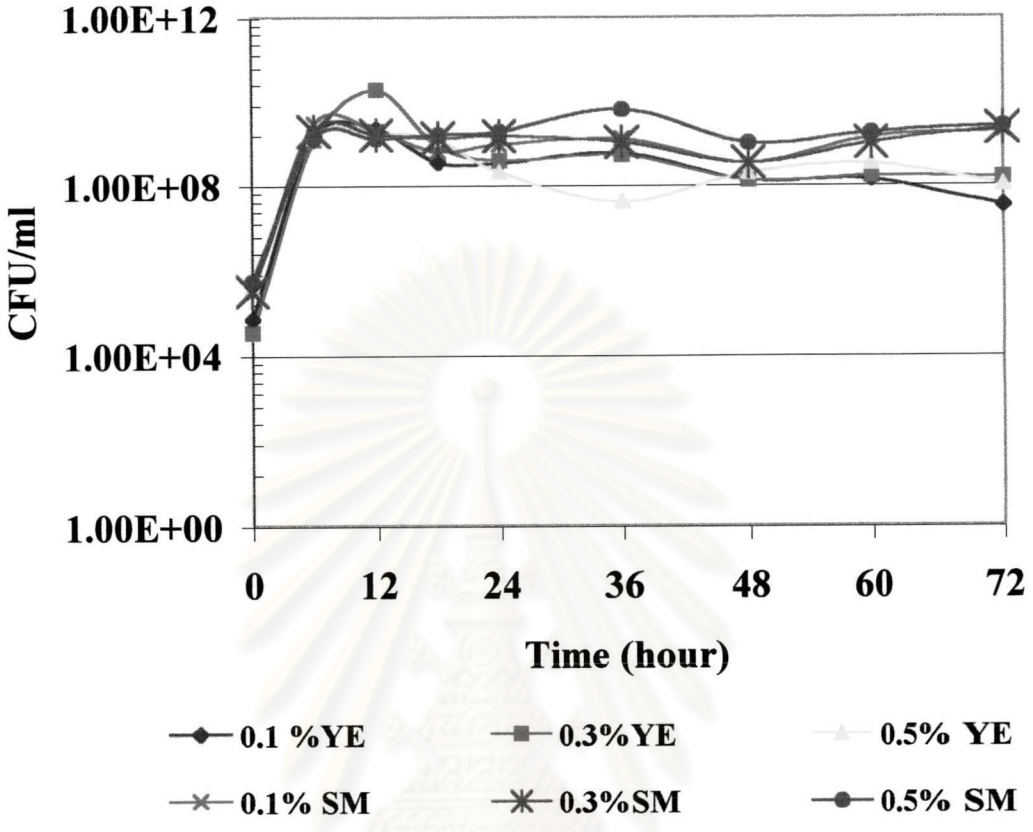
บทที่ 4

ผลการทดลอง

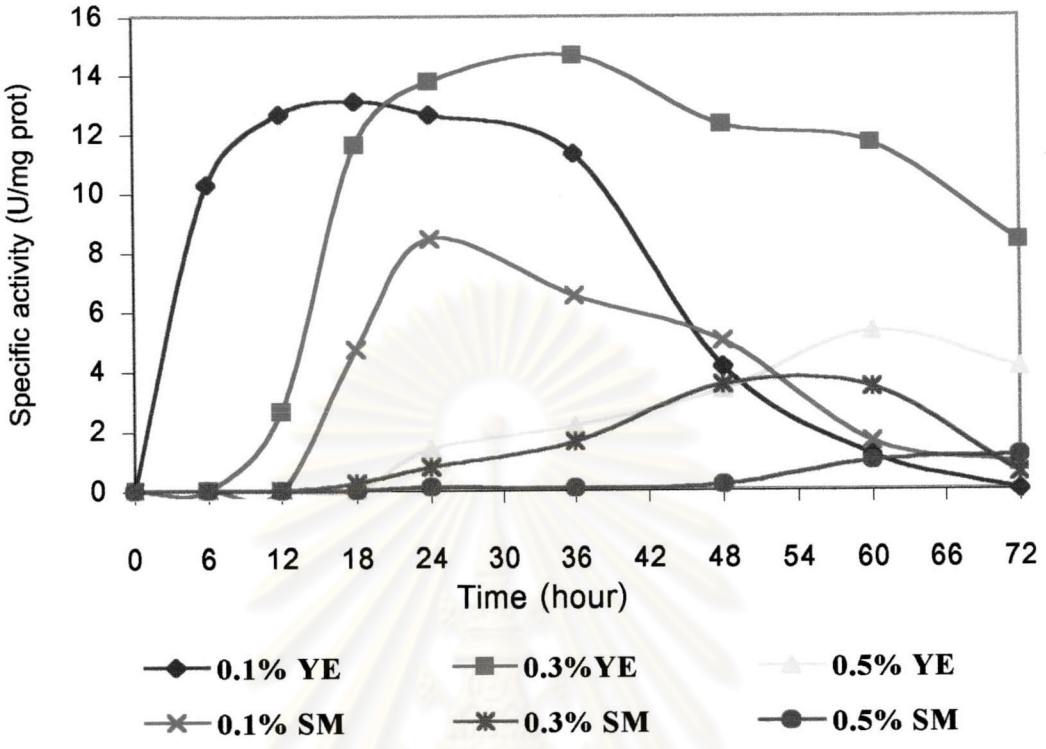
4.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสในระดับขวดเขย่า

4.11 แหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตแอลคาไลน์โปรติเอส

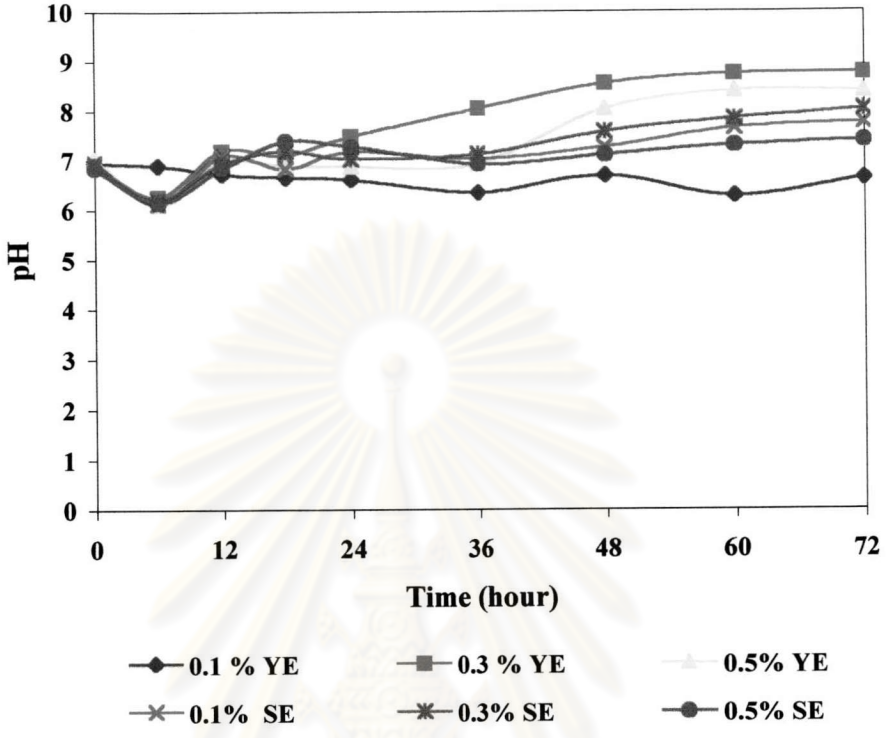
เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v) , $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v) และ กลูโคส 0.5 % (w/v) ทำการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่ได้จากน้ำเต้าหู้ (SM) และ yeast extract (YE) และทำการแปรผันเปอร์เซนต์ไนโตรเจน ดังนี้คือ 0.1%, 0.3% และ 0.5% ไนโตรเจน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 rpm เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง ในช่วง 24 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังกราฟรูปที่ 1, 2 และ 3 พบว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนจาก yeast extract และน้ำเต้าหู้การเจริญเติบโตในลักษณะเดียวกันคือจะเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 6 ชั่วโมงแรกแล้วจึงเริ่มคงที่ ส่วนที่ใช้ yeast extract 0.3 % (w/v) จะมีการเจริญสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 แล้วจึงเริ่มคงที่ และมีการผลิต แอลคาไลน์โปรติเอสที่มีแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุดที่เวลา 36 ชั่วโมง โดยที่แอคติวีตีของเอนไซม์ที่เชื้อสามารถผลิตได้เท่ากับ 14.64 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังนั้นจึงเลือก yeast extract 0.3 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์



