บทที่ 3

วิธีการทดลอง

ก. การผลิตแอลคาไลน์โปรติเอส

3.1 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ระยะสั้น

เขี่ยเชื้อจาก stock แล้ว streak ลงบน Nutrient Agar (NA) slant บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนเชื้อเจริญเต็มที่ (ประมาณ 24 ชั่วโมง) พันจุกด้วยพาราฟิล์มเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บได้นานประมาณ 2-3 เดือน

3.1.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ระยะยาว

เลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่บรรจุ Nutrient broth ประมาณ 24 ชั่วโมง จนเชื้อเจริญอยู่ในช่วง log phase แล้วนำมาผสมกับกลีเซอรอล 50% พันจุกด้วยพาราฟิล์มเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เก็บได้นานประมาณ 1ปี

3.2 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (Starter inoculum)(เกษม พงษ์มณี, 2536)

เขี่ยเชื้อที่เก็บไว้ใน NA-slant นำมา streak บน Skim milk agar plate (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อจาก Skim milk agar plate 1-2 โคโลนี ใส่ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มด้วยเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ประมาณ 12-16 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างวัดความขุ่นของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ให้ได้ประมาณ 0.6

3.3 สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสในระดับขวดเขย่า (Shaking flask)

3.3.1 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตแอลคาไลน์โปรติเอส

เลี้ยงเชื้อในอาหารที่ประกอบด้วย 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 ทำการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่ได้จากน้ำเต้าหู้และ yeast extract และทำการแปรผันเปอร์เซนต์ไนโตรเจน ดังนี้คือ 0.1%, 0.3% และ 0.5% ไนโตรเจน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 rpm

3.4 การวิเคราะห์

3.4.1 การวัดแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรติเอส

นำส่วนน้ำใส (Crude enzyme) หรือสารละลายแอลคาไลน์โปรติเอสมาหาแอคติวิตี โดยบ่มตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร กับสารละลาย 0.2% Azocasein 1 มิลลิลิตร และคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 10.5 จำนวน 0.9 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างที่ควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำขึ้นจากอ่างน้ำอุ่นไปแช่ในอ่างน้ำเย็นทันที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 10% จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาแอคติวิตีของเอนไซม์

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร เปลี่ยนแปลงไป 0.1 หน่วยต่อนาทีในสภาวะที่กำหนดโดยมี Azocasein เป็นสารตั้งต้น

3.4.2 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด

ทำตามวิธี microprotein assay ของ Bradford (1976)

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

3.4.3 วัดการเจริญของเชื้อโดยวิธีนับเซลล์ที่มีชีวิต (Viable plate count)

ปิเปตเชื้อ 0.5 มิลลิลิตร ลงในน้ำเกลือปลอดเชื้อ (Sterile normal saline 0.85%) ปริมาตร4.5 มิลลิลิตร ทำการเจือจางแบบ serial dilution หลังจากนั้นปิเปตเชื้อที่เจือจางแล้ว 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร Nutrient Agar ใช้แท่งแก้วที่ปลอดเชื้อเกลี่ยให้ทั่ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลโดยการนับจุลินทรีย์จากที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี นำไปคำนวณจำนวนโคโลนีต่อ 1 มิลลิลิตร

3.4.4 ค่าความเป็นกรดด่าง นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการหมักในระยะเวลาต่างๆ ไปวัดค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก โดยการใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter)

3.5 การเตรียมแอลคาไลน์โปรติเอสในรูปผงโดยวิธีการระเหิดแห้ง (Lyophilization) **(ดัดแปลงจาก วิธีของ จันทิมา, 2539)**

นำน้ำหมักจากข้อ 3.3 ไปเหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ ด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เอาส่วนน้ำใสมาแช่ในอ่างน้ำแข็ง ตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยค่อยๆ เติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดทีละน้อย ให้ความเข้มข้นสุดท้าย 70% (472 กรัมต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร) คนเบาๆ ตลอดเวลาจนแอมโมเนียมซัลเฟตละลาย

หมดแล้ว จึงนำไปทิ้งไว้ในตู้เย็น 1 คืน เหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แล้วแยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอนมาละลายในคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนต pH 10.5 แล้วกำจัดเกลือส่วนเกินออกโดยการทำ dialysis ในสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนต บัฟเฟอร์ จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่ได้ มาทำให้แห้งด้วยวิธีการระเหิดแห้ง (Lyophilization) เก็บรักษาผงแอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้ ในภาชนะปิดสนิทเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

