บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

อุตสาหกรรมการฟอกหนังเป็นอุตสาหกรรมเกษตรที่สำคัญของประเทศไทยอุตสาหกรรมหนึ่ง ในประเทศไทยมีโรงงานฟอกหนังอยู่ประมาณ 150 โรงงาน ซึ่งแต่ละปีจะมีเศษหนังฟอกโครมเป็นวัสดุเหลือทิ้งเฉลี่ยปีละ 18,000 ตัน เศษหนังเป็นวัสดุเหลือทิ้งที่มีโปรตีนสูง หากสามารถสกัดแยกโครเมียมออกไปได้จะสามารถนำโปรตีนนั้นกลับมาใช้ประโยชน์ได้ เช่น การนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารสัตว์ นภา ศิวรังสรรค์ (2542) ได้ศึกษาหาสภาวะในการสกัดโครเมียมออกจากเศษหนังฟอกโครม โดยวิธีการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพื่อการนำโปรตีนกลับมาใช้ประโยชน์ การไฮโดรไลซ์โปรตีน (protein hydrolysis) ในเศษหนังด้วยเอนไซม์จะทำให้ได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์และสามารถนำโปรตีนไปใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ได้ ซึ่งจากงานวิจัยของ นภา ศิวรังสรรค์ (2542) ทำให้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเศษหนังฟอกโครมด้วยแอลคาไลน์โปรติเอส คือ ต้มเศษหนังที่อุณหภูมิ 71 ^{0}C ในสารละลายที่มีแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 6.5 % (w/v) เพื่อปรับให้มี pH 10.5 แล้วย่อยสลายด้วยแอลคาไลน์โปรติเอสปริมาณน้อยกว่า 1.0 % (w/w) ที่ระดับอุณหภูมิ 45 ^{0}C

ในงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยต่อเนื่องจากงานวิจัยของ นภา ศิวรังสรรค์ (2542) เพื่อขยายปริมาณการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตเพื่อให้มีปริมาณเพียงพอต่อการนำไปใช้เป็นแหล่งโปรตีนในการผลิตอาหารเลี้ยงปลาดุกลูกผสม ศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการใช้โปรตีนจากเศษหนังฟอกโครมเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แอลคาไลน์โปรติเอสที่ใช้ในการทดลองผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่แยกได้จากดินในประเทศไทย ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ทำการหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ในระดับขวดเขย่า

การทดลองพบว่า การเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารที่มี KH_2PO_4 0.1 เปอร์เซนต์, $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 เปอร์เซนต์, $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 เปอร์เซนต์ และ กลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ yeast extract 0.3% ไนโตรเจน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 rpm สามารถผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสที่มีแอคติวีตีสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0.1 % ไนโตรเจน เชื้อจะสร้างเอนไซม์ได้น้อยอาจเป็นเพราะในระหว่างการเลี้ยงเชื้อต้องใช้กรดอะมิโนจำนวนหนึ่งที่จะนำไปใช้ในการเจริญและสร้างเซลล์ เพื่อเพิ่มจำนวน เมื่อปริมาณไนโตรเจนต่ำก็จะมีปริมาณกรดอะมิโนต่ำ ดังนั้นกรดอะมิโนจึงไม่เพียงพอที่จะเหลือนำไปสังเคราะห์เอนไซม์จำนวนมากๆได้ เมื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจนให้มีความเข้มข้นเป็น 0.5 %ไนโตรเจนจะมีการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสลดลง ไนโตรเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญปัจจัยหนึ่งเนื่องจากถ้ามีมากเกินไปจะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์โดยไปกดดันการสร้างเอนไซม์