รูปที่ 1 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v) , $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v) และกลูโคส 0.5 % (w/v) ทำการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่ได้จากน้ำเต้าหู้ (SM) และ yeast extract (YE) และทำการแปรผันเปอร์เซนต์ไนโตรเจน ดังนี้ คือ 0.1%, 0.3% และ 0.5% ไนโตรเจน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 rpm



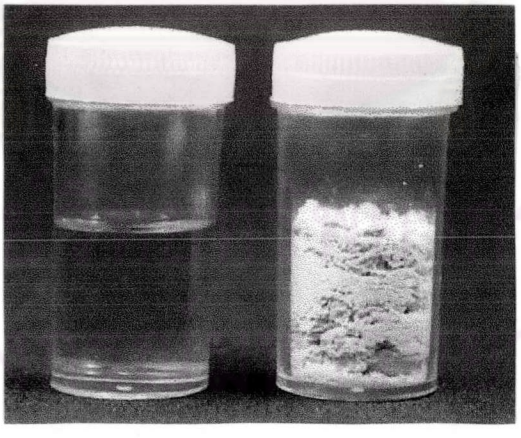
รูปที่ 2 เปรียบเทียบแอคติวีตีจำเพาะของแอลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v) และ กลูโคส 0.5 % (w/v) ทำการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่ได้จากน้ำเต้าหู้ (SM) และ yeast extract (YE) และทำการแปรผัน เปอร์เซนต์ไนโตรเจน ดังนี้คือ 0.1%, 0.3% และ 0.5% ไนโตรเจนปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 rpm



รูปที่ 3 ติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v) และ กลูโคส 0.5 % (w/v) ทำการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่ได้จากน้ำเต้าหู้ (SM) และ yeast extract (YE) และทำการแปรผัน เปอร์เซนต์ไนโตรเจน ดังนี้คือ 0.1%, 0.3% และ 0.5% ไนโตรเจน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 rpm

4.2 การเตรียมแอลคาไลน์โปรติเอสให้บริสุทธิ์บางส่วน

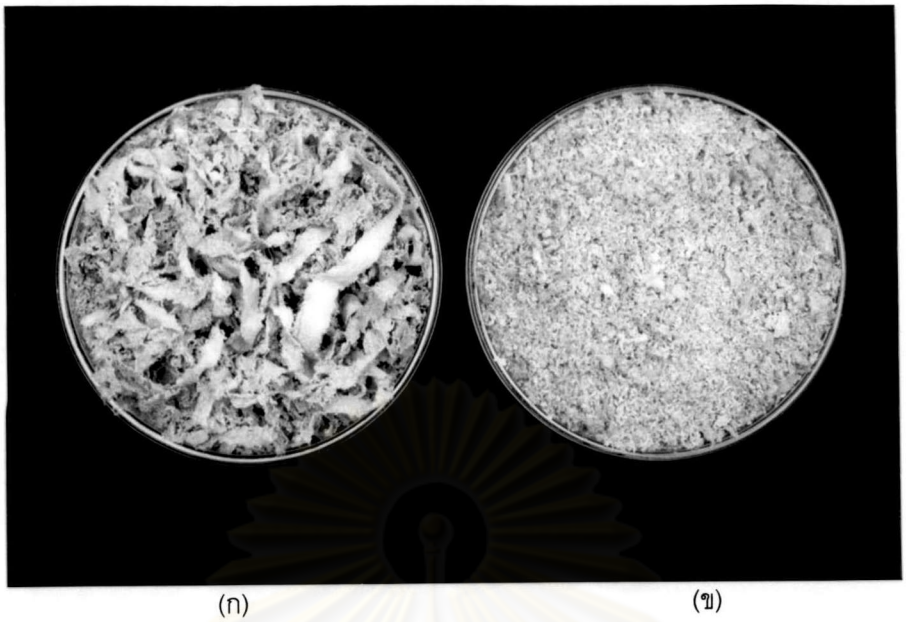
การแยกแอลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่ชั่วโมงที่ 36 โดยการปั่นแยกเอาเฉพาะส่วนน้ำใส ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่เรียก "crude enzyme" นำ crude enzyme มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วน โดยการตกตะกอนด้วย 70% แอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำไปปั่นตกตะกอน ละลายตะกอนด้วยสารละลายคาร์บอเนตไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 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 หลังจากนั้นนำเอนไซม์ผงแห้งมาหาค่าแอคติวิตีได้ค่าแอคติวิตีประมาณ 1.187 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและมีปริมาณโปรตีน 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเป็น 23.74 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน



(ก) (ข)

รูปที่ 4 แอลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25

(ก) crude enzyme (ข) lyophilized enzyme



(ก) (ข)

รูปที่ 5 เศษหนังฟอกโครมจากขั้นตอนการขูดบาง

(ก) ก่อนบด (ข) หลังบด

4.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเศษหนัง

เศษหนังที่ได้จากขั้นตอนการขูดบางมีลักษณะและองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้องแม่นยำ การนำเศษหนังมาบดสับด้วยเครื่องตัดเฉือนความเร็วสูง (blender) จะทำให้เศษหนังมีขนาดสม่ำเสมอใกล้เคียงกัน และเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการเข้าทำปฏิกิริยากับสารเคมี และเอนไซม์ นอกจากนี้เศษหนังที่มีอายุแตกต่างกัน จะมีปริมาณความชื้นแตกต่างกันด้วย โดยเศษหนังที่ได้จากเครื่องขูดบางใหม่ๆจะมีความชื้นกว่าร้อยละ 50 ดังนั้นในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเศษหนังจึงต้องหาปริมาณความชื้นและทดสอบค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างเพื่อให้สามารถแปรผันการเติมด่างได้อย่างเหมาะสม ผลการวิเคราะห์แสดงเป็นค่าร้อยละโดยน้ำหนักของเศษหนังที่ปราศจากความชื้น (moisture free basis) ในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 องค์ประกอบทางเคมีของเศษหนังจากขั้นตอนการขูดบาง

องค์ประกอบ	ค่าเฉลี่ย[1] ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
PH	3.26 ± 0.01
Moisture (%)	51.04 ± 0.05
Ash[2] (%)	7.27 ± 0.09
Chromic oxide[2] (%)	3.00 ± 0.05
Chromium[2,5] (%)	2.05 ± 0.04
TKN[2,3,4] (%)	11.13 ± 0.07
Fat[2] (%)	0.85 ± 0.44
Calcium[2] (ppm)	0.80 ± 0.44
Magnesium[2] (ppm)	0.08 ± 0.02