ข. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต

3.6 การเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเศษหนัง

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

3.6.1 การหาค่าความเป็นกรด-ด่าง ของตัวอย่างเศษหนัง (ASTM D 2810-72)

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

3.6.2 การหาปริมาณความชื้น (ASTM D 3790-79)

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

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

3.6.3 การหาปริมาณเถ้าทั้งหมด (ASTM D 2617-69)

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

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

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

3.6.4 การหาปริมาณโครมิกออกไซด์โดยวิธีเปอร์คลอริกแอซิดออกซิเดชั่น(ASTM D2807-93)

ชั่งตัวอย่าง 1-5 กรัม ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไปเผาหาปริมาณเถ้าตามวิธี 3.6.3 (ASTM D 2617-69) หลังจากนั้น ถ่ายเถ้าที่ได้ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร หรือในหลอดย่อย ถ้าย่อยด้วยเครื่องย่อย เติมกรดไนตริก กรดเปอร์คลอริกและกรดซัลฟิวริก ปริมาตร 20, 15 และ 10 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 4:3:2) ตามลำดับ ใส่ลูกแก้ว 4-5 ลูก ต้มตัวอย่างบนเตาไฟฟ้าในตู้ดูดควัน ภายใต้ภาวะรีฟลักซ์ จนกระทั่งสารอินทรีย์ถูกย่อยสลาย และโครเมียมถูกออกซิไดซ์ จนได้สารละลายใสสีส้ม ต้มต่อไปอีก 2 นาที ยกออกจากเตา และทำให้เย็นลง ล้างด้านข้างของขวดย่อยและเจือจางให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร ต้มต่อไปอีก7 นาที แล้วทำให้เย็นลง หลังจากนั้นเติมสารละลาย 40% กรดฟอสฟอริก 30 มิลลิลิตร และสารละลาย 10% โพแทสเซียมไอโอไดด์ 20 มิลลิลิตร ปิดขวดรูปชมพู่ด้วยจุกยาง นำไปตั้งทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 5 นาที แล้วไตเตรทด้วยสาร

เป็นเหลืองปนเขียว แล้วจึงเติมสารละลายน้ำแป้ง ความเข้มข้น 2% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ไตเตรทต่อไปจนสารละลายเปลี่ยนสีจากสีน้ำเงินเข้มเป็นสีเขียวใส บันทึกปริมาตรสารละลายมาตรฐาน 0.1 นอร์มอล โซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ คำนวณปริมาณโครมิกออกไซด์เป็นเปอร์เซ็นต์ จากสูตร

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

เมื่อ

A = ปริมาตรสารละลายมารฐาน 0.1 นอร์มอล โซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ (มิลลิลิตร)

B = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไธโอซัลเฟตที่ใช้ (นอร์มอล)

C = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ (กรัม)

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

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

เมื่อ D = ความชื้นของตัวอย่าง (เปอร์เซ็นต์)

3.6.5 การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธี Kjeldahl

ชั่งน้ำหนักแน่นอนของตัวอย่างมา 0.1-2 กรัมลงในหลอดใส่สารตัวอย่าง (ขึ้นอยู่กับปริมาณไนโตรเจนในสารตัวอย่าง) เติมตัวเร่งปฏิกิริยาผสมปริมาณ 3 กรัม และเติมกรดซัลฟุริกปริมาณ 20 มิลลิลิตร นำไปย่อยด้วยเครื่องย่อยไนโตรเจน ต้มเคี่ยวจนมีกลุ่มควันสีขาวเกิดขึ้นได้สารละลายใส ประมาณ 20-30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร โดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 35% ประมาณ 30-50 มิลลิลิตร นำตัวอย่างของเหลวในขวดเจลดาห์ลไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่นไอน้ำ โดยจุ่มปลายท่อลงในกรดบอริก 2% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่เติมอินดิเคเตอร์ผสม (ดังภาคผนวก) เก็บสารละลายส่วนที่กลั่นออกมา ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟุริก 0.1 นอร์มัล เมื่อถึงจุดยุติ สารละลายจะเปลี่ยนจาก