การเลือกน้ำเต้าหู้เป็นแหล่งไนโตรเจนเปรียบเทียบกับ yeast extract พบว่าเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่มีน้ำเต้าหู้เป็นแหล่งไนโตรเจน มีการเจริญของเชื้อใกล้เคียงกับเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่มีการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสต่ำ นอกจากนี้ยังมีปัญหาในการปั่นตกตะกอนเพื่อเอาเซลล์ออก เนื่องจากน้ำเต้าหู้มีลักษณะเป็นตะกอนแขวนลอย ทำให้ตะกอนเกิดการฟุ้งกระจายได้ง่ายทำให้การปั่นตกตะกอนเซลล์มีปัญหา และน้ำเลี้ยงที่ได้จะมีกลิ่นเหม็นกว่าการใช้ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลือกใช้ yeast extract 0.3 % ไนโตรเจน เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอส

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 ($Cr(OH)_3$) ซึ่งจะไม่สามารถละลายกลับมาสู่สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตได้อีก

งานวิจัยของ นภา ศิวรังสรรค์ (2542) มีการใช้น้ำมากถึง 20 เท่า (w/v) เนื่องจากเศษหนังที่ใช้ได้ผ่านขั้นตอนการบดสับทำให้เศษหนังมีลักษณะฟู เบา และดูดซับน้ำได้ดี หากใช้น้ำปริมาณน้อย จะไปลดการละลายของเกลืออัลคาไลน์-เอิร์ท และเอนไซม์ที่ใช้ แต่การใช้ปริมาตรน้ำมากทำให้ต้องใช้เวลา 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, 2527) อาหารโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังไม่เพียงแต่มีปริมาณโปรตีนสูง แต่ยังมีกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของคอลลาเจน ชนิด I อย่างครบถ้วน และเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็น

สำหรับสัตว์อยู่ถึง 10 ชนิด คือ ฮิสติดีน ลูซีน ไอโซลูซีน อาร์จินีน ไลซีน เมทไธโอนีน ทรีโอนีน เฟนิลอะลานีน ทริปโตเฟน และแวลีน เปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Taylor (1992)

ในงานวิจัยนี้นำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังมาเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารเลี้ยงปลาดุกลูกผสมโดยการใช้แทนที่ปลาป่นในระดับต่างๆ เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังเพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ประเภทอื่นต่อไป จากผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีโปรตีนไฮโดรไลเสตเป็นส่วนผสมโดยแบ่งอาหารเป็น 4 สูตร คือ สูตรอาหารที่ 1 เป็นอาหารที่ไม่ใส่โปรตีนไฮโดรไลเสตในอาหารทดลอง (สูตรควบคุม) , สูตรอาหารที่ 2 แทนที่ปลาป่นในอาหารทดลองด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตอัตราร้อยละ 25 , สูตรอาหารที่ 3 แทนที่ปลาป่นในอาหารทดลองด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตอัตราร้อยละ 50 และสูตรอาหารที่ 4 แทนที่ปลาป่นในอาหารทดลองด้วยโปรตีนไฮโดรไลเสตอัตราร้อยละ 75 นั้นเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ปลาดุกลูกผสมน้ำหนักตัวเฉลี่ย 40 กรัมที่เลี้ยงโดยอาหารสูตรควบคุมนั้นจะมีค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (%) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ร้อยละต่อวัน) สูงที่สุด ตามด้วยสูตรที่2 ,3 และ 4 ตามลำดับ อัตรารอดของปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารทั้ง 4 สูตร มีอัตรารอดสูงมากคือสูงกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ โดยปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงอาหารสูตรที่ 4 มีอัตรารอดต่ำสุด ส่วนอัตราแลกเนื้อนั้นปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงอาหารสูตรที่ 4 มีอัตราการแลกเนื้อสูงสุด รองมาคือสูตรที่ 3, 2 และ 1 ตามลำดับ ดังนั้นสรุปได้ว่าอาหารสูตรควบคุมใช้เลี้ยงปลาดุกลูกผสมได้ดีที่สุด รองมาคือ สูตรที่ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ แต่ถ้าดูจากค่าความแตกต่างทางสถิติพบว่า ค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (%), อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ร้อยละต่อวัน) , อัตรารอดและอัตราแลกเนื้อ ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ดังนั้นระดับโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ใช้แทนที่ในอาหารปลาดุกลูกผสมควรอยู่ในช่วง 25-50 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก และเมื่อนำปลาดุกลูกผสมที่ทดลองมาหาการสะสมของโครเมียมพบว่ามีการสะสมของโครเมียมในเนื้อเยื่อและเครื่องในต่ำกว่า