[1]ค่าเฉลี่ยจากจำนวนตัวอย่าง 3 ซ้ำ

[2]เปอร์เซนต์น้ำหนักแห้ง

[3]Total Kjeldahl Nitrogen

[4]หาปริมาณโปรตีนโดยการคูณ TKN ด้วย 6.25

[5]คำนวณโดยการคูณ Chromic oxide ด้วย 0.6842

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเศษหนังด้วยแอลคาไลน์โปรติเอส

4.4.1 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, 4และ 6% (w/v) มีปริมาณ chrome cake ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และการทดลองที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 1.5, 2, 4 และ 6% (w/v) มีปริมาณ chrome cake ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างการทดลองที่ใช้เอนไซม์ปริมาณ 1% (w/v) กับ 2% (w/v) ดังแสดงใน (ตารางที่ 9) ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณเอนไซม์ 2 % (w/v)ในการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากต้องการให้มีปริมาณเอนไซม์มากเพียงพอ เพราะอาจมีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ไประหว่างการดำเนินการทดลอง เนื่องจากสภาวะในการทดลอง เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง รวมทั้งระยะเวลาที่ทำการศึกษาวิจัย

ตารางที่ 9 ปริมาณ chrome cake และ pH ของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตเมื่อแปรผันปริมาณการใช้แอลคาไลน์โปรติเอส

ปริมาณเอนไซม์ (%)	Chrome cake (g) $\pm$ SD[1]	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

[1]เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามแนวตั้ง ตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4.2 การลดปริมาณการใช้แอลคาไลน์โปรติเอส

เนื่องจากแอลคาไลน์โปรติเอสที่ใช้ในการทดลองมีต้นทุนสูงดังนั้นจึงได้ศึกษาการลดปริมาณการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายเศษหนัง โดยเปลี่ยนปริมาณการใช้เอนไซม์เป็น unit แทนการใช้เอนไซม์เป็นเปอร์เซ็นต์เนื่องจากเอนไซม์ที่ผลิตได้ในแต่ละครั้งมีแอคติวิตีไม่เท่ากันและอาจมีการสูญเสียแอคติวิตีไประหว่างการเก็บรักษา ทำให้การทดลองที่ใช้ปริมาณเอนไซม์เป็นเปอร์เซ็นต์

อาจได้ผลการทดลองที่ไม่แน่นอน การใช้เอนไซม์เป็น unit นั้นจะทำให้ได้ปริมาณเอนไซม์ที่แน่นอน สำหรับการย่อยสลายเศษหนังเพื่อผลิตโปรตีน จากผลการทดลองข้อ 4.4.1 ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมคือ 2 % (w/v) คิดเป็น 59.35 unit การทดลองนี้จึงทำการแปรผันแอคติวิตีของเอนไซม์ในช่วง 0-60 unit ซึ่งได้ผลการทดลองดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ปริมาณ chrome cake เมื่อแปรผันแอคติวิตีของเอนไซม์ในช่วง 0-60 unit

เอนไซม์	Chrome cake				
(unit)	1	2	3	เฉลี่ย $\pm$ SD[1]	(%)
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

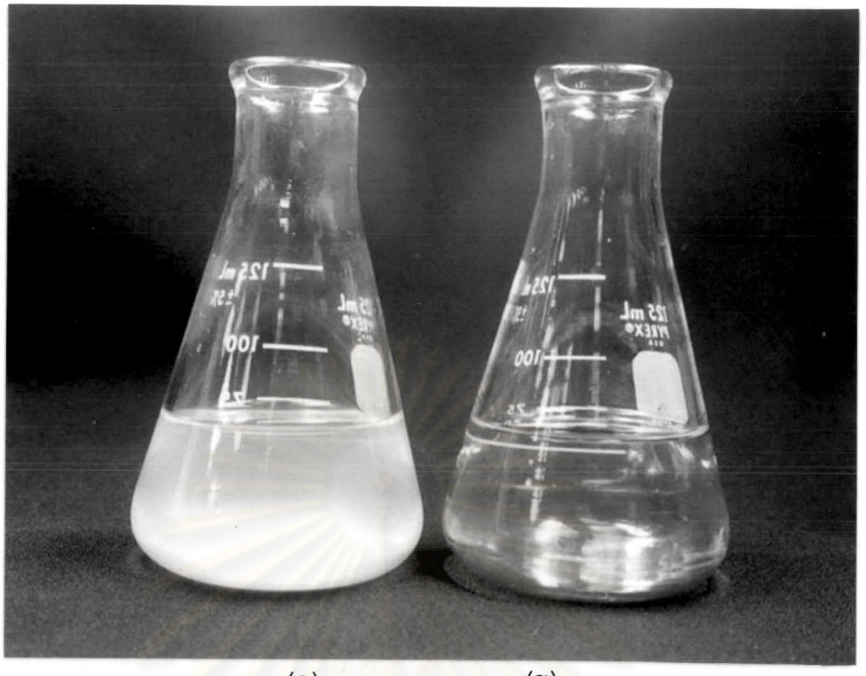
[1]เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามแนวตั้ง ตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับที่ความเชื่อมั่น 95%

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณ chrome cake ในกลุ่มที่มีการใช้เอนไซม์ที่ทุกระดับแอคติวิตี กับการทดลองชุดควบคุมพบว่าการใช้เอนไซม์ทำให้เหลือปริมาณ chrome cake น้อยกว่าการทดลอง

ที่ไม่มีการเติมเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตารางผนวกที่ 2 และพบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ที่ระดับแอคติวิตี 20 unit หรือแอคติวิตีจำเพาะ 400 unit/mg protein ปริมาณ chrome cake จะเหลือน้อยที่สุด โดยจะทำให้เหลือ chrome cake ประมาณ 37.56 % โดยน้ำหนักเริ่มต้นของเศษหนัง เมื่อดูค่าทางสถิติพบว่ากลุ่มที่มีการใช้เอนไซม์ที่ระดับแอคติวิตี 5 unit ให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบทุกระดับแอคติวิตี และกลุ่มที่มีการใช้เอนไซม์ที่ระดับแอคติวิตี 10, 15, 20, 40 และ 60 unitให้ค่าทางสถิติไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นระดับแอคติวิตีที่เลือกใช้ในการทดลองต่อไปนั้น จึงเลือก 10 unit เพราะเป็นระดับแอคติวิตีที่เพียงพอสำหรับทำการทดลอง

สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากกลุ่มที่ใช้เอนไซม์มีลักษณะใสและเหลืองกว่าสารละลายไฮโดรไลเสตที่ได้จากกลุ่มที่ไม่ใช้เอนไซม์ และพบว่า ตะกอน chrome cake ที่เหลือจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ มีลักษณะเป็นตะกอนขนาดเล็ก ละเอียด และเป็นเนื้อเดียวกันคล้ายครีมเค็กต่างจาก chrome cake ที่ได้จากกลุ่มที่ไม่ใช้เอนไซม์ซึ่งจะได้ตะกอนที่หยาบกว่า และเมื่อนำ chrome cake ไปหาขนาดอนุภาคด้วยเครื่องสแกนนิงอิเลคตรอนไมโครสโครป (SEM) พบว่า chrome cake ที่ได้จากกลุ่มที่ใช้เอนไซม์ ขนาดอนุภาคเล็กกว่า chrome cake ที่ได้จากกลุ่มที่ไม่ใช้เอนไซม์ โดยมีขนาดอนุภาคประมาณอยู่ในช่วง 12-182 และ 100- 600 ไมโครเมตร ตามลำดับ

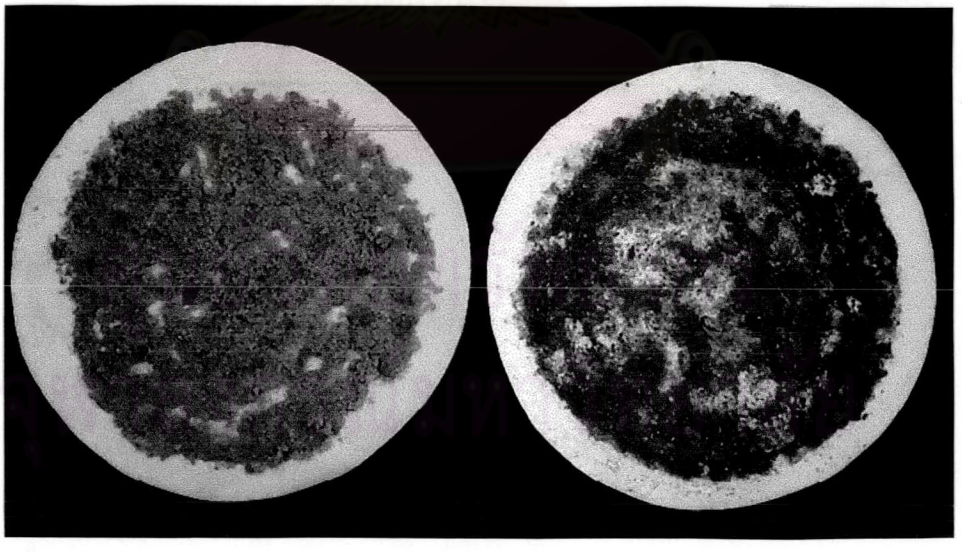
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(ก) (ข)

รูปที่ 6 สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการทดลองใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร

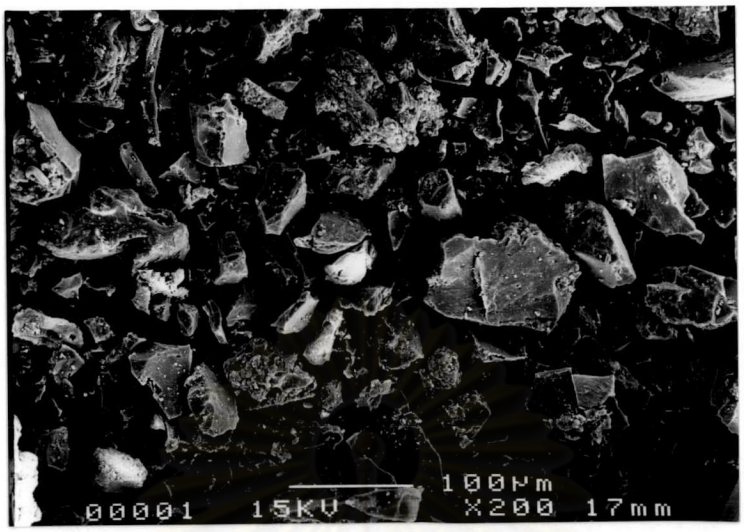
(ก) ไม่ใช้เอนไซม์ (ข) ใช้แอลคาไลน์โปรติเอส 10 unit



(ก) (ข)

รูปที่ 7 ตะกอน chrome cake ที่กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์หนึ่ง

(ก) กลุ่มที่ไม่ใช้เอนไซม์ (ข) กลุ่มที่ใช้เอนไซม์



รูปที่ 8 ขนาดอนุภาค chrome cake ที่ได้จากกลุ่มที่ใช้เอนไซม์ตรวจสอบด้วยเครื่องสแกนนิง อิเล็คตรอนไมโครสโครป

รูปที่ 9 ขนาดอนุภาค chrome cake ที่ได้จากกลุ่มที่ไม่ใช้เอนไซม์ตรวจสอบด้วยเครื่องสแกนนิง อิเล็คตรอนไมโครสโครป

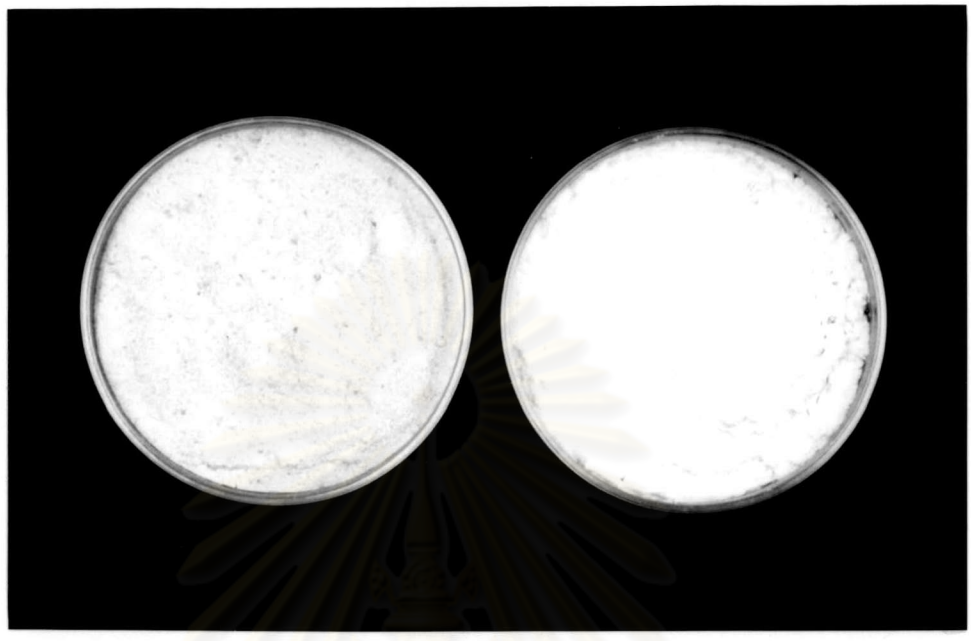
4.4.3 เปรียบเทียบวิธีการทำสารละลายไฮโดรไลเสตให้แห้งโดยวิธีระเหยแห้ง (spraydry) กับการอบแห้ง

เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) เท่ากับ 32.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ไปทำให้แห้งโดยวิธีระเหยแห้ง (spray dry) เปรียบเทียบกับการอบแห้ง ได้ผลดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 น้ำหนัก (กรัม) และความชื้น (เปอร์เซ็นต์) ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการระเหยแห้ง (spray dry) และการอบแห้ง

วิธี	ผลผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต (g)	ความชื้น (%)
1.ระเหยแห้ง (spray dry)	0.75 ± 0.07	7.53 ± 0.07
2.การอบแห้ง	3.18 ± 0.11	6.90 ± 0.37

จากตารางที่ 11 พบว่าการทำโปรตีนไฮโดรไลเสตให้แห้งให้แห้งโดยวิธีระเหยแห้ง (spraydry) มีน้ำหนักโปรตีนไฮโดรไลเสตแห้งน้อยกว่าการอบแห้ง แต่ความชื้นของโปรตีนไฮโดรไลเสต โดยวิธีระเหยแห้งจะสูงกว่า ลักษณะของโปรตีนไฮโดรไลเสตผงแห้งที่ได้มีลักษณะเป็นผงสีขาวละเอียดคล้ายแป้ง ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเสตผงแห้งที่ได้จากการอบแห้งเมื่อนำไปบดในเครื่องปั่น มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง



(ก) (ข)

รูปที่ 10 แสดงลักษณะโปรตีนผงแห้งที่ได้จากการอบแห้ง (ก) เทียบกับการระเหยแห้ง (ข)

เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเสตผงแห้งที่ได้จากการระเหยแห้งและการอบแห้งไปหาขนาดของอนุภาคโดยใช้สแกนนิงอิเล็คตรอนไมโครสโครปพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตผงแห้งที่ได้จากการระเหยแห้งมีขนาดประมาณ 6 ไมโครเมตร ในขณะที่ โปรตีนไฮโดรไลเสตผงแห้งที่ได้จากการอบแห้งมีขนาด 6-60 ไมโครเมตรดังรูปที่ 11 และ12

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11 โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ทำให้แห้งโดยวิธีระเหยแห้ง (spray dry) ตรวจสอบด้วยเครื่องสแกนนิงอิเล็คตรอนไมโครสโครป

รูปที่ 12 โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ทำให้แห้งโดยวิธีอบแห้งตรวจสอบด้วยเครื่องสแกนนิงอิเล็คตรอนไมโครสโครป

ผลจากตารางที่11 เราเลือกวิธีการทำโปรตีนไฮโดรไลเสตให้แห้งโดยวิธีการอบแห้งในการทำการทดลองต่อไปเนื่องจาก ได้น้ำหนักของโปรตีนไฮโดรไลเสตแห้งสูงกว่าการระเหยแห้ง และมีความชื้นน้อยกว่า ถึงแม้ว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตผงแห้งที่ได้จากการระเหยแห้งจะมีลักษณะความละเอียดและสีสันที่ดีกว่าการอบแห้งก็ตาม

4.4.4 การแปรผันชนิดและปริมาณของน้ำที่ใช้ในการต้มหนัง

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 ปริมาณ chrome cake เมื่อแปรผันปริมาณน้ำในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในน้ำกลั่นและน้ำประปา (10, 15 และ20 เท่า (w/v))

ปริมาณน้ำ (เท่า) (w/v)	ค่าเฉลี่ยปริมาณ chrome cake (g) + SD[1]	
	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)

[1]เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งและแนวนอน ตัวอักษรที่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เมื่อพิจารณาผลการทดลองจากน้ำหนักเศษหนังที่ไม่ถูกย่อยในรูปของ chrome cake (ตารางที่ 12) 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) สำหรับปริมาณน้ำที่ต่างกันที่นั้นการทดลองที่ใช้ปริมาณน้ำที่ 15 เท่า ให้ค่าเฉลี่ยปริมาณ chrome cake ต่ำที่สุด (0.96) แตกต่างกับค่าเฉลี่ยปริมาณ chrome cake ที่ปริมาณน้ำ 10 และ 20 เท่า(w/v) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณ chrome cake ต่อปัจจัยร่วมระหว่างชนิดของน้ำและปริมาณ พบว่าให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อทดสอบโดยวิธี DMRT จากผลการทดลองปรากฏว่าที่ปริมาณน้ำ 15 เท่า และ น้ำประปา จะให้ค่าเฉลี่ยปริมาณ chrome cake ต่ำที่สุด ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้น้ำประปาปริมาณ 15 เท่า(w/v)

4.4.5 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 13

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่13 ปริมาณผลผลิต chrome cake, pH และปริมาณ ผลผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต เมื่อทดลองการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ในหม้อต้มขนาด 20 (หนัง จำนวน 1 กิโลกรัมต่อน้ำประปา 15 ลิตร)และ 130 ลิตร (หนัง 8 กิโลกรัมต่อน้ำประปา 120 ลิตร)

ขนาดหม้อต้ม (liter)	Chrome cake (g) ± SD	Chrome cake (%)	ผลผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต (g)	ผลผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต (%)	pH
20 (ไม่ใช้เอนไซม์)	352.17 ± 7.97	35.22	225.95	22.60	11.16
20 (ใช้เอนไซม์)	285.67 ± 6.12	28.57	345.73	34.57	9.06
130 (ไม่ใช้เอนไซม์)	3,195.00 ± 157.61	39.94	2,583.24	32.29	10.76
130 (ใช้เอนไซม์)	1740.26 ± 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) โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้ศึกษามาแล้ว พบว่า ในการทดลองที่ไม่ใช้เอนไซม์ มี ปริมาณ chrome cake , pH และ โปรตีนไฮโดรไลเสตเท่ากับ 35.22%, 11.16 และ 22.60% ตามลำดับ ส่วนในทดลองที่ใช้เอนไซม์ มี ปริมาณ 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 โปรตีนไฮโดรไลเสต เท่ากับ 21.75 %, 9.21 และ 40.29 % ตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นว่าในกลุ่มที่ใช้เอนไซม์ทั้งการทดลองในหม้อขนาด 20 และ130 ลิตร จะทำให้เหลือปริมาณ chrome

cake น้อยกว่าการทดลองที่ไม่ใช้เอนไซม์ และการทดลองในหม้อขนาด 130 ลิตรจะทำให้เหลือปริมาณ chrome cake น้อยการทดลองในหม้อขนาด 20 ลิตร

4.4.5 องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต

สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการต้มใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร มีค่า pH อยู่ในช่วง 9.02-9.44 มีปริมาณโครเมียมละลายอยู่เพียง 0.22 ppm ปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) 27.24 mg/ml ปริมาณเถ้าเฉลี่ย 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 ปริมาณเถ้าเฉลี่ย 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 ปริมาณเถ้าเฉลี่ย 7.38 mg/ml หรือประมาณ 7,380 ppm มีปริมาณแคลเซียมและแมกนีเซียม 695 และ 0.0.4 ppm ตามลำดับ องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต แสดงในตารางที่ 14

ตารางที่14 องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตเมื่อต้มใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร, หม้อต้มขนาด 20 และ 130 ลิตร

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

[1]ค่าเฉลี่ยจากจำนวนตัวอย่าง N = 9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

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

เมื่อนำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการต้มในหม้อต้มขนาด 130 ลิตร ไปทำให้เป็นผงแห้งโดยวิธีการอบแห้งจะได้ผงโปรตีนโดยเฉลี่ยร้อยละ 40.29 โดยน้ำหนักแห้งของเศษหนังเป็นผงโปรตีนที่มีความชื้นโดยเฉลี่ยร้อยละ 7.92 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (TKN) ร้อยละ 14.19 ปริมาณแคลเซียม 1145.70 ppm และมีโครเมียม 14 ppm องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสตแสดงในตารางที่ 15

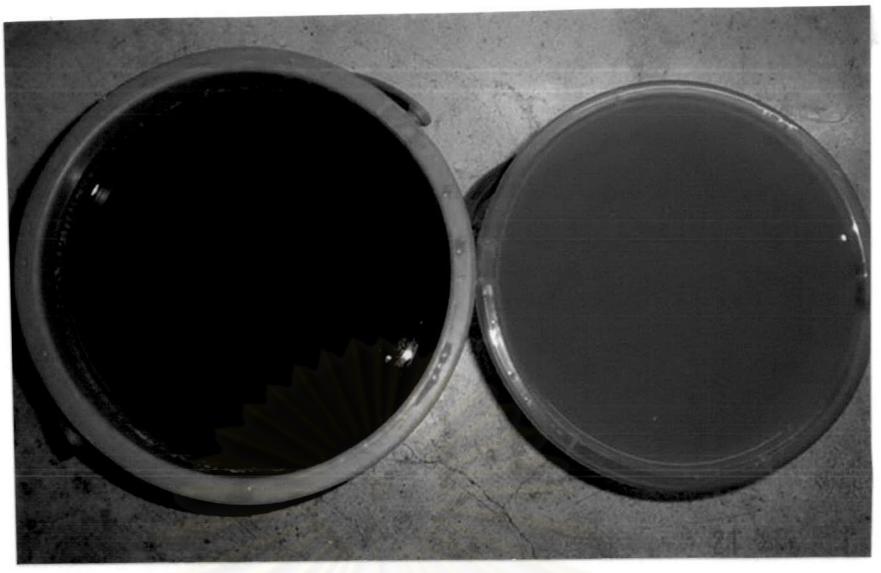
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ต้มใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร, หม้อต้มขนาด 20 และ 130 ลิตรแล้วทำแห้งโดยวิธีการอบแห้ง

องค์ประกอบ	ค่าเฉลี่ย ± SD		
	250 มิลลิลิตร	20 ลิตร	130 ลิตร
Moisture (%)	12.55 ± 0.38	8.50 ± 0.20	7.92 ± 0.34
Ash[1] (%)	17.14 ± 0.16	16.05 ± 0.21	20.43 ± 0.56
TKN[1,2,3] (%)	14.95 ± 0.09	14.89 ± 0.26	14.19 ± 0.63
Fat[1] (%)	0.73 ± 0.57	2.26 ± 0.64	1.99 ± 0.33
Fiber (%)	-	0.03 ± 0.01	0.10 ± 0.02
Calcium[1] (ppm)	552.7 ± 0.71	703.40 ± 4.54	1145.70 ± 11.17
Chromium[1] (pmm)	7.00 ± 0.04	15.00 ± 0.05	14.00 ± 0.05
Phosphorus (ppm)	-	0.01 ± 0.001	0.04 ± 0.003

[1]เปอร์เซนต์น้ำหนักแห้ง [2]Total Kjeldahl Nitrogen [3]ปริมาณโปรตีน โดยคูณ TKN กับ 6.25

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



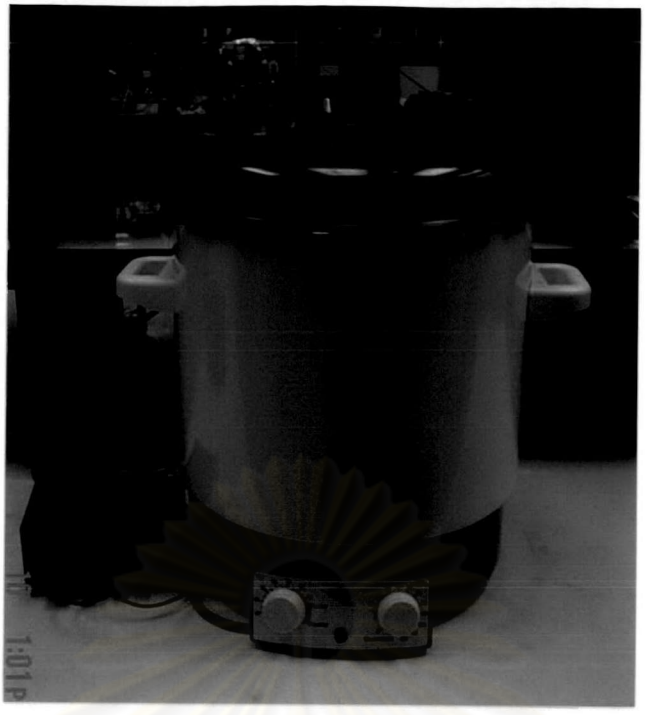
(ก) (ข)

รูปที่ 13 สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการทดลองในหม้อต้มขนาด 20 ลิตร

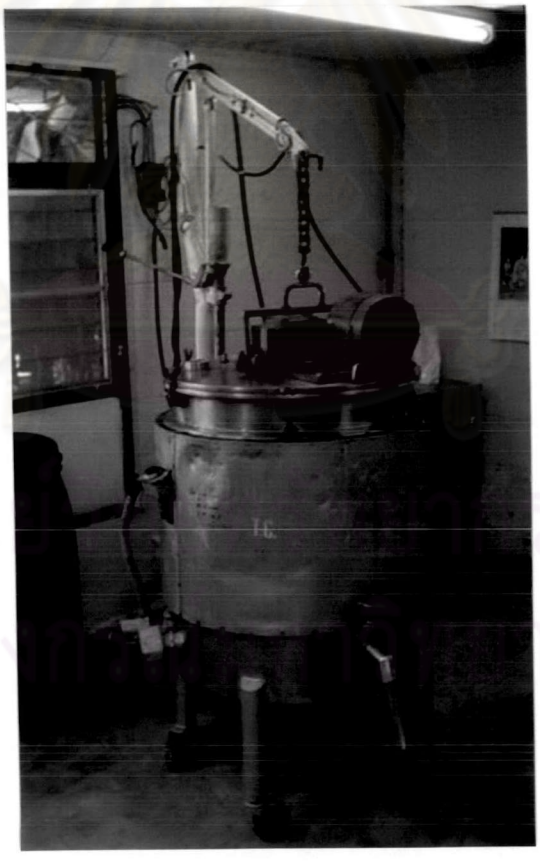
(ก) ใช้แอลคาไลน์โปรติเอส (ข) ไม่ใช้เอนไซม์

รูปที่ 14 สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตในชุดทดลองที่ใช้แอลคาไลน์โปรติเอสหลังกรองด้วย

กระดาษกรองเบอร์ 1



รูปที่ 15 หม้อต้ม ขนาด 20 ลิตร



รูปที่ 16 หม้อต้ม ขนาด 130 ลิตร

4.5 ผลการตรวจหาเชื้อ ปากและเท้าเปื่อย, แอนแทรกซ์, *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 Differrential media คือ SS Agar และ EMB Agar ไม่พบการเจริญของเชื้อทั้งสามชนิด

4.6 กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของผงโปรตีน

ผงโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังด้วยแอลคาไลน์โปรติเอส มีปริมาณไนโตรเจนประมาณร้อยละ 14 หรือคิดเป็นโปรตีนร้อยละ 88 เมื่อนำไปวิเคราะห์สัดส่วนกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ เปรียบเทียบกับกรดอะมิโนของคอลลาเจน ชนิด I (Colllagen Type I) ชนิดที่เป็นองค์ประกอบในหนังสัตว์ การวิเคราะห์กรดอะมิโนใช้วิธี Water AccQ. Tag Amino Acid Analysis Method ผลการวิเคราะห์สัดส่วนกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ แสดงในตารางที่ 16

สัดส่วนกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากเศษหนังที่ใช้ทดลอง มีสัดส่วนที่ใกล้เคียงกับกรดอะมิโนของคอลลาเจน ชนิด I, กรดอะมิโนในโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังด้วยแอลคาไลน์โปรติเอสในงานวิจัยของ นภา ศิวรังสรรค์ (2542) และ กรดอะมิโนในโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังด้วย ALKALASE™ .ในงานวิจัยของ Taylor และคณะ (1992) แม้ว่ากรดอะมิโนแต่ละชนิดที่ได้จะมีปริมาณแตกต่างกับคอลลาเจน แต่ว่ามีรูปแบบ (profile)ที่ใกล้เคียงกัน และพบว่าโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังโดยไม่ใช้เอนไซม์มีปริมาณกรดอะมิโนต่ำกว่าโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเศษหนังโดยใช้เอนไซม์

ตารางที่ 16 กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเสต

กรดอะมิโน	จำนวนกรัมของกรดอะมิโนต่อ 100 กรัมตัวอย่าง				
	(Colllagen Type I)	ไม่ใช้เอนไซม์	ใช้เอนไซม์	นภา (2542)	Taylor และคณะ 1992
แอสปาติก (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
ซีสติน (Cys)	0	0.04[2]	0.022[2]	0	0
ไธโรซีน (Tyr)	0.40	0.27	0.33	0	0.10
วาลีน (Val)	2.30	1.81	1.97	1.51	0.10
เมไธโอนีน (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
พีนิลอลานีน (Phe)	1.30	1.86	1.40	2.13	1.30
ทริปโตเฟน (Typ)	8.60	0.01	0.02	0	10

