หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์การวิจัย

Magnetic Stirrer, model Laboratory Stirrer Hot Plate, PC 101 บริษัท Corning Grasswork, U.S.A.

pH Meter, model pH M 83 Autocal pH meter Radiometer Copenhagen Denmark.

Spectrophotometer, Model Spectronic 2000 บริษัท Bausch & Lomb, U.S.A.

Top Bench Centrifuge, model Minor 35 บริษัท MSE Ltd., England.

Voxtex-Genie no. 3,061,280 model K-550-GE บริษัท Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y. 11716, U.S.A.

Water Bath, model A 4666 บริษัท Charlies Hearson & Co., Ltd.

Tensile Tester บริษัท Swick & Co., West Germany.

เครื่องเขย่า (Shaker) บริษัท Gallenkamp, England. (ภาคผนวกที่ 1)

ถังฟอกหนังขนาด 50 ลิตร (ภาคผนวกที่ 2) และ 300 ลิตร (ภาคผนวกที่ 3) สร้างโดยแผนกทดลอง ฝ่ายวิจัยและพัฒนา องค์การฟอกหนัง กระทรวงกลาโหม

อุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการฟอกหนังอื่น ๆ เช่น เครื่องรีดน้ำ เครื่องเจียหนัง เครื่องถากหนัง เครื่องอบแห้งแบบสูญญากาศ เครื่องอัดลาย เครื่องปัดฝุ่น ฯลฯ เป็นอุปกรณ์ภายในโรงงานขององค์การฟอกหนัง กระทรวงกลาโหม.

2.2 เคมีภัณฑ์

Bromelain powder (561.44 CDU/mg protein) จากโครงการผลิตโบรมีเลน จากต้นสับปะรด ภาควิชาชีวเคมีร่วมกับหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ โดยการตกตะกอนด้วยอะซิโตน (42), Casein (Hammersten) จากบริษัท BDH Chemical Ltd., England, Bovine Serum Albumin (BSA, grade VI) บริษัท Sigma Chemicals, U.S.A.

สารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการนอกเหนือจากนี้ เป็นสารที่ใช้วิเคราะห์ระดับ Reagent grade ได้จาก บริษัท BDH Chemical Ltd. England, บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A., และบริษัท Fluka, Switzerland เป็นส่วนใหญ่

Lutron-H, Oropon-N บริษัท Rohm & Haas Pennsylvania U.S.A., Polyzim 606 บริษัท Diamalt, Ammonium sulphate บริษัท T. Unchem ประเทศไทย, Sodium metabisulphite, Lime (Calcium hydroxide) บริษัท BASF Germany, Pancreatic 606, Baymon A,Mimosa, Tannigan, Retangen R7 , น้ำมัน TMK-E, น้ำมัน BZN เป็น Commercial grade จากบริษัท Bayer Germany.

สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการฟอกหนังนอกเหนือจากนี้ เป็นสารเคมีทางการค้าบริษัท Bayer Germany, บริษัท BASF, บริษัท Rhom and Haas U.S.A. และ บริษัท Diamalt เป็นส่วนใหญ่

2.3 การเตรียมสารละลาย

2.3.1 สารละลายไทโรซีนมาตราฐาน

เตรียมสารละลายกรดอะมิโนไทโรซีนความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ชั่งกรดอะมิโนไทโรซีน 0.01 กรัม ละลายในสารละลายกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 0.1 โมลาร์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.3.2 สารละลายวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

2.3.2.1 สารละลายเคซีน 0.6 เปอร์เซนต์

ละลายเคซีน 0.6 กรัมใน 0.05 โมลาร์โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 80 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอลิค

2.3.2.2 สารละลายที่ใช้เจือจางเอนไซม์

ใช้สารละลาย 0.05 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0-8.0 และ สารละลาย 0.05 โมลาร์ไกลซีนบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0-10.5

2.3.2.3 สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติค

ใช้เป็นสารละลายตกตระกอนโปรตีน ละลายกรดไตรคลอโรอะซิติค 17.963 กรัม ในสารละลายที่มีโซเดียมอะซิเตต 18.047 กรัม และกรดอะซิติค 18.83 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้าย 1000 มิลลิลิตร