1 ppm แสดงว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังสามารถใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์อย่างปลอดภัย

การทดลองโดยการนำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังเพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารปลานั้นมีน้อยมาก พบเพียงการทดลองของ Nogami และคณะ (2000) ได้ทำการทดลองใช้โปรตีนจากเศษหนังฟอกโครมที่มีโครเมียมเป็นส่วนประกอบในอาหารทดลองเลี้ยงปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เพื่อดูการสะสมและผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของปลา โดยวัดจากขนาด, น้ำหนัก, และการสะสมโครเมียมในร่างกายเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยมีระยะเวลาในการเลี้ยง 16 เดือน ซึ่งผลการทดลองนั้นสามารถสังเกตความแตกต่างของขนาดและน้ำหนักของปลาที่เลี้ยงในอาหารทดลองและชุดควบคุมได้อย่างเด่นชัดเมื่อเวลาผ่านไป 16 เดือน และไม่พบความเป็นพิษหรือการตายของปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง โดยโครเมียมจะมีการสะสมมากที่สุดในลำไส้ของปลา ขณะที่ในประเทศไทยยังไม่พบรายงานที่มีการนำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังด้วยเอนไซม์เพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารปลาเลย

การวิจัยครั้งนี้มีอุปสรรคที่สำคัญคือ การผลิตเอนไซม์ให้เพียงพอต่อการทดลองในหม้อต้มขนาด 130 ลิตร เนื่องจากการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ทดลองอยู่ในระดับห้องปฏิบัติการ ทำให้เสียค่าใช้จ่ายในการผลิตเอนไซม์สูงรวมทั้งเสียเวลาในการผลิตเอนไซม์มาก อาจแก้ไขด้วยการขยายขนาดการผลิตเอนไซม์ในถังหมักขนาด 100 ลิตร เพื่อผลิตเอนไซม์ได้มากพอต่อการใช้ในระดับอุตสาหกรรม เป็นการประหยัดทั้งเวลาและอาจช่วยลดต้นทุนของการผลิตเอนไซม์ หรืออาจเปลี่ยนไปใช้เอนไซม์ทางการค้า ซึ่งเอนไซม์ที่นิยมใช้การทดลองเกี่ยวกับการผลิตโปรตีนจากเศษหนังฟอกโครมนิยมใช้ คือ ALKALASE™ นั้นถ้าเราจะใช้ ALKALASE™ อาจติดปัญหาสิทธิบัตรของ Taylor ได้ดังนั้นควรเลือกเอนไซม์ทางการค้าที่มีความสามารถทำงานได้ใน pH ที่ 10.5 เพื่อการผลิตโปรตีนที่มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับการใช้แอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 จากงาน

วิจัยของTaylor และคณะ (1997)พบว่าถ้าไม่ใช้เอนไซม์ในกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจะทำให้เปอร์เซ็นต์โปรตีนที่ได้มีปริมาณต่ำกว่า, ปริมาณโครเมียมได้สูงกว่าและโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนต่ำกว่าการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ใช้เอนไซม์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

1. ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในระดับขวดเขย่า คือ เลี้ยงในอาหารสูตรที่มี KH_2PO_4 0.1 % (w/v) , $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v) , $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v) , กลูโคส 0.5 % (w/v) และ yeast extract ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3% เป็นแหล่งไนโตรเจน ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 rpm สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่ 36 ชั่วโมง
2. แอลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตได้ให่บริสุทธิ์และตกตะกอนด้วยแอมโมเนียม ซัลเฟต 70% แล้วทำ dialyzed กำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตบางส่วน เมื่อนำไปทำให้เป็นผงโดยวิธี lyophilization จะได้แอลคาไลน์โปรติเอสผง 3.5 กรัมต่อน้ำหมัก 3 ลิตร มีแอคติวิตีจำเพาะ 23.74 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน
3. สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเศษหนังด้วยแอลคาไลน์โปรติเอส คือ การใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ในการปรับ pH เป็น 10.5 เวลาที่เหมาะสมในการย่อยคือ 3 ชั่วโมงและที่อุณหภูมิ 45 °C ปริมาณแอคติวิตีแอลคาไลน์โปรติเอสที่ใช้ คือ 10 ยูนิตต่อน้ำหนักหนัง 2.5กรัม
4. น้ำที่เหมาะสมในการทดลองคือน้ำประปา ปริมาณ 15 เท่าต่อน้ำหนักหนัง
5. วิธีการทำให้สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตให้แห้ง คือ วิธีการอบแห้ง
6. โปรตีนไฮโดรไลเสตผงแห้งที่ได้จากการทดลองใน flask 250 มิลลิลิตร ประกอบไปด้วยไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) 14.95 % ปริมาณไขมัน 0.728 % ปริมาณเถ้า 17.14 % ปริมาณแคลเซียม 552.7 ppm และปริมาณโครเมียม 7 ppm เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตของไฮโดรไลเสตโปรตีนผงแห้งที่ได้เท่ากับ 44.6 %

7. โปรตีนไฮโดรไลเสตผงแห้งที่ได้จากการทดลองใน หม้อต้มขนาด 20 ลิตร ประกอบไปด้วย ไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) 14.89 % ปริมาณไขมัน 2.26 % ปริมาณเถ้า 16.05 % ปริมาณเส้น ใย 0.03 % ปริมาณแคลเซียม 703.40 ppm ปริมาณฟอสฟอรัส 0.01 ppm ปริมาณโครเมียม 15 ppm และเปอร์เซ็นต์ ผลผลิตของโปรตีนไฮโดรไลเสตผงแห้งที่ได้เท่ากับ 34.57 %
8. โปรตีนไฮโดรไลเสตผงแห้งที่ได้จากการทดลองในหม้อต้มขนาด 130 ลิตร ประกอบไปด้วย ไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) 14.19 % ปริมาณไขมัน 1.99 % ปริมาณเถ้า 20.43 % ปริมาณเส้นใย 0.10 % ปริมาณแคลเซียม 1145.7 ppm ปริมาณฟอสฟอรัส 0.04 ppm ปริมาณโครเมียม 14 ppm และเปอร์เซ็นต์ ผลผลิตของโปรตีนไฮโดรไลเสตผงแห้งที่ได้เท่ากับ 40.29 %
9. ต้นทุนการผลิตโปรตีนผงในระดับ flask 250 มิลลิลิตร, หม้อต้ม 20และ130 ลิตรเท่ากับ 63.52 บาท/กรัม เท่ากับ 5.68 และ 4.22 บาท/กรัม ตามลำดับ
10. ไม่พบเชื้อ ปากและเท้าเปื่อย, แอนแทรกซ์, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*และ *E. coli* ในเศษหนังฟอกโครมและโปรตีนผงแห้ง
11. เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเสตไปแทนที่ปลาป่นในอาหารปลาดุกลูกผสมในระดับ 0%, 25%, 50% และ 70% (w/w) พบว่าการนำอาหาร 4 สูตรนี้ไปเลี้ยงปลาดุกลูกผสมขนาดเริ่มต้น 40 กรัม ไม่มีผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) คือ น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ร้อยละต่อวัน) อัตราการรอด และอัตราแลกเนื้อ โดยระดับโปรตีนที่เหมาะสมในการแทนที่ปลาป่นอยู่ในช่วง 25-50 % (w/w)