[1]วิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือคณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล,

[2]วิเคราะห์ที่บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหารจำกัด (มหาชน)

วิเคราะห์ที่ฝ่ายเครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาเกษตรศาสตร์

4.7 การผลิตอาหารปลา และการทดลองเลี้ยงปลาดุกลูกผสม

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

ผลการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1, 2, 3 และ 4 ซึ่งรายงานผลการศึกษาในรูปของน้ำหนักเพิ่ม (กรัม) ดังแสดงในตารางที่ 17 และรูปที่ 17a และ 17b ส่วนอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเป็นร้อยละต่อวัน แสดงในตารางที่ 18 และรูปที่ 18a และ18b 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 17b 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 ซึ่ง อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ร้อยละต่อวัน)ของปลาทดลองที่ได้รับอาหารทั้ง 4 สูตรไม่มีความแตกต่างกัน และจากรูปที่ 18 b พบว่าค่า R^2 ของผลการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 มีค่าเท่ากับ 0.89 ซึ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 มาก แสดงว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเป็นร้อยละต่อวันของปลาทดลองมีแนวโน้มลดลงเมื่อได้รับสูตรอาหารที่มีระดับโปรตีนผงแห้งที่ใช้แทนปลาป่นเพิ่มขึ้น

อัตรารอด

อัตรารอดของปลาทดลองที่ได้รับอาหารสูตรต่างๆ ทั้ง 4 สูตร เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าอัตรารอดคิดเป็นร้อยละ 100 , 99.5, 100 และ98.25 ตามลำดับ ซึ่งอัตราการรอดของปลาในทุกกลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$) 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

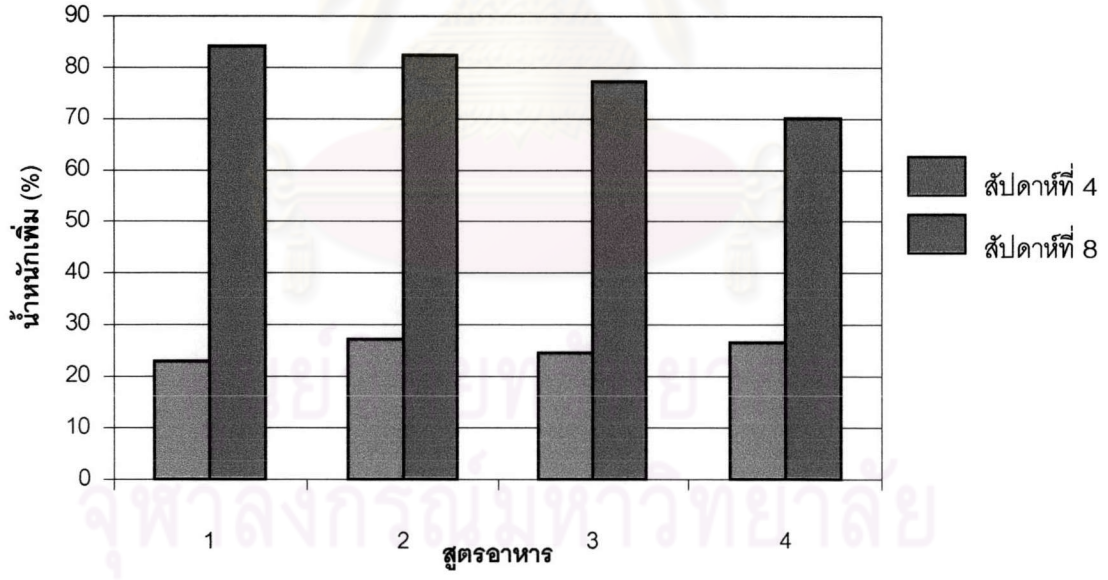
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม) ตลอดการทดลองที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนผงแห้งแตกต่างกัน

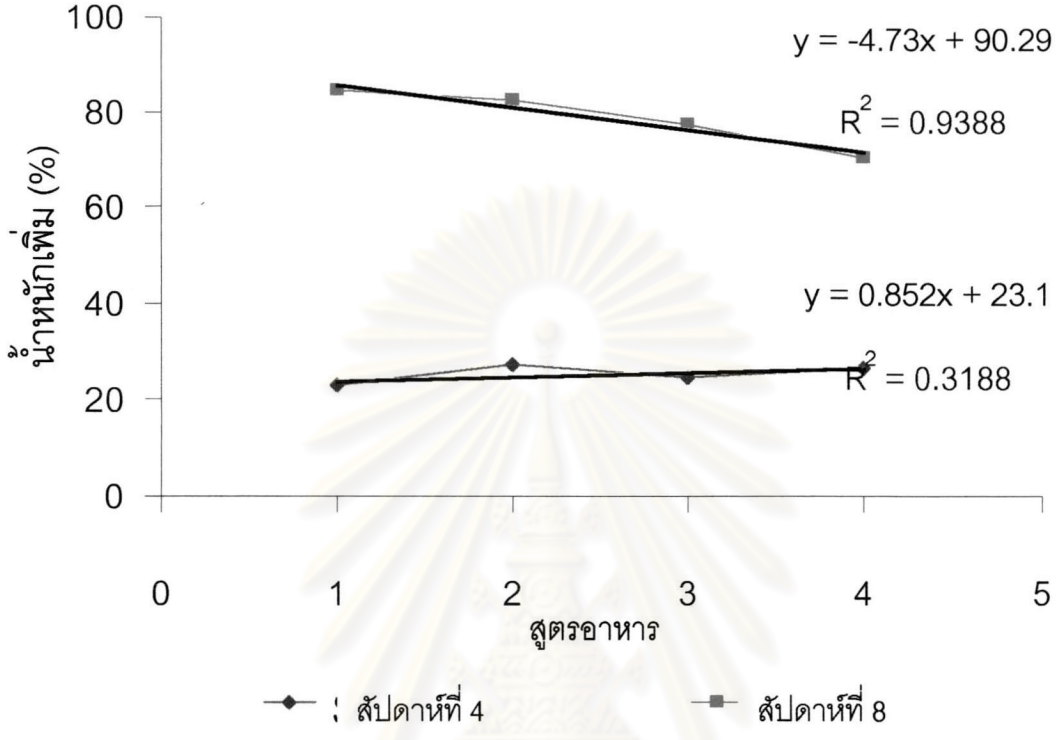
สัปดาห์ที่	อาหารสูตรที่			
	1	2	3	4
4	22.83 ± 5.78 (a)	27.07 ± 2.75 (a)	24.49 ± 4.51 (a)	26.53 ± 2.64 (a)
8	84.16 ± 8.05 (a)	82.34 ± 7.26 (a)	77.28 ± 10.78 (a)	70.08 ± 15.41 (a)

± = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a = ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)



รูปที่ 17 a แสดงน้ำหนักเพิ่ม (กรัม) ของปลา ตลอดการทดลองที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนผงแห้งแตกต่างกัน



รูปที่ 17 b แสดงน้ำหนักเพิ่ม (กรัม) ของปลาตลอดการทดลองที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนผงแห้งแตกต่างกัน