สารละลายสีเขียวอ่อนเป็นสารละลายสีม่วงอ่อน (Pale lavender) จดปริมาตรของกรดซัลฟุริก มาตรฐานที่ใช้ทำแบลงค์โดยใส่สารรีเอเจนต์ยกเว้นสารตัวอย่างแล้วนำไปกลั่น

การคำนวณ

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

เมื่อ N = ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายกรดซัลฟุริก (นอร์มัล)

A = มิลลิลิตรของกรดซัลฟุริกมาตรฐานที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่าง

B = มิลลิลิตรของกรดซัลฟุริกมาตรฐานที่ใช้ในการไตเตรทกับแบลงค์

W = น้ำหนักตัวอย่างที่ใช้ (กรัม)

3.6.6 การหาปริมาณไขมัน โดยวิธีสกัดซอกฮ์เลต (Soxhlet Extraction)

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

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

3.6.7 การหาปริมาณโครเมียม, แคลเซียม และแมกนีเซียม โดยวิธี Atomic Absorption Spectrophotometry

ชั่งตัวอย่าง 0.1-0.2 กรัม ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไปเผาเพื่อให้ได้เถ้าตามวิธี ASTM D 2617-69 นำเถ้าที่ได้ถ่ายใส่หลอดย่อยสำหรับเครื่องย่อย เติมกรดไนตริก 5 มิลลิลิตร กรดเปอร์คลอริก 4 มิลลิลิตร และกรดซัลฟุริก 3 มิลลิลิตร ใส่ลูกแก้ว 4-5 ลูก นำไปย่อยบนเตาหลุม ที่อุณหภูมิ 250 – 300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง จนได้ควันสีขาวของกรดเปอร์คลอริก จางหายไปเกือบหมด หลังจากนั้นทิ้งให้เย็นลง แล้วเติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร ถ่ายใส่ขวดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ปริมาตรธาตุ ด้วยเครื่องอะตอมมิคแอบซอบชั่นสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 357.9, 422.7 และ 285.2 นาโนเมตร สำหรับวิเคราะห์โครเมียม แคลเซียม และแมกนีเซียม ตามลำดับ เทียบกับกราฟ มาตรฐาน (ภาคผนวก ฉ)

ทุกตัวอย่างที่จะวัดปริมาณ Ca และ Mg ให้เติมสารละลาย La_2O_3 ให้มี La 10,000 ppm

3.7 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนออกจากเศษหนังโดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

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

นำเศษหนัง 2.5 กรัม มาแช่ในน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 6.5 % (w/v) โดยน้ำหนักของเศษหนัง นำไปเขย่าและให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 71°C ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker) ด้วยน้ำ ที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 90 นาที ยก

ออกจากเครื่องเขย่าทิ้งให้เย็นลง แล้วเติมเอนไซม์ โดยการแปรผันปริมาณเอนไซม์ ในช่วง 0-8% โดยน้ำหนักของเศษหนัง นำไปเขย่าโดยควบคุมอุณหภูมิ ที่ 45°ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ยกออกจากเครื่องเขย่า ตั้งทิ้งไว้ในห้องเย็น 1 คืน แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำไปอบไล่ความชื้น ชั่งน้ำหนักตะกอนโครเมียมและเศษหนังที่เหลืออยู่ (Chrome cake)

3.7.2 การลดปริมาณการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายเศษหนัง ทำการแปรผันปริมาณการใช้เอนไซม์ โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม (จากข้อ 3.7.1)

3.7.3 เปรียบเทียบวิธีการทำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตให้แห้งโดยวิธีระเหิดแห้งกับการอบแห้ง

3.7.4 ชนิดและปริมาตรน้ำที่เหมาะสมสำหรับการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยแปรผันชนิดของน้ำเป็น 2 ชนิดคือน้ำกลั่นและน้ำประปา ส่วนปริมาตรน้ำนั้นแปรผันเป็น 3 ระดับคือ 10,15 และ 20 เท่าของน้ำหนักหนังเริ่มต้น 2.5 กรัม (v/w) โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม (จากข้อ 3.7.2)

3.7.5 ขยายขนาดการทดลองการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ในหม้อต้มขนาด 20 ลิตร และขนาด130 ลิตร โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 3.7.3) เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการเพิ่มปริมาณการผลิตโปรตีนจากเศษหนังระดับอุตสาหกรรมต่อไป

