บทสรุปผู้บริหาร

ชื่อโครงการ การผลิตเปปโตนจากเศษเหลือจากปลาโดยแบคทีเรียโปรติโอไลติก เพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

Peptone production from fish waste by proteolytic bacteria for use as microbial growth media

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ธันวาคม 2553 – 30 เมษายน 2555

ความเป็นมาของปัญหา

จากการขยายตัวของอุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์น้ำ ทำให้มีเศษเหลือใช้จากกระบวนการแปรรูปเกิดขึ้นมาก ซึ่งเศษเหลือเหล่านี้มีมูลค่าต่ำ และหากมีการจัดการที่ไม่ดีพอจะเกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมได้ ในกระบวนการแปรรูปปลาจะก่อให้เกิดเศษเหลือประมาณร้อยละ 30 ถึง 35 ที่พบมากคือ เครื่องใน หนัง เกล็ด โครงและก้าง เศษเหลือเหล่านี้ประกอบด้วยโปรตีนและกรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมาณสูง ดังนั้นจึงมีการนำเศษเหลือดังกล่าวมาใช้ให้เกิดประโยชน์หรือเพิ่มมูลค่า โดยนำมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซท (protein hydrolysate) เปปโตน (peptone) หรือสารสกัดจากปลา (fish extract) เป็นต้น ในกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทอาจใช้กรดหรือด่าง หรือเอนไซม์ในการย่อยสลาย แต่การใช้กรดหรือด่างในกระบวนการย่อยสลายนั้นทำให้คุณสมบัติเชิงหน้าที่ลดลง จึงมีการแก้ไขปัญหาดังกล่าวโดยการนำเอนไซม์ที่สกัดได้จากแหล่งต่างๆ มาใช้แทน เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูง เพราะเอนไซม์จะมีความจำเพาะต่อสับสเตรท (substrate) ความเป็นกรด-ด่าง ความคงตัวต่อความร้อน ตัวกระตุ้นและตัวยับยั้ง อีกทั้งสภาวะในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์นั้นไม่รุนแรง ทำให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีคุณภาพดีและมีสมบัติเชิงหน้าที่ตามต้องการ แต่ข้อจำกัดของการใช้เอนไซม์คือมีต้นทุนในการผลิตที่สูง ทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์มีราคาแพง จึงมีการนำเอนไซม์โปรติโอไลติก (proteolytic enzyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอสที่ได้จากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ มาใช้ในกระบวนการย่อยสลาย เอนไซม์โปรติเอสที่ถูกนำมาผลิตใช้ในเชิงการค้าส่วนใหญ่ผลิตจากแบคทีเรียสกุลบาซิลลัส (*Bacillus* sp.) โดยมีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายทั้งในทางอุตสาหกรรม เกษตรกรรม เภสัชกรรม และทางการแพทย์ เป็นต้น

ดังนั้น เพื่อเป็นการลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม เพิ่มประโยชน์หรือเพิ่มมูลค่าเศษเหลือจากปลาน้ำจืด และลดการนำเข้าวัสดุอาหารเลี้ยงเชื้อจากต่างประเทศ จึงเป็นมูลเหตุใน

การศึกษาการผลิตเปปโตนจากเศษเหลือจากปลาโดยใช้แบคทีเรียโปรติโอไลติก โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียโปรติโอไลติก เพื่อเหนี่ยวนำให้เชื้อสร้างเอนไซม์โปรติเอสออกมาย่อยโปรตีนในสารตั้งต้น ทำการศึกษาทั้งสภาวะการผลิต การนำไปใช้ประโยชน์ และทดสอบประสิทธิภาพของผลผลิตที่ได้โดยเปรียบเทียบกับเปปโตนทางการค้า

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปปลา
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเปปโตนด้วยแบคทีเรียโปรติโอไลติก
3. ศึกษาปริมาณและองค์ประกอบของผลิตผลที่ได้จากการผลิตเปปโตนเทียบกับเปปโตนทางการค้า
4. ทดสอบประสิทธิภาพผลผลิตที่ได้ในการใช้เป็นอาหารสำหรับจุลินทรีย์ของเปปโตนที่ผลิตได้เทียบกับเปปโตนทางการค้า

ผลการทดลอง

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเครื่องในปลาทับทิม พบว่า มีองค์ประกอบหลักคือน้ำ ร้อยละ 76.30 รองลงมาคือโปรตีน ร้อยละ 14.90 นอกจากนี้มีไขมันและเถ้า ร้อยละ 2.28 และ 1.64 โดยน้ำหนัก โดยพบว่าปริมาณโปรตีนในตัวอย่างอยู่ในสัดส่วนที่เหมาะสม ในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซทได้เป็นอย่างดี
2. การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TISTR 008 และ *B. cereus* TISTR 687 โดยใช้นมพร่องมันเนย (skim milk) เป็นแหล่งโปรตีนในการทดสอบ พบว่า *B. subtilis* TISTR 008 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสออกมาย่อยสลายโปรตีนได้ดีกว่า *B. cereus* TISTR 687
3. การศึกษาระดับการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ของตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิม โดยวัดระดับการย่อยสลายทันทีหลังจากนำเครื่องในออกจากปลาทับทิม พบว่า ร้อยละของระดับการย่อยสลายอยู่ที่ 21.14 เนื่องจากเกิดการย่อยสลายตัวเองจากเอนไซม์ที่มีอยู่แล้วในตัวปลา
4. การศึกษาสภาวะการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียต่อร้อยละระดับการย่อยสลายของตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมเปรียบเทียบกับการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) พบว่าทั้งตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมที่ทำการเพาะเชื้อ *B. subtilis* TISTR 008 และตัวอย่างควบคุมให้

ระดับการย่อยสลายสูงที่สุดที่สภาวะเดียวกัน คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

5. การศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายเครื่องในปลาทับทิม พบว่า การย่อยสลายตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมที่เติม *B. subtilis* TISTR 008 ที่สภาวะของค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ให้ค่าร้อยละของระดับการย่อยสลายและปริมาณโปรตีนสูงที่สุด

6. การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิม ที่เติม *B. subtilis* TISTR 008 ที่สภาวะความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจะเพิ่มขึ้นในช่วง 18 ชั่วโมงแรก

7. การศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์ที่สภาวะการย่อยสลายของตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิม ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่า จำนวนเชื้อและระดับการย่อยสลายที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์กัน เป็นผลให้มีปริมาณโปรตีนในสารละลายเพิ่มขึ้นตามไปด้วย โดยพบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งค่าความเป็นกรด-ด่างที่ลดลง กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและการเจริญของแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้น อย่างรวดเร็วที่เวลา 0 ถึง 6 ชั่วโมงแรก ดังนั้น ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมงจึงเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสภาวะในการย่อยสลายที่ดีที่สุด

8. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี กายภาพ และจุลินทรีย์ของเปปโตนที่ผลิตได้จากเครื่องในปลาทับทิม

a. องค์ประกอบทางเคมีของเปปโตนที่ผลิตได้จากการย่อยสลายเครื่องในปลาทับทิมที่มีการเติม *B. subtilis* TISTR 008 ที่สภาวะความเป็นกรด-ด่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยเปรียบเทียบกับเปปโตนทางการค้า (Bacto-peptone ของบริษัท Difco) พบว่า เปปโตนที่ผลิตได้จากตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมให้ปริมาณโปรตีนและเถ้าที่น้อยกว่า แต่มีปริมาณความชื้นและไขมันสูงกว่าเปปโตนทางการค้า

b. กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในเปปโตนที่ผลิตได้จากเครื่องในปลาทับทิม มีจำนวนของกรดอะมิโนครบทั้ง 18 ชนิดเหมือนกับเปปโตนทางการค้า แต่แตกต่างกันที่ปริมาณของกรดอะมิโนแต่ละชนิดเท่านั้น

c. คุณภาพสีของเปปโตนที่ผลิตได้จากเครื่องในปลาทับทิม พบว่า มีค่าความสว่าง (L*) และค่าสีเหลือง (b*) น้อยกว่าเปปโตนทางการค้า แต่มีค่าสีเขียว (-a*) ที่มากกว่า โดยเปปโตนที่ผลิตได้มีสีน้ำตาลเข้มอมเขียว ทึบแสง

d. ปริมาณจุลินทรีย์ตามมาตรฐานโปรติเอสเปปโตน พบว่า จุลินทรีย์ที่พบในเปปโตนที่ผลิตได้จากเครื่องในปลาทับทิมมีค่าไม่เกินกว่ามาตรฐานที่กำหนดไว้ และไม่พบ *Coliforms* และ *Salmonella*

9. การทดสอบประสิทธิภาพของเปปโตนที่ผลิตได้ในการเป็นอาหารสำหรับจุลินทรีย์ พบว่า เปปโตนที่ผลิตได้ให้ผลในการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* TISTR 008, *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* TISTR 118 ได้ดีกว่าเปปโตนทางการค้า โดยดูได้จากน้ำหนักแห้งและจำนวนโคโลนีที่เพิ่มขึ้นของเชื้อทั้ง 3 ชนิด

ผลลัพธ์ของโครงการ

1. ได้ข้อมูลองค์ประกอบทางเคมีของเศษเหลือจากการแปรรูปปลาที่เหมาะสมในการนำมาสกัดเปปโตน
2. ได้ข้อมูลสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเปปโตนจากเครื่องในปลาทับทิม
3. ได้ข้อมูลปริมาณร้อยละของผลผลิตแห้งเทียบกับวัตถุดิบที่ใช้
4. ได้ข้อมูลองค์ประกอบทางเคมี กรดอะมิโน และคุณภาพของเปปโตนที่ผลิตได้
5. ได้ข้อมูลประสิทธิภาพในการเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ของเปปโตนที่ผลิตได้
6. ส่งเสริมการผลิตนิสิตปริญญาโท 1 คน คือ นางสาว อรพรรณ พยัฆกุล
7. นำเสนอในการประชุมวิชาการ ภาคบรรยาย:

อรพรรณ พยัฆกุล ปวีนา น้อยทัพ วรสิทธิ์ โทจำปา และอรอินทุ์ ประไชโย. 2554. ประสิทธิภาพในการย่อยเครื่องในปลาทับทิม *(Oreochromis niloticus)* ด้วยเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 008 ที่สภาวะต่างๆ. Proceeding การประชุมวิชาการ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 3 วันที่ 14 – 15 มีนาคม 2554 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก. หน้า 85 – 89.

8. จัดแสดงนิทรรศการ “โปรตีนปลาไฮโดรไลเซท” ใน งานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 9 วันที่ 27 – 30 กรกฎาคม 2554 ณ คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.
9. นำเสนอในการประชุมวิชาการ ภาคบรรยาย:

อรพรรณ พยัฆกุล วรสิทธิ์ โทจำปา อรอินทุ์ ประไชโย และปวีนา น้อยทัพ. 2554. ประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *Bacillus cereus* TISTR 687 ในการย่อยเครื่องในปลาทับทิม. การประชุมวิชาการ นเรศวรวิจัย 7 วันที่ 29 – 30 มีนาคม 2554 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก. หน้า 449 – 456.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง “การผลิตเปปโตนจากเศษเหลือจากปลาโดยแบคทีเรียโปรติโอไลติกเพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์” ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2554 งานวิจัยประสบผลสำเร็จตามวัตถุประสงค์ได้ด้วยดี ทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบคุณ นางสาวอรรณพรรณ พยัฆกุล นิสิตปริญญาโท และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทดลองตลอดระยะเวลาที่ดำเนินการวิจัย

คณะผู้วิจัย

เมษายน 2555