2.4 การเตรียมหนังทดสอบ

เริ่มต้นจากหนังที่ผ่านขั้นตอนการลงปูนแล้ว เตรียมหนังเป็น 3 ขนาดคือ

- ขนาด 15 x 15 เซนติเมตร จากทั้ง 3 ส่วนคือ ส่วนท้อง ไหล่ และตะโพก เพื่อทดลองระดับขวดเขย่า
- ขนาด 45 x 45 เซนติเมตร จากทั้ง 3 ส่วนคือ ส่วนท้อง ไหล่ และตะโพก เพื่อทดลองในถังหมุนขนาด 50 ลิตร
- ใช้หนังชีกเพื่อทดลองในถังหมุนขนาด 300 ลิตร

2.5 การสร้างกราฟมาตราฐานของไทโรซีน

นำสารละลายไทโรซีนเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเจือจางให้มีความเข้มข้นของไทโรซีนเท่ากับ 20,40,60,80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร ใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริคเป็นหลอดควบคุม เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตรกับไมโครกรัมของไทโรซีน (ภาคผนวกที่ 4)

2.6 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

2.6.1 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยดัดแปลงวิธีของบริษัท Polymine (Taiwan)-

Corporation (105) ใช้เคซีนเป็นสับสเตรท โบรมีเลนจะไฮโดรไลซ์เคซีนให้เป็นกรดอะมิโนไนโตรเจน ซึ่งจะสามารถวัดการดูดกลืนแสงของอะมิโนไทโรซีนได้ที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ หน่วยของเอนไซม์วัดเป็น CDU (Casein Digestion Unit) คือไมโครกรัมของไทโรซีนที่ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ที่ 37 องศาเซลเซียส ในเวลา 1 นาที

ชั่งเอนไซม์ผงในปริมาณน้ำหนักที่แน่นอน ละลายในสารละลายที่ใช้เจือจางเอนไซม์แล้วปิเปต 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง นำไปแช่ในอ่างน้ำซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที แล้วจึงเติมสารละลายเคซีนปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่อุ่นล่วงหน้าไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 5 นาที นำไปอุ่นต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติค 5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วด้วยเครื่องเขย่า (vortex) อุ่นต่อไปที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 40 นาที จากนั้นนำไปเซนตริฟิวส์แยกส่วนน้ำใสมาวัดการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

สำหรับหลอดควบคุมให้เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติคลงในสารละลายปฏิกิริยาพร้อมกันกับเอนไซม์ก่อน ต่อจากนั้นดำเนินการทดลองด้วยวิธีการเดียวกันกับหลอดตัวอย่าง นำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากหลอดควบคุม ไปหักจากค่าการดูดกลืนแสงของหลอดตัวอย่าง แล้วจึงนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตราฐานไทโรซีน คำนวณหน่วยของแอคติวิตีเอนไซม์ได้โดย (105)

$$\text{CDU/mg} = \frac{E-E_o}{E_s} \times 50 \times \frac{11}{10} \times \frac{1}{W}$$

W = น้ำหนักของเอนไซม์เป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารละลายเอนไซม์

E = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

E_o = ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม

E_s = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตราฐานที่ 50 ไมโครกรัมไทโรซีน

2.6.2 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในสารละลายน้ำแช่หนัง

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 2.6.1 แต่ใช้น้ำแช่หนังที่ผ่านการล้างปูน (deliming solution) และปรับค่าพีเอชให้ได้ประมาณ 8.0-9.0 เป็นแหล่งของเอนไซม์ และใช้สารไฮโดรไลซ์เคซีนเป็นสับสเตรทเช่นเดียวกัน

2.7 การทดลองใช้เอนไซม์ในกระบวนการฟอกหนังระดับขวดเขย่า

ใช้หนังที่ผ่านขั้นตอนการลงปูน (liming process) ซึ่งมีพีเอชสูงประมาณ 11-12 เป็นวัตถุดิบ ในขวดเขย่าขนาด 2 ลิตร ความเร็ว 100 รอบต่อนาที โดยนำหนังไปล้างปูนออกก่อน 2 ครั้ง แล้วเติมน้ำลงไป 150 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักหนัง เติมแอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ และไบมอล-เอ เท่ากับ 1.0, 0.5, และ 0.1 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักหนัง หลังจากทำปฏิกิริยา 20 นาทีเติมแอมโมเนียมซัลเฟตอีก 1.0 เปอร์เซนต์ เมื่อครบ 15 นาที จึงเติมเอนไซม์ในความเข้มข้นที่เหมาะสม ปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ขั้นตอนที่ผ่านมานี้เรียกว่าขั้นตอนเตรียมการฟอก หนังที่ได้ยังคงเป็นหนังดิบ (hides) ต้องทำการฟอกต่อไปตามกรรมวิธีการฟอกหนัง โดยส่งต่อไปยังกระบวนการฟอกฝาดหรือกระบวนการฟอกโครม (รูปที่ 4) (ภาคผนวกที่ 5) เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการฟอกฝาดหรือฟอกโครมแล้วจะได้หนังฟอกสำเร็จรูป นำไปทดสอบคุณภาพของหนังต่อไป

2.8 วิธีผลิตหนังสำเร็จรูปในระดับจำลองอุตสาหกรรม

2.8.1 การทดลองในถังหมุนขนาด 50 ลิตร

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.7 แต่ใช้หนังทดสอบขนาด 45 x 45 เซนติเมตร (ข้อ 2.4)

2.8.2 การทดลองในถังหมุนขนาด 300 ลิตร

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.7 แต่ใช้หนังทดสอบเป็นหนังซีก (ข้อ 2.4)

2.9 วิธีทดสอบคุณภาพของหนัง

2.9.1 การทดสอบคุณภาพหนังดิบ

หนังที่ผ่านการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์แล้ว สามารถทดสอบคุณภาพได้โดยวิธีการสัมผัส (Fingerprint) โดยการกดนิ้วมือลงบนหนังแล้วสังเกตรอยนิ้วมือที่ปรากฏ (63)

2.9.2 การทดสอบคุณภาพหนังฟอกสำเร็จรูป

หลังจากเสร็จสิ้นขั้นตอนการฟอก และตกแต่งหนังสำเร็จรูปแล้ว จะทำการทดสอบลักษณะทางกายภาพเช่น แรงดึง (tensile strength) การยืดตัว (elongation) และแรงฉีก (tear strength) ใช้วิธีตามมาตราฐานกระทรวงอุตสาหกรรม (73,106,107) (ภาคผนวกที่ 6-8)

2.10 การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติ

เปรียบเทียบข้อมูลที่ได้โดยใช้ค่าทดสอบ t (ภาคผนวกที่ 9)

รูปที่ 4 กระบวนการและขั้นตอนการฟอกหนัง

เวลาที่ใช้	ขั้นตอน
	หนังที่ผ่านการลงปูน (Unhaired hides)
	↓
20 นาที	150 % H_2O
	1.0 % Ammonium sulphate
	0.5 % Sodium metabisulphite
	0.1 % Baymol-A
	↓
15 นาที	1.0 % Ammonium sulphate
	↓
30 นาที	0.2 % Bating agent
	↓
	Phenolphthalein-Test (colourless)
	Fingerprint-Test
	↓
	ล้างหนัง
	↓
15 นาที	100 % H_2O
	12 % เกลือแกง
	↓
15 นาที	3.0 % Formic acid
	↓
15-16 ชั่วโมง	0.9 % H_2SO_4
	↓
30 นาที	4 % Chrome
30 นาที	4 % Chrome
	↓
8 ชั่วโมง	0.6 % Neutrigan MO
	↓
	ทดสอบหนังโดยการต้ม
	↓
	รีดน้ำ ผ่าหนังบางตามต้องการ
	↓
	ชั่งน้ำหนักหนัง
	ล้างหนัง

ชั่งน้ำหนักหนัง

ล้างหนัง

|

30 นาที — 150 % H_2O

1.0 % Sodium bicarbornate

2.0 % Sodium formate

|

ล้างหนัง

|

60 นาที — 150 % H_2O

3.0 % Tannigan QF

2.0 % Mimosa

1.5 % Retangen R7

|

ล้างหนังด้วยน้ำร้อน 60 °C

|

15 นาที — 150 % H_2O ,60 °C

0.6 % สีดำผง

|

15 นาที — 0.2 % Formic acid

|

45 นาที — 4.0 % TMK-E

3.0 % BZN

|

20 นาที — 1.0 % Formic acid

|

ล้างหนัง

|

20-24 ชั่วโมง — พาดราวไว้

|

รีดน้ำ

|

ทำหนังแห้ง

|

ตกแต่งหนัง

|

ทดสอบคุณลักษณะทางกายภาพ