3.7.5 นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

3.8 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต ได้แก่ pH และปริมาณของแข็งทั้งหมด โดยใช้วิธี (ASTM D 4906-95)

3.8.1 การหาปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS)

ปิเปตตัวอย่างสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต (protein hydrolysate solution) 10-50 มิลลิลิตร ใส่ในถ้วยกระเบื้องที่อบและชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว อบตัวอย่างในตู้อบที่ตั้งอุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นอบที่อุณหภูมิ 93 องศาเซลเซียส ต่อไปอีกเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเอาออกจากตู้อบ ทิ้งให้เย็น ในโถดูดความชื้น นาน 1 ชั่วโมง จนอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนัก แล้วนำไปอบต่อที่อุณหภูมิ 93 องศาเซลเซียส อีกครั้งละ 1 ชั่วโมง จนได้น้ำหนักคงที่ หรือน้ำหนักเปลี่ยนแปลงไม่เกิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ คำนวณปริมาณของแข็งทั้งหมด

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

3.8.2 การหาปริมาณเถ้า

นำตัวอย่างที่หาปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) จากข้อ 3.8.1 ไปเผาที่อุณหภูมิ 600±25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักหาปริมาณเถ้า

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

3.9 ทำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตให้เป็นผงแห้ง โดยวิธีข้อ 3.7.3

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผงโปรตีน ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความชื้น เถ้า ไนโตรเจน ไขมัน โครเมียม แคลเซียม แมกนีเซียม ฟอสฟอรัสและเส้นใย ตามวิธีในข้อ 3.6.1, 3.6.2, 3.6.3, 3.6.5, 3.6.6, 3.6.7, 3.9.1 และ 3.9.2 ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.9.1 การหาปริมาณฟอสฟอรัสโดยวิธี ICP atomic emission spectrometry

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

3.9.2 การหาปริมาณไฟเบอร์ โดยวิธี Acid Detergent Digestion

ชั่งตัวอย่างประมาณ 2 กรัม ใส่ในบีกเกอร์สำหรับย่อย ใส่ glass bead 3 เม็ด แล้วเติม 1.25% H_2SO_4 ที่ต้มเดือดประมาณ 200 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนเดือดนาน 30 นาที นำมากรองผ่านผ้ากรองแล้วล้างกากด้วยน้ำร้อนประมาณ 200 มิลลิลิตร จนหมดกรดแล้วถ่ายกากลงในบีกเกอร์สำหรับย่อย เติม 1.25% NaOH ที่ต้มเดือดประมาณ 200 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนเดือดนาน 30 นาที นำมากรองผ่านผ้ากรองแล้วล้างกากด้วยน้ำร้อนประมาณ 200 มิลลิลิตร จนหมดด่าง เอา glass bead ออกมาแล้วล้างกากด้วย 95 % alcohol ประมาณ 16-20 มิลลิลิตร ถ่ายกากลงใน crucible ใช้ 95% alcohol เล็กน้อยชะกากจากผ้ากรองลงใน crucible แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง นำมาทิ้งให้เย็นใน desiccator ชั่งน้ำหนัก (W_1) นำ crucible และกากหลังจากอบแห้งแล้วไปเผาใน furnance ที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส นานประมาณ 30 นาที นำมาทิ้งให้เย็นใน desiccator และชั่งน้ำหนัก (W_2)

วิธีคำนวณ

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

เมื่อ W คือน้ำหนักของตัวอย่าง

W_1 คือน้ำหนักของ crucible และกากหลังจากอบแห้งแล้ว

W_2 คือน้ำหนักของ crucible และเถ้าหลังจากเผาแล้ว

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

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

3.11 วิเคราะห์สัดส่วนกรดอะมิโนแต่ละชนิด (Amino acid composition)

นำโปรตีนไฮโดรไลเสตผงแห้ง จากข้อ 3.9 ไปวิเคราะห์สัดส่วนกรดอะมิโนแต่ละชนิด ด้วยเครื่อง HPLC (High performance liquid chromatography) ที่ฝ่ายเครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง อาคารปฏิบัติการวิจัยกลาง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ค. การผลิตอาหารปลาและการทดลองเลี้ยงในปลาดุกลูกผสม (*C. macrocephalus x C. gariepinus*)

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

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบ (% ของนน.แห้ง) ของอาหารที่ใช้ในการทดลอง

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ชนิดและปริมาณของวิตามินและแร่ธาตุที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อ	ปริมาณต่ออาหาร 1 กิโลกรัม
Vitamin A	4,000 หน่วยสากล
Vitamin B_{12}	0.2 มิลลิกรัม
D_3	2,000 หน่วยสากล
Vitamin E	50 หน่วยสากล
Menadione sodium bisulfite	10 มิลลิกรัม
Thiamine	20 มิลลิกรัม
Riboflavin	20 มิลลิกรัม
Niacin	150 มิลลิกรัม
Calcium panthothenate	200 มิลลิกรัม
Folic acid	5 มิลลิกรัม
Pyridoxine	20 มิลลิกรัม
Choline chloride	2,000 มิลลิกรัม
Biotin	2 มิลลิกรัม
Inositol	400 มิลลิกรัม
Manganese	25 มิลลิกรัม
Zinc	20 มิลลิกรัม
Copper	5 มิลลิกรัม
Iodine	5 มิลลิกรัม
Cobalt	0.05 มิลลิกรัม
Selenium	0.3 มิลลิกรัม
Iron	30 มิลลิกรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 กรดอะมิโนที่จำเป็นชนิดต่าง ๆ คิดเป็นร้อยละของน้ำหนักแห้งในอาหารแต่ละสูตร

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

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (ร้อยละ) ของน้ำหนักแห้งอาหารทดลองแต่ละสูตร

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.12.1 การวางแผนการทดลอง

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

ทรีตเมนต์ที่ 1 ใช้สูตรอาหารที่ 1 ที่ไม่ใส่โปรตีนไฮโดรไลเสตในอาหารทดลอง(สูตรควบคุม)

ทรีตเมนต์ที่ 2ใช้สูตรอาหารที่ 2ที่ใส่โปรตีนไฮโดรไลเสตแทนที่ปลาป่นในอาหารทดลอง อัตราร้อยละ 25

ทรีตเมนต์ที่ 3 ใช้สูตรอาหารที่ 3 ที่ใส่โปรตีนไฮโดรไลเสตแทนที่ปลาป่นในอาหารทดลอง อัตราร้อยละ 50

ทรีตเมนต์ที่ 4 ใช้สูตรอาหารที่ 4 ที่ใส่โปรตีนไฮโดรไลเสตแทนที่ปลาป่นในอาหารทดลอง อัตราร้อยละ 75

3.12.2 การทดลอง

ปลาในแต่ละถังทดลองได้รับอาหารแต่ละสูตรวันละ 3 ครั้ง เวลา 8.00 น. 11.00 น. และ 16.00 น. ทุกวันยกเว้นวันทำการชั่งวัดจะงดให้อาหาร แต่ละครั้งทำการนับและชั่งน้ำหนักรวมในแต่ละถังทดลองทุก ๆ 4 สัปดาห์ เพื่อตรวจสอบอัตรารอดและการเจริญเติบโต ปรับอาหารตามขนาดของปลาภายหลังการชั่งวัดแต่ละครั้ง (เมื่อครบ 8 สัปดาห์ ทำการตรวจนับจำนวนปลาที่เหลือและชั่งน้ำหนักรวมพร้อมทั้งทำการเก็บตัวอย่างปลาทดลอง ถังละ 5 ตัว เพื่อนำไปวิเคราะห์โครเมียม)

3.12.3 การศึกษาอิทธิพลของอาหาร

การวัดการตอบสนองของปลาต่ออาหารทดลองแต่ละสูตร พิจารณาจาก

1.น้ำหนักเพิ่มเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (weight Gain, WG)

น้ำหนักเพิ่ม = น้ำหนักเฉลี่ยของปลาหลังการทดลอง-น้ำหนักเฉลี่ยของปลาเมื่อเริ่มการทดลอง

2.อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่อวัน (Specific Growth Rate, SGR)

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

3. อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Feed Conversion Ratio, FCR)

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

4.อัตรารอด

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.12.4 วิธีวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การเปรียบเทียบข้อมูลอันเกิดจากความแตกต่างกันของอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงปลาทดลอง วิเคราะห์โดยวิธีวาเรียนซ์ (analysis of variance) และการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของการตอบสนองใช้วิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3.12.5 สถานที่และเวลาในการทดลอง

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย