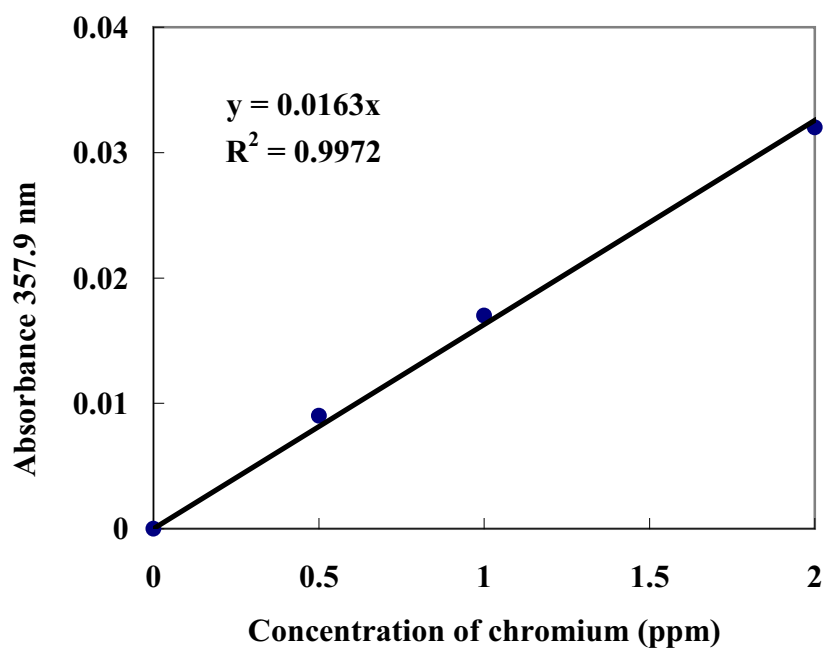
ภาคผนวก จ

กราฟมาตรฐาน

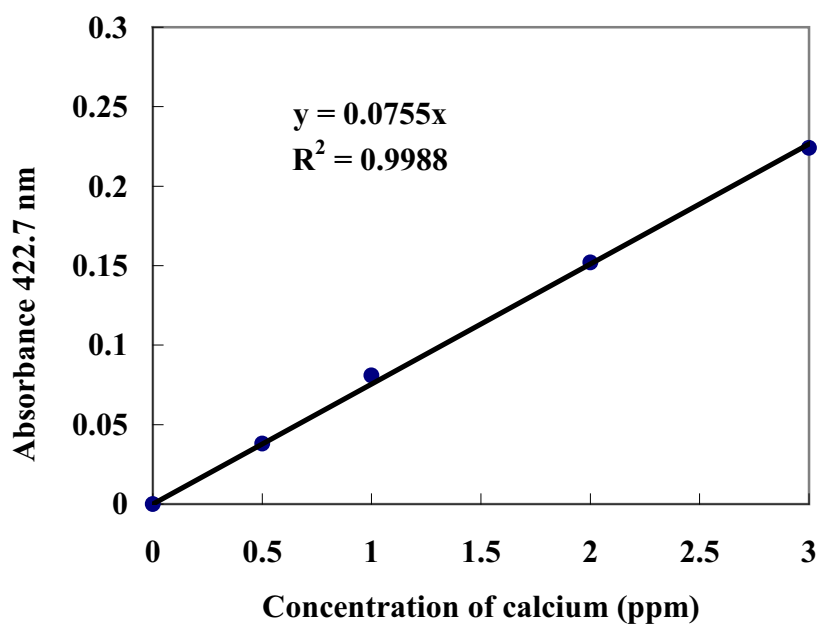
กราฟมาตรฐานสำหรับการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Micromethod ของ Bradford ใช้ความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) ปริมาณ 0-10 ไมโครกรัม วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร



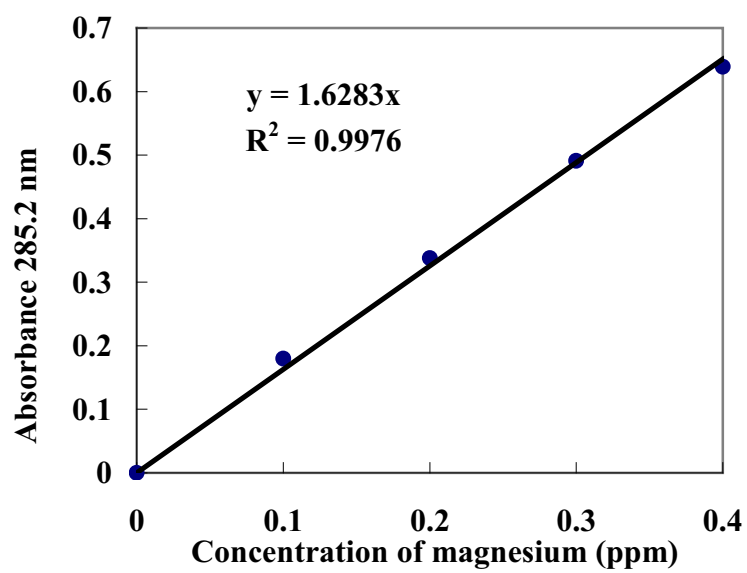
กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโครเมียมโดย วิธี Atomic absorption spectrophotometry



กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแคลเซียมโดยวิธี Atomic absorption spectrophotometry



กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณแมกนีเซียมโดยวิธี Atomic absorption spectrophotometry



ภาคผนวก จ

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณ Chrome cake เมื่อแปรผันปริมาณการใช้แอลคาไลน์โปรติเอส

SOV	Df	SS	MS	F
Between group	7	1.441	0.206	216.950*
Within group	16	0.015	0.0009	
Total	23	1.456		

* = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

SOV = Source of variance

df = Degree of freedom

SS = Sum of squares

MS = Mean of squares

ตารางผนวกที่ 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณ Chrome cake เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่ pH 8.5 และ 10.5

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	3	7,815.642	2,605.214	9,238.348*
A	2	91.640	45.820	162.271*
B	1	7,724.002	7724.002	2,7354.511*
AB	2	3.688	1.844	6.530*
Error	12	3.388	0.282	
Total	17	7,822.718		

A = Temperature

B = pH

* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางผนวกที่ 3 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่า pH ของของผสม ภายหลังจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เมื่อแปรผันเวลาในการย่อยสลายเป็น 3 และ 6 ชั่วโมง

t-Test : Two-sample

	3 hrs	6 hrs
Mean	9.15	8.96
Variance	0.030	0.115
n	3	3
Hypothesized Mean	0	
df	4	
t Stat	2.662	

ตารางผนวกที่ 4 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่า pH ของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต ภายหลังจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เมื่อแปรผันเวลาในการย่อยสลายเป็น 3 และ 6 ชั่วโมง

t-Test : Two-sample

	3 hrs	6 hrs
Mean	8.86	8.91
Variance	0.046	0.029
n	3	3
Hypothesized Mean	0	
df	4	
t Stat	-1.812	

ตารางผนวกที่ 5 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณ Chrome cake (%) ของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต ภายหลังจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เมื่อแปรผันเวลาในการย่อยสลายเป็น 3 และ 6 ชั่วโมง

t-Test : Two-sample

	3 hrs	6 hrs
Mean	40.15	41.73
Variance	0.673	0.828
n	3	3
Hypothesized Mean	0	
df	4	
t Stat	-2.566	

ตารางผนวกที่ 6 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนที่ได้กลับคืน ภายหลังจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เมื่อแปรผันเวลาในการย่อยสลายเป็น 3 และ 6 ชั่วโมง

t-Test : Two-sample

	3 hrs	6 hrs
Mean	45.600	45.997
Variance	1.062	0.442
n	3	3
Hypothesized Mean	0	
df	4	
t Stat	-0.59	

ตารางผนวกที่ 7 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณ Cr_2O_3 (%) ใน Chrome cake ภายหลังจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เมื่อแปรผันเวลาในการย่อยสลายเป็น 3 และ 6 ชั่วโมง

t-Test : Two-sample

	3 hrs	6 hrs
Mean	15.36	14.63
Variance	0.521	0.661
n	3	3
Hypothesized Mean	0	
df	4	
t Stat	1.501	

ตารางผนวกที่ 8 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่า pH ของของผสม ภายหลังจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เมื่อแปรผันเวลาในการย่อยสลายเป็น 3 และ 6 ชั่วโมง

t-Test : Two-sample

	3 hrs	6 hrs
Mean	0.020	0.090
Variance	4.583	1.732
n	3	3
Hypothesized Mean	0	
df	4	
t Stat	-6.767	

ตารางผนวกที่ 9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณ Chrome cake เมื่อแปรผันปริมาณการใช้แอลคาไลน์โปรติเอส เป็นจำนวน 0-60 unit

SOV	Df	SS	MS	F
Between group	6	1.227	0.204	233.751*
Within group	14	0.012	0.0009	
Total	20	1.239		

* = มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางผนวกที่ 10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณ Chrome cake เมื่อแปรผันปริมาณน้ำในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เมื่อใช้น้ำกลั่นและน้ำประปา

SOV	Df	SS	MS	F
Treatment	3	0.036	0.012	20.330*
A	2	0.013	0.007	11.216*
B	1	0.023	0.023	38.587*
AB	2	0.00005	0.00003	0.050
Error	12	0.007	0.0006	
Total	17	0.043		

A = ปริมาณน้ำ

B = ชนิดน้ำ

* = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางผนวกที่ 11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนซ้ำของปลาหลังสีปาด้าที่ 4

SOV	Df	SS	MS	F
Between Groups	3	46.238	15.413	0.902
Error	12	204.988	17.082	
Total	15	251.226		

ตารางผนวกที่ 12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนซ้ำของการเจริญเติบโตจำเพาะของปลาหลังสีปาด้าที่ 4

SOV	df	SS	MS	F
Between Groups	3	0.406	0.135	0.964
Error	12	1.686	0.140	
Total	15	2.092		

ตารางผนวกที่ 13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราแลกเปลี่ยนของปลาหลังสีปาดำที่ 4

SOV	Df	Sum of Squares	Mean Square	F
Between Groups	3	0.1	0.03	0.915
Error	12	0.429	0.04	
Total	15	0.528		

ตารางผนวกที่ 14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการรอดของปลาหลังสีปาดำที่ 4

SOV	df	SS	MS	F
Between Groups	3	0.000	0.000	0.000
Error	12	0.000	0.000	
Total	15	0.000		

ตารางผนวกที่ 15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนซ้ำของน้ำหนักเพิ่มของปลาหลังสิ้นสุดการทดลอง

SOV	Df	SS	MS	F
Between Groups	3	762.119	254.040	2.156
Error	12	1413.769	117.814	
Total	15	2175.888		

ตารางผนวกที่ 16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนซ้ำของการเจริญเติบโตจำเพาะของปลาหลังสิ้นสุดการทดลอง

SOV	Df	SS	MS	F
Between Groups	3	0.354	0.118	2.087
Error	12	0.679	0.06	
Total	15	1.033		

ตารางผนวกที่ 17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราแลกเปลี่ยนของปลาหลังลิ้นสุดท้ายการทดลอง

SOV	Df	Sum of Squares	Mean Square	F
Between Groups	3	0.254	0.08	3.371
Error	12	0.301	0.03	
Total	15	0.555		

ตารางผนวกที่ 18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการรอดของปลาหลังลิ้นสุดท้ายการทดลอง

SOV	Df	SS	MS	F
Between Groups	3	8.188	2.729	1.658
Error	12	19.750	1.646	
Total	15	27.938		