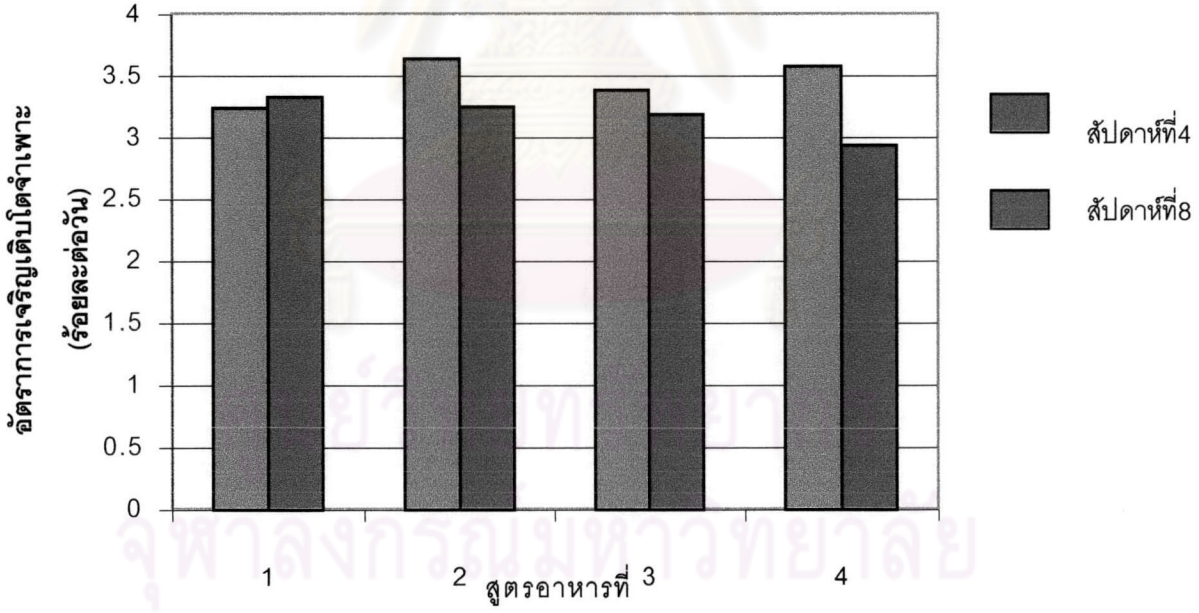
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 18 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ร้อยละต่อวัน) ของปลาที่ได้รับอาหารที่มี ระดับโปรตีนผงแห้งแตกต่างกัน

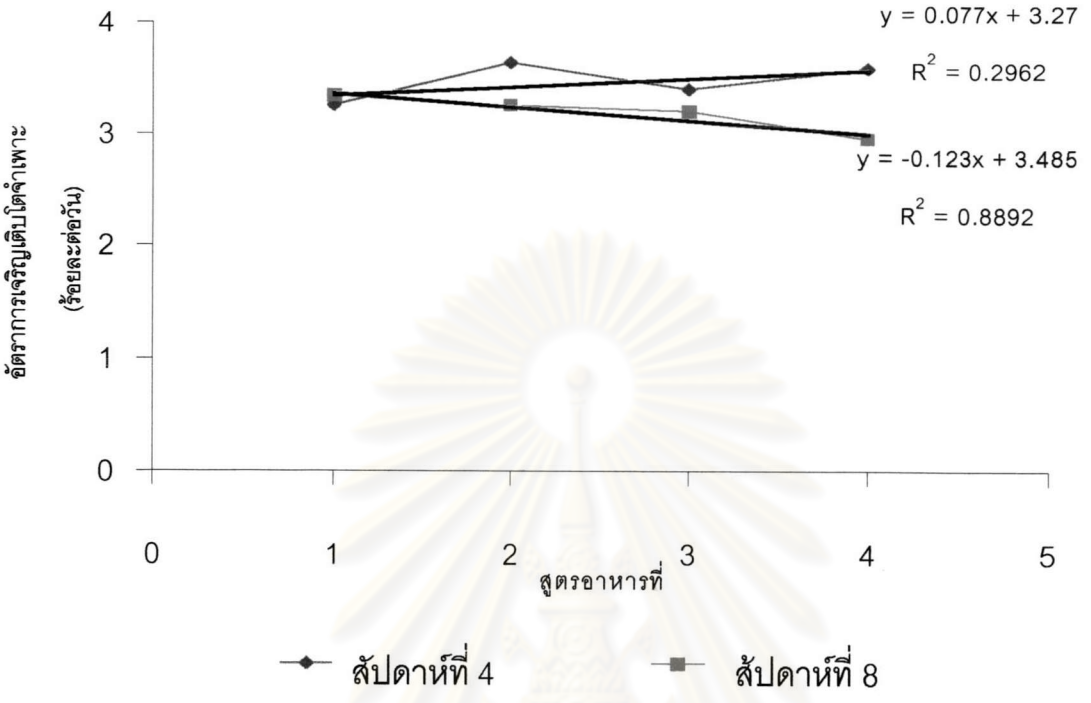
สัปดาห์ที่	อาหารสูตรที่			
	1	2	3	4
4	3.24 ± 0.54 (a)	3.64 ± 0.23 (a)	3.39 ± 0.41 (a)	3.58 ± 0.37 (a)
8	3.33 ± 0.15 (a)	3.25 ± 0.14 (a)	3.19 ± 0.21 (a)	2.94 ± 0.37 (a)

± = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a = ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)



รูปที่ 18 a แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ร้อยละต่อวัน) ของปลาที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนผงแห้งแตกต่างกัน



รูปที่ 18 b แสดงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ร้อยละต่อวัน) ของปลาที่ได้รับอาหารที่มีระดับโปรตีนผงแห้งแตกต่างกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 19 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 ($P < 0.05$)

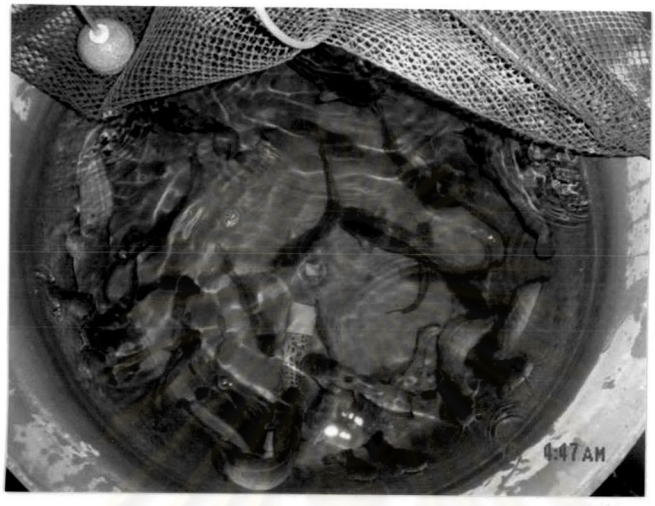
การตรวจหาโครเมียมในตัวปลา

ปริมาณโครเมียมในเนื้อและเครื่องในของปลาทดลองมีการสะสมต่ำกว่า 1 ppm

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 19 แสดงลักษณะของอาหารปลาที่ใช้ในการทดลอง

รูปที่ 20 สถานที่ที่ใช้ทดลอง



รูปที่ 21 ปลาดุกลูกผสมในบ่อที่ใช้ทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8 ต้นทุนของการผลิตตามสเกล (ปริมาตรอาหาร 3 ลิตร) ในขวดเขย่า (Shaking flask) 250 มิลลิลิตร

ตารางที่ 20 ต้นทุนของการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต

Cost Element	Cost in Shaking flask (บาท)
อาหารเลี้ยงเชื้อ (บาท)	40
ค่าไฟฟ้าและสาธารณูปโภค (บาท)	1,492.34
ค่าใช้จ่ายทั้งหมด (บาท)	1,532.34
Enzyme yield per batch 4,000 (Unit)	
Unit cost (U/บาท)	2.61 Unit/บาท

<u>ต้นทุนการผลิตโปรตีนผงในระดับ flask 250 มิลลิลิตร</u>

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

ต้นทุนการผลิตโปรตีนผงในหม้อ 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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย