180602

กฤษฎา วสันต์ธนารัตน์ : การแยกโปรตีนจากเศษหนังฟอกโครมด้วยแอลคาไลน์โปรติเอส เพื่อใช้เป็นอาหารปลา. (PROTEIN REMOVAL FROM CHROME - CONTAINING LEATHER WASTE BY ALKALINE PROTEASE FOR FISH NUTRITION) อ.ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์นภา ศิวรังสรรค์ , 144 หน้า, ISBN 974-17-2901-4

Bacillus subtilis TISTR 25 สามารถผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ในปริมาณสูงเมื่อเลี้ยงในขวดเขย่า โดยใช้สูตรอาหารที่ประกอบด้วย 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 ที่มี yeast extract 0.3% ไนโตรเจน ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 rpm เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 14.64 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 36

สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากเศษหนังฟอกโครมโดยใช้แอลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 คือ ต้มเศษหนังที่อุณหภูมิ 71 °C โดยเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 6.5 % (w/v) เพื่อปรับให้มี pH 10.5 เวลาที่เหมาะสมในการย่อย คือ 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 45 °C และปริมาณแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรติเอสที่ใช้ คือ10 ยูนิต ต่อน้ำหนักหนัง 2.5 กรัม น้ำที่เหมาะสมในการทดลองในการต้มหนัง คือ น้ำประปา ปริมาณ 15 เท่าของน้ำหนักหนัง วิธีการที่เหมาะสมในการทำให้สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตแห้งคือการอบแห้ง ไม่พบเชื้อที่ทำให้เกิดโรค ปากและเท้าเปื่อย, แอนแทรกซ์ และไม่พบ *Salmonella sp., Shigella sp.* และ *E. coli* ในเศษหนังฟอกโครมและโปรตีนผงแห้ง

เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเสตไปแทนที่ปลาป่นในอาหารปลาดุกลูกผสมในระดับ 0%, 25%, 50% และ 70% (w/w) พบว่าหลังจากนำอาหาร 4 สูตรนี้ไปเลี้ยงปลาดุกลูกผสมขนาดเริ่มต้น 40 กรัม ได้ผลการทดลอง คือ น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (กรัม) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ร้อยละต่อวัน) อัตราการรอด และอัตราแลกเนื้อ มีค่าทางสถิติไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) โดยระดับโปรตีนที่เหมาะสมในการแทนที่ปลาป่นอยู่ในช่วง 25-50 % (w/w)

180602

##4272209023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORD : CHROME SHAVING/ PROTEASE/ PROTEIN

KRITSADA WASANTANARUT: PROTEIN REMOVAL FROM CHROME - CONTAINING LEATHER WASTE BY ALKALINE PROTEASE FOR FISH NUTRITION. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. NAPA SIWARUNGSON, 144 pp. ISBN 974-17-2901-4

Bacillus subtilis TISTR 25 can produce high amount of alkaline protease in shaking flask. Culture media contained KH_2PO_4 0.1 % (w/v) , $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v) , $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), glucose 0.5 % (w/v) and yeast extract with nitrogen content 0.3% (w/v) initial pH at 7.0, temperature at 37 °C and agitation speed of 250 rpm. The highest amount of alkaline protease produced was 14.64 Unit/mg protein at 36 hours.

The optimal condition for protein hydrolyzate removal from chrome shavings by alkaline protease from *Bacillus subtilis* TISTR 25 were pretreated at a temperature 71 °C and pH 10.5 adjusted by adding 6.5% (w/v) calcium hydroxide, then performing enzyme hydrolysis with 10 unit enzyme per 2.5 g shaving weight in tap water 15 fold of shaving weight. The protein hydrolyzate was oven-dried. There were no microorganisms causing Foot and Mouth disease or Anthrax, *Salmonella* sp., *Shigella* sp. and *E. coli* detected in chrome shavings and protein hydrolyzate.

The hydrolyzate protein was used in replacement of fishmeal in fish feed for hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* x *Clarias gariepinus*) at the inclusion levels of 0, 25, 50 and 75% (w/w) respectively. Four diets treatments on hybrid catfish (40 g) were experimented. The results showed weight gain, specific growth rate, survival rate and feed conversion rate were not significant difference at $p > 0.05$. The optimum protein level for replacing fishmeal was in the range of 25-50% (w/w).