ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์

การวิเคราะห์ทางกายภาพ

1. **สีของเปปโตนผง** (colour) (AOAC, 1990)

นำเปปโตนผงแห้งมาวัดค่าสีด้วยเครื่อง Hunter Lab รุ่น DP 9000 ซึ่งบันทึกค่าในระบบ CIE Lab วัดค่า L* a* และ b* และรายงานผลเป็นค่า

ค่า L* คือ ค่าแสดงความสว่างของสี ซึ่งค่า L* มีค่า 0 ถึง 100 ถ้าค่า L* มาก แสดงว่าสีสว่างมาก โดยที่ระดับ L* เท่ากับ 0 จะเป็นสีดำ

ค่า a* คือ ค่าแสดงระดับสีแดง-เขียว เมื่อค่า a* มีค่าเป็นบวกแสดงถึงลักษณะสีแดง และเมื่อค่า a* เป็นลบจะแสดงลักษณะสีเขียว โดยที่เมื่อค่าห่างจาก 0 มากแสดงถึงค่าสีแดง หรือสีเขียวมากขึ้น

ค่า b* คือ ค่าแสดงระดับสีเหลือง-น้ำเงิน เมื่อค่า b* มีค่าเป็นบวกแสดงถึงลักษณะสีเหลือง และเมื่อค่า b* เป็นลบจะแสดงลักษณะสีน้ำเงิน โดยที่เมื่อค่าห่างจาก 0 มากแสดงถึงค่าสีเหลือง หรือน้ำเงินมากขึ้น

การวิเคราะห์ทางเคมี

1. **ค่าความเป็นกรด-ด่าง** (pH) (AOAC, 2000)

ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดแล้ว 25 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องวัดกรด-ด่าง

2. **ปริมาณความชื้น** (moisture) (AOAC, 2000)

อบจานอะลูมิเนียมพร้อมด้วยฝาปิดในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง นำมาใส่ในเดซิเคเตอร์ (desiccator) ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำไปชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน ชั่งตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ใส่ในจานอะลูมิเนียมให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 2 ถึง 5 กรัม แล้วนำเข้าอบ.oตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง นำมาใส่ในเดซิเคเตอร์ทิ้งไว้ให้เย็น นำมาชั่งน้ำหนัก แล้วนำตัวอย่างไปอบซ้ำอีกจนได้น้ำหนักที่คงที่

การคำนวณ

คำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

3. **ปริมาณเถ้า** (ash) (AOAC, 2000)

นำจานกระเบื้องเคลือบมาเผาและชั่งน้ำหนักให้ได้น้ำหนักแน่นอน แล้วชั่งตัวอย่างประมาณ 5 กรัม ใส่ในจานกระเบื้องเคลือบ นำไปเผาด้วยไฟอ่อนๆ จนหมดควัน แล้วนำมาเผาในเตาเผาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 2 ถึง 3 ชั่วโมง จนกระทั่งได้เถ้าสีขาว นำออกมาใส่ในเดซิคเคเตอร์ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมาชั่ง จากนั้นนำมาเผาต่อจนได้น้ำหนักต่างกันไม่เกิน 12 มิลลิกรัม จดน้ำหนักที่น้อยที่สุด ถือเป็นน้ำหนักของจานกระเบื้องเคลือบและตัวอย่างเผาจนได้น้ำหนักคงที่

การคำนวณ

คำนวณหาปริมาณเถ้าจากสูตร

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

4. **ปริมาณโปรตีน** (protein) (AOAC, 2000)

ชั่งตัวอย่างน้ำหนักที่แน่นอนอยู่ในช่วง 1 ถึง 2 กรัม ใส่หลอดย่อย เติมสารเร่งปฏิกิริยาและสารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้นร้อยละ 96 ปริมาตร 20 ถึง 25 มิลลิลิตร นำหลอดย่อยต่อเข้ากับชุดเครื่องย่อย ทำการย่อยที่อุณหภูมิ 360 ถึง 400 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง จนได้สารละลายสีเขียวใส ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปกลั่นในชุดกลั่นโดยเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เก็บส่วนที่กลั่นได้ในสารละลายกรดบอริก (boric acid) ความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่มีอินดิเคเตอร์ผสมอยู่ ปฏิกิริยาจะควบแน่นจนหมด จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 150 มิลลิลิตร ไตเตรทส่วนที่กลั่นได้ด้วยสารละลายกรดไฮโดรลคลอริกความเข้มข้นร้อยละ 0.1 N ที่จุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเตรท

การคำนวณ

การคำนวณปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

$$\text{ไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen)} = \frac{(v_2 - v_1) \times M \times 1.407}{wt} \quad \text{(g/L)}$$

เมื่อ wt คือ ปริมาณสารตัวอย่าง (g หรือ ml)

v_1 คือ ปริมาตรของ standard HCl ที่ใช้ไตรเตรท blank (ml)

v_2 คือ ปริมาตรของ standard HCl ที่ใช้ไตรเตรทสารตัวอย่าง (ml)

M คือ ความเข้มข้นของ standard HCl (Molar)

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{(v_2-v_1)\ M \times 14.07 \times \text{Factor}}{\text{wt}}$$

เมื่อ v_1 คือ ปริมาตรของ standard HCl ที่ใช้ไตรเตรท blank (ml)

v_2 คือ ปริมาตรของ standard HCl ที่ใช้ไตรเตรทสารตัวอย่าง (ml)

M คือ Molarity ของ standard HCl

wt คือ น้ำหนักเป็นกรัมของตัวอย่าง

Factor = 6.25 ซึ่งเป็นค่าทั่วไปที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณร้อยละของโปรตีน

5. **ปริมาณไขมัน** (lipid) (AOAC, 2000)

ชั่งตัวอย่างใส่ thimble ประมาณ 5 กรัม นำ thimble ดังกล่าวไปใส่ในเครื่อง extraction unit จากนั้นชั่งน้ำหนักของ extraction cup เติมตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ลงใน extraction cup ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปใส่ในเครื่อง extraction unit ทำการสกัด (boiling) นาน 20 นาทีและทำการชะล้าง (rinsing) นาน 45 นาที แล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อระเหยตัวทำละลายออกไป จากนั้นนำไปเก็บในเดซิคเคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็น และนำมาชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{(W_3 - W_1) \times 100}{W_2}$$

เมื่อ W_1 คือ น้ำหนักถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้ว

W_2 คือ น้ำหนักตัวอย่าง

W_3 คือ น้ำหนักถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้วและตัวอย่างหลังการอบ

6. กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

6.1 สารเคมี

6.1.1 สารละลายเคซีน (casein) จะใช้สารละลายเคซีนร้อยละ 2 เป็นสับสเตรท เตรียมโดยชั่งเคซีน 2 กรัม ต้มด้วย NaOH 0.1 M 25 มิลลิลิตร จนกระทั่งเคซีนละลายหมด ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.5 และปรับปริมาตรด้วย phosphate buffer 0.05 M ให้เป็น 100 มิลลิลิตร

6.1.2 สารละลาย trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ใช้เพื่อหยุดกิจกรรมเอนไซม์ เตรียมโดยชั่ง trichloroacetic acid 10 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

6.2 การวิเคราะห์

6.2.1 นำสารละลายเอนไซม์มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย glycine-NaOH buffer 0.05 M ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5

การเตรียม phosphate buffer (ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 ถึง 8.0)

สารละลาย A : 0.2 M monobasic sodium phosphate (NaH_2PO_4. $2H_2O$ 31.2 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : 0.2 M dibasic sodium phosphate (Na_2HPO_4. $7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ Na_2HPO_4. $12H_2O$ 71.7 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

เตรียมโดยผสม สารละลาย A และ B ตามค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต้องการ

A (ml.)	B (ml.)	pH	A (ml.)	B (ml.)	pH	A (ml.)	B (ml.)	pH
93.5	6.5	5.7	68.5	31.5	6.5	23.0	77.0	7.3
92.0	8.0	5.8	62.5	37.5	6.6	19.0	81.0	7.4
90.0	10.0	5.9	56.5	46.5	6.7	16.0	84.0	7.5
87.7	12.3	6.0	51.0	49.0	6.8	13.0	87.0	7.6
85.0	15.0	6.1	45.0	55.0	6.9	10.5	90.5	7.7
81.5	18.5	6.2	39.0	61.0	7.0	8.5	91.5	7.8
77.5	22.5	6.3	33.0	67.0	7.1	7.0	93.0	7.9
73.5	26.5	6.4	28.0	72.0	7.2	5.3	94.7	8.0

6.2.2 ปิเปตสารละลายเคซีนเข้มข้นร้อยละ 2 มา 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองและอุ่นสารละลายเคซีน ที่ 40 องสาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

6.2.3 นำเอนไซม์ที่เจือจางแล้วมา 1 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายเคซีน ในข้อ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 40 องสาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย trichloroacetic acid ร้อยละ 10 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องสาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอนโปรตีน

6.2.4 ทำหลอดควบคุม โดยเติมสารละลาย trichloroacetic acid ร้อยละ 10 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเคซีน 1 มิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร

6.2.5 นำสารละลายจากข้อ 6.2.3 มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 (whatman No.1) นำส่วนใสมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการย่อยโปรตีน โดยวัดปริมาณไทโรซีนที่เกิดเทียบกับสารละลายไทโรซีนมาตรฐาน โดยวิธีของ Lowry (Lowry, et al., 1951)

6.2.6 การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

การคำนวณ

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วย/มิลลิลิตร)} = \frac{(T_1-T_0) \times V \times D}{t}$$

เมื่อ T_1 คือ ความเข้มข้นของไทโรซีนที่วัดได้ภายหลังจากเอนไซม์เกิดกิจกรรม

T_0 คือ ความเข้มข้นของไทโรซีนที่วัดได้จากหลอดควบคุม

V คือ ปริมาตรทั้งหมดในการทดลอง ซึ่งเท่ากับ 4 มิลลิลิตร

D คือ ความเจือจางของเอนไซม์

t คือ เวลาที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์กับสับสเตรท ซึ่งเท่ากับ 10 นาที

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ เท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์โปรติเอสที่สามารถย่อยเคซีนแล้วเกิดไทโรซีน 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเวลา 1 นาที

7. ปริมาณไทโรซีน ตามวิธีของ (Lowry Method et al., 1951)

7.1 สารเคมี

7.1.1 สารละลายไทโรซีน (tyrosine) มาตรฐาน ชั่งไทโรซีนด้วยเครื่องชั่งสารอย่างละเอียด 0.1000 กรัม ลงในขวดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บเป็น stock solution จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของไทโรซีน ตั้งแต่ 20 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7.1.2 การเตรียมสารละลาย Lowry

สารละลาย A : ละลาย copper sulfate 0.5 กรัม และ sodium citrate 1 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร

สารละลาย B : ละลาย sodium carbonate 20.0 กรัม และ NaOH 4.0 กรัม ในน้ำ 1000 มิลลิลิตร

สารละลาย C : นำสารละลาย A มา 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B 50 มิลลิลิตร

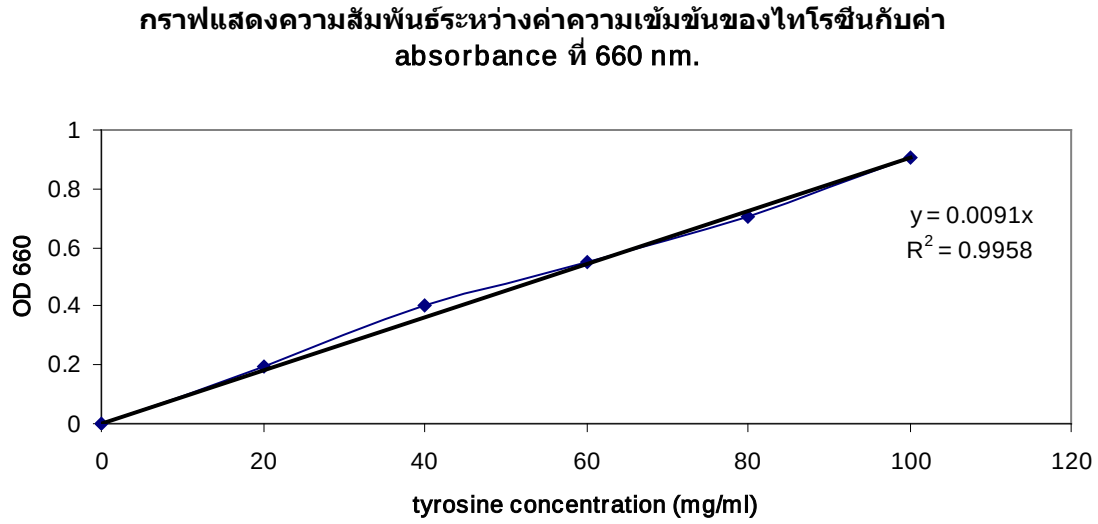
สารละลาย D : สารละลาย 1N Folin-ciocalteau

7.2 วิธีการวิเคราะห์

7.2.1 หากราฟมาตรฐานของไทโรซีนโดยเจือจางสารละลายมาตรฐานไทโรซีนให้มีความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

7.2.2 ใส่สารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด ส่วนหลอดควบคุมจะใช้น้ำกลั่นแทน

7.2.3 เติมสารละลาย C 2.5 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง ทิ้งไว้ 5 ถึง 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย D 0.25 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 20 ถึง 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณไทโรซีน นำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาเปรียบเทียบหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานแล้วคำนวณหาค่าปริมาณไทโรซีนที่มีในตัวอย่าง



ภาพผนวก 1 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของไทโรซีน

8. **ระดับการย่อยสลาย** (Degree of Hydrolysis)

นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total nitrogen) ด้วยวิธี Kjeldahl จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่หลอด centrifuge เติม trichloroacetic acid เข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ประมาณ 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำส่วนของเหลวใสด้านบนไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

การคำนวณ

$$\text{ระดับการย่อยสลาย (Degree of Hydrolysis)} = \frac{\text{20\% TCA soluble N} * 100}{\text{Total N}}$$

เมื่อ Total N คือ ร้อยละไนโตรเจนในวัตถุดิบ (ตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิม)

การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

วิธีสเปรตเพลท (spread plate)

ถ่ายตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมบดละเอียดที่เจือจาง Nacl ร้อยละ 0.85 แต่ละความเจือจางลงบนผิวอาหารที่เตรียมไว้ลงในจานเพาะเชื้อ 2 จาน จานละ 0.1 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าของอาหารแต่ละจาน นำไปบ่มเพาะเชื้อโดยไม่ต้องคว่ำจาน

นับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ต่อจานที่เหมาะสมในช่วง 25-250 โคโลนี หาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีใน 1 จาน และคำนวณหา cfu ต่อมิลลิกรัมของตัวอย่าง โดยคำนวณได้จากความสัมพันธ์ต่อไปนี้

cfu ต่อกรัม หรือ cfu ต่อมิลลิลิตร = n/d

โดยที่ n = จำนวนโคโลนีเฉลี่ยใน 1 จาน ของจานที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 25-250

d = ความเจือจางของตัวอย่างที่นำมาเพาะในจานที่หาค่า n ได้

1. **ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด** (total plate count) (AOAC, 1990)

เตรียมความเจือจางต่างๆ โดยชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ขวดที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาณ 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำมาเตรียมจนได้ความเจือจางที่เหมาะสม ปิเปตสารละลายที่ระดับความเจือจางที่เตรียมไว้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ หาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยวิธีสเปรตเพลท โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar (PCA) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. **ปริมาณยีสต์และรา** (AOAC, 1990)

เตรียมความเจือจางต่างๆ โดยชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ขวดที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาณ 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำมาเตรียมจนได้ความเจือจางที่เหมาะสม ปิเปตสารละลายที่ระดับความเจือจางที่เตรียมไว้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ หาปริมาณยีสต์และราด้วยวิธีสเปรตเพลท โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (ภาคผนวก ข) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3. ปริมาณ coliforms (AOAC, 1990)

3.1 การทดสอบขั้นต้น

นำตัวอย่างที่ความเจือจางที่เหมาะสม 3 ระดับ ถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหาร LST broth 3 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญจากความขุ่น และการเกิดก๊าซจนเกิดฟองอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีที่ว่างในหลอดดักก๊าซ

3.2 การทดสอบขั้นยืนยันผล

ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อที่ถ่ายจากหลอด LST broth ที่ให้ผลบวกลงในหลอดอาหาร EC broth ทำเช่นเดียวกันจนครบทุกหลอด จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง หลอดที่ให้ผลบวก อาหารเลี้ยงเชื้อจะขุ่น และมีที่ว่างในหลอดดักก๊าซ จากนั้นนำค่าผลบวกจากทุกความเจือจางไปอ่านค่าปริมาณ coliform จากตารางเอ็มพีเอ็น (MPN)

4. ปริมาณ *Salmonella* sp. (AOAC, 2000)

ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ขวดลูกชมพู่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติม Lactose broth เข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเจือจางที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปิเปตตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร Salmonella Shigella agar (SS agar) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง ตรวจสอบลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้น โดยโคโลนีของ *Salmonella* sp. จะไม่มีสี หรือมีสีชมพูอ่อน บางโคโลนีจะมีสีดำตรงกลาง

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Nutrient agar

beef extract	3.0	กรัม
peptone	5.0	กรัม
agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

Peptone water

Peptone	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

Skim milk agar

Skim milk	22.0	กรัม
agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

Potato dextrose agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปอกเปลือกมันฝรั่งแล้วหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปชั่งจนครบ 200 กรัม แล้วนำมาต้มกับน้ำกลั่น นาน 15 ถึง 20 นาที ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.6 กรองเอาส่วนที่เป็นกากออก

เติมส่วนประกอบที่เหลือแล้วนำไปต้มจนวุ้นละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

Lauryl sulfate tryptose broth (LST)

Tryptone	20	กรัม
Lactose	5	กรัม
Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)	2.75	กรัม
Potassium di-hydrogen phosphate (KH_2PO_4)	2.75	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันโดยใช้ความร้อน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 6.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

EC broth

Pancreatic digest of casein	20	กรัม
Bile salt mixture or Bile salts No.3	1.5	กรัม
Lactose	5	กรัม
Dipotassium phosphate	4	กรัม
Potassium phosphate	1.5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.9 ถ่ายอาหารใส่หลอดทดลอง หลอดละ 8 มิลลิลิตร ภายในหลอดบรรจุอาหารใส่หลอดดักก๊าซ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

Plate count agar (PCA)

Peptone	5	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1	กรัม
Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 7.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค

การเผยแพร่ผลงานวิชาการ

1) การประชุมวิชาการ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 3 วันที่ 14 – 15 มีนาคม 2554
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ประสิทธิภาพในการย่อยเครื่องในปลาทับทิม (*Oreochromis niloticus*) ด้วยเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 008 ที่สภาวะต่างๆ

อรพรรณ พยัคฆ์[1] ปวีนา น้อยทัพ[2*] วรสิทธิ์ โทจำปา[2] และ อรอินทุ์ ประไชโย[2]

The digestion efficacy of red tilapia (*Oreochromis niloticus*) viscera using protease from *Bacillus subtilis* TISTR 008 at various conditions

Oraphan Payakkul[1] *Paweena Noitup*[2*] **Worasit Tochampa**[2] **and Orn-in Prachaiyo**[2]

[1,2] คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

*Coresponding author. E-mail: paweenan@nu.ac.th

บทคัดย่อ

ประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* ที่สภาวะต่างๆ ถูกคัดเลือกบนอาหารจำเพาะ (Skim milk agar) ที่ระดับ pH 6.5 7.5 8.5 9.5 และ 10.5 อุณหภูมิ 37°C และ 45°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ประเมินกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสที่ปรากฏ พบว่าที่อุณหภูมิ 37°C *B.subtilis* TISTR 008 สร้างวงใสที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 10.0-11.3 มิลลิเมตร ส่วนที่อุณหภูมิ 45°C เส้นผ่านศูนย์กลางที่ได้มีขนาด 10.5-14.0 มิลลิเมตร โดย *B.subtilis* TISTR 008 สร้างวงใสมีเส้นผ่านศูนย์กลางกว้างที่สุด ที่ pH 7.5 อุณหภูมิ จากนั้นทำการเพาะเชื้อเริ่มต้น 10^8 CFU ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างวัตถุดิบที่ได้จากการผสมเครื่องในปลาทับทิมปริมาณ 25 กรัมและน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่ปรับระดับ pH เป็น 6.5 7.5 8.5 9.5 และ 10.5 บ่มที่อุณหภูมิ 31 37 45 และ 53°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และวัดระดับการย่อยสลาย (%DH) ในรูปของกรดอะมิโนอิสระ (α-amino acid) พบว่า *B.subtilis* TISTR 008 มีระดับการย่อยสลายสูงสุดเท่ากับ 68.25 ที่ระดับ pH 7.5 อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

คำสำคัญ : บาซิลลัส, โปรติเอส, ระดับการย่อยสลาย

Abstract

The protease production efficacy of *Bacillus subtilis* TISTR 008 was screened using the selective medium (Skim milk agar) at various pH (6.5 7.5 8.5 9.5 and 10.5) and temperature (37°C and 45°C) for 12 hrs. The protease activity was determined by measuring the diameter of a clear zone on the agar surface. The results revealed that *B.subtilis* TISTR 008 were grown on skim milk agar medium and produced the clear zone with the diameters of 10.0-11.3 mm at 37°C and 10.5-14.0 mm at 45°C. The biggest clear zone was observed on skim milk agar with pH 7.5, 45°C. Subsequently, *B.subtilis* TISTR 008 was tested for the digestion of the red tilapia viscera. The red tilapia viscera mixture was prepared by mixing 25 g of viscera with 25 ml distilled water. The mixture was then adjusted to various pH (6.5 7.5 8.5 9.5 and 10.5) and inoculated with 1 ml of 10^8 CFU inoculums. The inoculums were incubated at 31 37 45 and 53°C for 12 hrs. The degree of hydrolysis was measured as α-amino acid. The results indicated that *B.subtilis* TISTR 008 exhibited the maximum degree of hydrolysis (68.25) at pH 7.5, 45°C for 12 hrs.

Keywords: *Bacillus* sp., protease, degree of hydrolysis

1. บทนำ

โปรติเอส (protease) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีน ที่ถูกนำมาผลิตในเชิงการค้านั้นส่วนใหญ่ผลิตจากแบคทีเรียสกุลบาซิลลัส (*Bacillus*) โดยโปรติเอสจากแบคทีเรียนั้นมีปริมาณการใช้สูงกว่าโปรติเอสจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ พบว่ามีการนำเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. มาใช้อย่างแพร่หลายทั้งในทางอุตสาหกรรม เกษตรกรรม เภสัชกรรมและทางการแพทย์ นอกจากจะมีการนำเอนไซม์โปรติเอสมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ แล้ว ยังพบว่าโปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีส่วนแบ่งทางการตลาดสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่น (ยุวพิน ด่านดุสิตาพันธ์, 2546) เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติค่อนข้างหลากหลาย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* โดยผู้วิจัยหวังว่าจะสามารถนำสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวไปใช้เป็นพื้นฐานในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 สายพันธุ์แบคทีเรีย

กล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 008 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

2.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

เตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TISTR 008 โดยเพาะเชื้อลงอาหาร nutrient broth (NB) บ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหาร nutrient agar (NA) เพื่อการเก็บรักษา

2.3 การเตรียมวัตถุดิบ

ใช้เศษเหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปปลา (เครื่องในปลาทับทิม) จากร้านปลาสองแคว จ.พิษณุโลก ขนส่งโดยแช่มาในถังน้ำแข็ง โดยมีระยะเวลาตั้งแต่ปลาตายจนถึงการเตรียมวัตถุดิบไม่เกิน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำเครื่องในปลาทับทิมมาล้างทำความสะอาด ทำการแยกไขมันออกบางส่วน ปั่นให้ละเอียดและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18°C จนกว่าจะนำมาใช้ทดลอง

2.4 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

ผสมเครื่องในปลาทับทิมที่บดละเอียดกับน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น โปรตีน เถ้า และไขมัน ตามวิธีของ AOAC (2000) และค่าความเป็นกรดด่าง โดยใช้ pH meter

2.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรีย

ทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรติเอส โดยเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 008 บนอาหารจำเพาะสูตร Skim milk agar (Becton Dickinson and Company) ที่ระดับ pH 6.5 7.5 8.5 9.5 และ 10.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C และ 45°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (colony diameter, CO) และวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ (clear zone diameter, CZ) แล้วนำมาเปรียบเทียบผลต่างระหว่าง CZ และ CO (CZ-CO) ตรวจสอบส่วนที่ให้ค่าผลต่างสูงสุดจากการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

2.6 ศึกษาสภาวะการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ของวัตถุดิบ

เลือกสภาวะจากขั้นที่ 2.5 มาใช้เป็นแนวทางในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้เครื่องในปลาทับทิมเป็นสับสเตรทในการเลี้ยงเชื้อ (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8 CFU/ml) ที่ระดับ pH 6.5 7.5 8.5 9.5 และ 10.5 บ่มที่อุณหภูมิ 31 37 45 และ 53°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาวัดระดับการย่อยสลาย (%DH) ในรูปของกรดอะมิโนอิสระ (α-amino acid) โดยวิธีของ Hoyle and Merritt (1994) เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ย่อยสลายด้วยตัวเอง

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเครื่องในปลาทับทิม

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเครื่องในปลาทับทิม พบว่ามีปริมาณความชื้นร้อยละ 76.30 โปรตีนร้อยละ 14.90 ไขมันร้อยละ 5.13 และเถ้าร้อยละ 1.64 (ตารางที่ 1) จะเห็นได้ว่าเครื่องในปลาทับทิมมีโปรตีนอยู่ในปริมาณค่อนข้างสูง ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซทได้เป็นอย่างดี

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างวัตถุดิบ (เครื่องในปลาทับทิม)

ชนิดตัวอย่าง	ความชื้น (ร้อยละ)	โปรตีน (ร้อยละ)	ไขมัน (ร้อยละ)	เถ้า (ร้อยละ)
เครื่องในปลาทับทิม	76.30 ± 0.57	14.90 ± 0.95	5.13 ± 0.42	1.64 ± 0.07

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรีย

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 008 บนอาหารจำเพาะสูตร Skim milk agar ที่ระดับ pH 6.5 7.5 8.5 9.5 และ 10.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C และ 45°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่า *Bacillus subtilis* TISTR 008 สร้างวงใสวัดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยได้ 10.0-11.3 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 37°C และ 10.5-14.0 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 45°C แสดงว่า *Bacillus subtilis* TISTR 008 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสย่อยสลายโปรตีนในอาหารสูตรจำเพาะ ที่อุณหภูมิ 45°C ในสภาวะที่เป็นด่างอ่อนได้ดีกว่าการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 37°C (ตารางที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย การคัดเลือก *Bacillus* sp. ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และไลเปสจากดิน พบว่า *Bacillus* sp. สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และไลเปสได้ดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 45°C (จักรพันธ์ สุวรรณเพิมพ์ และสุพรรณี แก่นสาร, 2552)

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B.subtilis* TISTR 008 บนอาหาร Skim milk agar ที่อุณหภูมิ 37°C และ 45°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

Temp.	pH	ความยาว Ø วงใส (มม.) ของ *Bacillus subtilis*
37	6.5	10.33 ± 0.58
37	7.5	11.33 ± 0.58
37	8.5	10.33 ± 0.58
37	9.5	10.00 ± 0.00
37	10.5	11.00 ± 0.00
45	6.5	11.00 ± 0.00
45	7.5	14.00 ± 0.00
45	8.5	11.33 ± 0.58
45	9.5	11.00 ± 0.00
45	10.5	10.50 ± 0.58

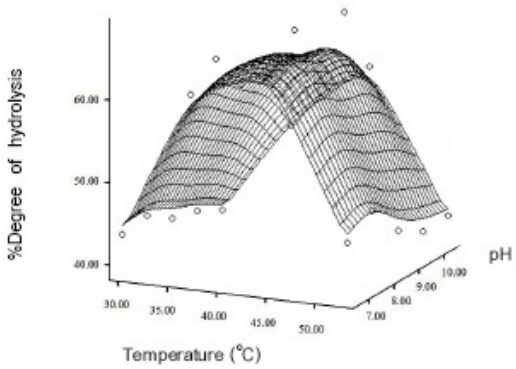
* ค่าเฉลี่ยความยาว Ø วงใส 3 ซ้ำ

3.4 การศึกษาระดับการย่อยสลายโปรตีนโดยการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียในตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิม

เมื่อนำสภาวะจากการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์โปรติเอสมาใช้เป็นแนวทางกำหนดสภาวะการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนในตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมเทียบกับการย่อยสลายตัวเอง พบว่าที่เมื่อทำการเพาะเชื้อลงในตัวอย่างที่ระดับ pH 6.5 7.5 8.5 9.5 และ 10.5 บ่มที่อุณหภูมิ 31 37 45 และ 53°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่า *Bacillus subtilis* TISTR 008 นั้น จะเกิดการย่อยสลายได้สูงที่สุดที่ระดับ pH 7.5 อุณหภูมิ 45°C ที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยให้ค่าร้อยละของระดับการย่อยสลายเท่ากับ 68.25 (ตารางที่ 4) ซึ่งพบว่าระดับการย่อยสลายมีค่าสูงกว่าการย่อยสลายตัวเองที่ระดับเดียวกันทั้งหมด

ตารางที่ 4 ระดับการย่อยสลาย (% DH) ของการย่อยตัวเอง และระดับการย่อยสลายหลังการเพาะเชื้อ *B.subtilis* TISTR 008 ในตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิม ที่อุณหภูมิ 31 37 45 และ 53°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

Temp.	pH	Time (h.)	Control (autolysis)	*Bacillus subtilis*
31	6.5	12	37.15 ± 0.05	43.57 ± 0.03
31	7.5	12	37.19 ± 0.21	43.96 ± 0.09
31	8.5	12	36.82 ± 0.00	41.81 ± 0.09
31	9.5	12	36.25 ± 0.05	41.04 ± 0.03
31	10.5	12	32.89 ± 1.17	39.27 ± 0.05
37	6.5	12	41.69 ± 0.03	61.47 ± 0.08
37	7.5	12	46.11 ± 0.06	63.75 ± 0.35
37	8.5	12	43.99 ± 0.06	58.36 ± 1.09
37	9.5	12	43.32 ± 0.45	57.42 ± 0.40
37	10.5	12	38.42 ± 0.13	50.50 ± 0.10
45	6.5	12	45.71 ± 0.32	64.56 ± 0.54
45	7.5	12	50.08 ± 0.07	68.25 ± 0.54
45	8.5	12	44.76 ± 1.03	64.03 ± 0.31
45	9.5	12	44.93 ± 0.72	66.58 ± 0.88
45	10.5	12	42.80 ± 1.49	58.97 ± 0.24
53	6.5	12	41.61 ± 0.03	45.69 ± 0.03
53	7.5	12	43.91 ± 0.09	47.65 ± 0.16
53	8.5	12	41.26 ± 0.11	43.60 ± 0.06
53	9.5	12	41.12 ± 0.25	41.73 ± 0.03
53	10.5	12	41.96 ± 1.66	41.69 ± 0.26



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างต่อร้อยละของระดับการย่อยสลายของ *B.subtilis* TISTR 008 ที่เวลา 12 ชั่วโมง

4. สรุปผลการวิจัย

B.subtilis TISTR 008 มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk agar ที่ระดับ pH 7.5 อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และเมื่อนำมาใช้ในการย่อยสลายโปรตีนในตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิม *B.subtilis* TISTR 008 ยังคงให้ระดับการย่อยสลายสูงสุดที่ pH 7.5 อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร ปี 2554 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

6. เอกสารอ้างอิง

จักรพันธ์ สุวรรณเพิมพ์ และสุพรรนี แก่นสาร อะไอกิ. (2552). การคัดเลือก *Bacillus* sp. ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และไลเปสจากดิน. *วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*.,40(1), 389-392.

ขวพิน ด่านดุสิตาพันธ์ และทวีรัตน์ วิจิตรสุนทรกุล. (2546). การเพิ่มผลผลิตในกระบวนการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสของ *Aspergillus oryzae* โดยการป้องกันการย่อยสลายตัวเอง. *วารสารมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี*.

A. O. A. C. (2000). Official Methods of Analysis. Association of Official *Analytical Chemist*. Washington, D.C.

Hoyle, N. T. and J. H., Merritt. (1994). Quality of fish protein hydrolysates from herring. *J. Food Sci*, 59, 76-79.

2) จัดแสดงนิทรรศการ ในงานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 9 วันที่ 27 – 31 กรกฎาคม 2554 คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร

โปรตีนปลาไฮโดรไลเซท

Fish protein hydrolysate

ที่มา

ปัจจุบันประเทศไทยส่งออกผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสัตว์น้ำไปจำหน่ายยังต่างประเทศติดอันดับหนึ่งในสิบของตลาดการค้าโลก และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น การขยายตัวของอุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์น้ำนี้ทำให้มีเศษเหลือใช้จากกระบวนการแปรรูปเกิดขึ้นจำนวนมาก ซึ่งเศษเหลือใช้เหล่านี้มีมูลค่าต่ำและหากมีการจัดการไม่ดีจะเกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมได้ เพราะเกิดการเน่าเสียได้ง่ายเนื่องจากมีส่วนประกอบเป็นโปรตีนและไขมันเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนและกรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมาณสูง จึงมักมีการนำเศษเหลือใช้ดังกล่าวมาใช้ให้เกิดประโยชน์เพื่อเพิ่มมูลค่า โดยนำมาผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท (protein hydrolysate) หรือเปปโตน (peptone) และสารสกัดจากปลา (fish extract) ในกระบวนการผลิตอาจใช้กรด ด่าง หรือเอนไซม์ช่วยในการย่อยสลาย แต่การใช้กรด ด่างในการย่อยสลายนั้นทำให้คุณสมบัติเชิงหน้าที่ลดลง จึงมีการแก้ไขปัญหาโดยการนำเอนไซม์จากแหล่งต่างๆมาทดแทน

โปรตีนปลาไฮโดรไลเซท

โปรตีนปลาไฮโดรไลเซท เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนจากส่วนของเนื้อปลา หรือส่วนของเศษเหลือใช้อื่นๆ เช่น หัว และอวัยวะภายในของปลา ด้วยสารเคมี หรือเอนไซม์ย่อยโปรตีน (โปรตีเอส) เพื่อให้ได้ส่วนผสมของโปรตีนที่มีสายสั้นลง มีส่วนของเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระเป็นส่วนประกอบมากขึ้น จุดประสงค์เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติบางประการของโปรตีนให้ดีขึ้น เช่นการเกิดอิมัลชัน คุณสมบัติการละลาย และการเกิดโฟม เป็นต้น

กระบวนการผลิต

1 เตรียมวัตถุดิบ

- เก็บตัวอย่างเศษเหลือส่วนเครื่องในของปลา
- ล้างทำความสะอาดเพื่อกำจัดส่วนของ เลือด ไขมัน เอนไซม์ต่างๆด้วยน้ำสะอาด
- สับให้เป็นชิ้นเล็กลง และบดให้ละเอียด
- ล้างกำจัดไขมัน โดยใช้เอทานอล

วิธีวิเคราะห์คุณภาพ

2 กระบวนการย่อย

เอนไซม์

- ใช้เอนไซม์ปาเปน
- ที่ pH 6.2
- อุณหภูมิ 25° องศาเซลเซียส
- เวลา 10 นาที

จุลินทรีย์

- ใช้เชื้อ *Bacillus* sp.
- ที่ pH 7.5
- อุณหภูมิ 45° องศาเซลเซียส
- เวลา 6 ชั่วโมง

โปรตีนปลาไฮโดรไลเซท

ผลการวิจัยที่ได้พบว่าโปรตีนปลาไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ให้คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพที่ดีกว่าโดยมีส่วนประกอบของกรดอะมิโนหลากหลายชนิดเทียบเท่ากับโปรตีนจากนม มีต้นทุนการผลิต และขั้นตอนในการผลิตน้อยกว่าการย่อยด้วยเชื้อจุลินทรีย์ แต่อย่างไรก็ตามผลผลิตที่ได้ยังมีกลิ่นที่ค่อนข้างแรงและมีสีเข้ม การนำไปใช้ประโยชน์จึงมุ่งไปที่การเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้กับสัตว์ และนำไปใช้ทดแทนอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งปัจจุบันนักวิจัยได้พยายามปรับปรุงกระบวนการผลิต เพื่อให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์สำหรับเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้กับมนุษย์มากขึ้น

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร
คณะเกษตรศาสตร์
ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

FISH PROTEIN HYDROLYSATE

โปรตีนปลาไฮโดรไลเซท

Fish protein hydrolysate

งานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 9 (เกษตรภาคเหนือตอนล่าง)

" เกษตรกรรมไทยสู่ธุรกิจยั่งยืน "

27 - 31 กรกฎาคม 2554

ณ คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก

การจัดนิทรรศการและถ่ายทอดเทคโนโลยี

เรื่อง การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือของปลาเพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

รายชื่อผู้เข้าชมงาน

เลขที่	ชื่อ-สกุล	ลายเซ็น
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		

17	นางสาว นันทวิชญ์ พลสว่าง	
18		
19		
20		
21	กัญญาวีร์ บัวนวล	กัญญาวีร์
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		
30		
31		
32		
33		
34		
35		
36		
37		
38		
39		
40		

3) การประชุมวิชาการ นเรศวรวิจัย 7 วันที่ 29 – 30 มีนาคม 2554 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *Bacillus cereus* TISTR 687 ในการย่อยเครื่องในปลาทับทิม

อรพรรณ พยัฆกุล[1] วรสิทธิ์ โทจำปา[1] อรอินทุ์ ประไชโย[1] และ ปวีนา น้อยทัพ[1*]

The protease production efficacy of Bacillus cereus *TISTR 687 for red tilapia viscera hydrolysis*

Oraphan Payakkul[1], Worasit Tochampa[1], Om-in Prachaiyo[1] and Paweena Noitup[1*]

[1]ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

[1]Department of Agro-Industry, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok Province.

*Corresponding author E-mail: paweenan@nu.ac.th

บทคัดย่อ

ประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus cereus* TISTR 687 ที่สภาวะต่างๆ ถูกคัดเลือกบนอาหารจำเพาะ (skim milk agar) ที่ระดับความเป็นกรดด่าง 6.5 7.5 8.5 9.5 และ 10.5 อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ประเมินกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสที่ปรากฏ พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส *B. cereus* TISTR 687 สร้างวงใสที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 8.8 – 10.0 มิลลิเมตร ส่วนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เส้นผ่านศูนย์กลางที่ได้มีขนาด 9.0 – 11.0 มิลลิเมตร โดย *B. cereus* TISTR 687 สร้างวงใสมีเส้นผ่านศูนย์กลางกว้างที่สุดที่ความเป็นกรดด่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเพาะเชื้อเริ่มต้น 10^8 cfu ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างวัตถุดิบที่ได้จากการผสมเครื่องในปลาทับทิมปริมาณ 25 กรัมและน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่ปรับระดับความเป็นกรดด่างเป็น 6.5 7.5 8.5 9.5 และ 10.5 บ่มที่อุณหภูมิ 31 37 45 และ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และวัดระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) ในรูปของกรดอะมิโนอิสระ(α-amino acid) พบว่า *B. cereus* TISTR 687 มีระดับการย่อยสลายสูงสุดเท่ากับ 67.00 ที่ระดับความเป็นกรดด่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

คำสำคัญ : บาซิลลัส โปรติเอส ระดับการย่อยสลาย เศษเหลือปลา

Abstract

The protease production efficacy of *Bacillus cereus* TISTR 687 was screened using the selective medium (skim milk agar) at various pH (6.5 7.5 8.5 9.5 and 10.5) and temperature (37°C and 45°C) for 12 hrs. The protease activity was determined by measuring the diameter of a clear zone on the agar surface. The results revealed that *B. cereus* TISTR 687 were grown on skim milk agar medium and produced the clear zone with the diameters of 8.8 – 10.0 mm at 37°C and 9.0 – 11.0 mm at 45°C. The biggest clear zone was observed on skim milk agar with pH 7.5, 45°C. Subsequently, *B. cereus* TISTR 687 was tested for the digestion of the red tilapia viscera. The red tilapia viscera mixture was prepared by mixing 25 g of viscera with 25 ml distilled water. The mixture was then adjusted to various pH (6.5, 7.5, 8.5, 9.5 and 10.5) and inoculated with 1 ml of 10^8 cfu inoculums. The inoculums were incubated at 31, 37, 45 and 53°C for 12 hrs. The degree of hydrolysis was measured as α-amino acid. The results indicated that *B. cereus* TISTR 687 exhibited the maximum degree of hydrolysis (67.00) at pH 7.5, 45°C for 12 hrs.

Keywords : *Bacillus* sp., protease, degree of hydrolysis, fish waste

บทนำ

ประเทศไทยสามารถส่งออกผลิตภัณฑ์แปรรูปในกลุ่มของสัตว์น้ำไปจำหน่ายยังต่างประเทศติดอันดับหนึ่งในสิบของตลาดการค้าโลก และมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น จากการขยายตัวของอุตสาหกรรมการแปรรูปสัตว์น้ำนี้ ทำให้มีเศษเหลือใช้จากกระบวนการแปรรูปเกิดขึ้นมาก ซึ่งเศษเหลือเหล่านี้มีมูลค่าต่ำ และหากมีการจัดการที่ไม่ดีพอจะเกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมได้ เพราะเศษเหลือเหล่านี้เกิดการเน่าเสียได้ง่ายเนื่องจากมีส่วนประกอบของโปรตีนและ

ไขมันเป็นส่วนใหญ่ โดยหากเป็นโรงงานแปรรูปขนาดใหญ่จะขายต่อให้แก่โรงงานผลิตอาหารสัตว์ในราคาถูก แต่หากเป็นผู้ประกอบการแปรรูปขนาดเล็กจะทิ้งเศษเหลือเหล่านี้รวมกับขยะอื่น ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมได้ ในกระบวนการแปรรูปปลาจะก่อให้เกิดวัสดุเศษเหลือประมาณร้อยละ 30 – 35 (สันทัด, 2549) ที่พบมากคือ เครื่องใน หนัง เกล็ด โครงและก้าง ซึ่งเศษเหลือเหล่านี้ประกอบด้วยโปรตีนและกรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมาณสูง (Shahidi et al., 1997) ดังนั้นจึงมีการนำเศษเหลือดังกล่าวมาใช้ให้เกิดประโยชน์หรือเพิ่มมูลค่า พบว่าการนำวัสดุเศษเหลือจากปลามาใช้ได้รับความสนใจมานานกว่า 10 ปีแล้ว โดยนำมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซท (protein hydrolysate) เปปโตน (peptone) หรือสารสกัดจากปลา (fish extract) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์โปรติเอส (protease) (Kim *et al.*, 1997) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีส่วนแบ่งทางการตลาดในการนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรมต่าง ๆ สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ,ยุวพิน) 2546 (เอนไซม์โปรติเอสที่ถูกนำมาผลิตใช้ในเชิงการค้าส่วนใหญ่นั้นผลิตจากแบคทีเรียสกุลบาซิลลัส (*Bacillus* sp.) ที่มีปริมาณการใช้ที่ค่อนข้างสูงกว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ โดยมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในทางอุตสาหกรรม เกษตรกรรม เภสัชกรรมและทางการแพทย์ เป็นต้น

การศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนไฮโดรไลเซทได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเซทมีคุณสมบัติที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ได้หลากหลาย เช่น เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) ในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์น้ำ (สุทธิพงศ์, 2537; เพ็ญศิริ, 2533) กระตุ้นการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Zhao *et al.*, 1996) เป็นสารที่มีสมบัติในการออกฤทธิ์คล้ายมอร์ฟีนในทางการแพทย์ (Zhao *et al.*, 1997) และเป็นสารที่มีสมบัติในการออกฤทธิ์เพื่อลดความดันโลหิต (Hyun & Shin,2000) เป็นต้น ซึ่งในกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทอาจใช้กรด ด่าง หรือเอนไซม์ในการย่อยสลาย แต่การใช้กรดด่างในการสกัดนั้นทำให้คุณสมบัติเชิงหน้าที่ลดลง จึงมีการแก้ไขปัญหาดังกล่าวโดยการนำเอนไซม์ที่สกัดได้จากแหล่งต่าง ๆ มาใช้แทน เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงเพราะเอนไซม์จะมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น (substrate) ความเป็นกรดด่าง ความคงตัวต่อความร้อน ตัวกระตุ้นและตัวยับยั้ง จึงสามารถเลือกใช้ชนิดของเอนไซม์และสภาวะในการย่อยสลายได้ตามความเหมาะสม อีกทั้งสภาวะในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์นั้นไม่รุนแรง ทำให้ได้โปรตีน ไฮโดรไลเซทที่มีคุณภาพดีและมีสมบัติเชิงหน้าที่ตามต้องการ เมื่อเปรียบเทียบโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายด้วยสารเคมีและเอนไซม์โปรติเอสจะพบว่าการย่อยสลายโดยการใช้เอนไซม์นั้นสามารถตัดสินขอบเขตการย่อยสลายและขนาดของ เปปไทด์) peptide (ที่เกิดขึ้นได้ (Adler & Nissen, 1986) ในขณะที่การย่อยด้วยสารเคมีนั้นจะไม่สามารถระบุถึงการแตกตัวของพันธะและขนาดของเปปไทด์ได้ แต่ข้อจำกัดของการใช้เอนไซม์คือมีต้นทุนการผลิตที่สูง (Brody, 1965 ; Light & Smith, 1963) จึงมีการนำเอนไซม์โปรตีโอไลติก (proteolytic enzyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอสที่ได้จากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์มาใช้ในกระบวนการย่อยสลาย พบว่าการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีโอไลติกเป็นการย่อยสลายโปรตีนที่บริเวณพันธะเปปไทด์ทำให้ได้เปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระ (free amino acids) ออกมา ปกติแล้วโปรตีนปลาสามารถเกิดการย่อยสลายได้เองด้วยเอนไซม์โปรติเอสที่มีอยู่ตามธรรมชาติในกล้ามเนื้อและเครื่องในปลา (autolysis) เช่น เปปซิน ทริปซิน ไคโมทริปซิน และคาเทปซิน เป็นต้น แต่วิธีการย่อยสลายนี้เป็นวิธีที่ค่อนข้างซับซ้อน เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสที่มีอยู่ในปลามีมากมายหลายชนิด และแต่ละชนิดมีกิจกรรมการทำงานที่แตกต่างกัน ทำให้ไม่สามารถควบคุมการย่อยสลายและต้องใช้เวลาในการย่อยสลายยาวนาน ผลิตภัณฑ์โปรตีนปลาไฮโดรไลเซทที่ได้จึงมีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่ไม่ดีนัก นิยมใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร เช่น น้ำปลา เป็นต้น

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. cereus* TISTR 687 มาใช้เพื่อเหนี่ยวนำให้เชื้อสร้างเอนไซม์โปรติเอสออกมาย่อยโปรตีนในสับสเตรท และนำโปรตีนดังกล่าวไปใช้เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยผู้วิจัยหวังว่าจะสามารถนำสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวนี้ไปใช้เป็นพื้นฐานในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม เพื่อเป็นการลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม และเพิ่มประโยชน์หรือเพิ่มมูลค่าเศษเหลือจากปลาน้ำจืดต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. สายพันธุ์และการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

เตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย*B. cereus* TISTR 687 ที่ได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยเพาะเชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (Himedia Laboratories, India) บ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (Becton Dickinson and Company, USA) เพื่อการเก็บรักษา

2. การเตรียมวัตถุดิบ

ใช้เศษเหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปปลา (เครื่องในปลาทับทิม) จากร้านปลาสองแคว จังหวัดพิษณุโลก ขนส่งโดยแช่ในลังน้ำแข็ง โดยมีระยะเวลาตั้งแต่ปลาตายจนถึงการเตรียมวัตถุดิบไม่เกิน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำเครื่องในปลาทับทิมมาล้างทำความสะอาด แยกและล้างไขมันออก ปั่นให้ละเอียด เก็บในแก้วพลาสติกชนิดมีฝาปิด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส จนกว่านำมาใช้ทดลอง

3. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

ผสมเครื่องในปลาทับทิมที่บดละเอียดกับน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (เครื่องในปลาทับทิมบดละเอียด 25 กรัม : น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 25 มิลลิลิตร) นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น โปรตีน เถ้า และไขมัน ตามวิธีของ AOAC (2000) และค่าความเป็นกรดด่าง โดยใช้ pH meter (Euteon Instruments, Singapore)

4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

อบประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรติเอส โดยเลี้ยงเชื้อทดส*B. cereus* TISTR 687 บนอาหารจำเพาะสูตร skim milk agar (Becton Dickinson and Company, USA) ที่ระดับความเป็นกรดด่าง 6.5 7.5 8.5 9.5 และ 10.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (colony diameter, CO) และวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ)clear zone diameter, CZ) แล้วนำผลที่ได้ดังกล่าวมาเปรียบเทียบผลต่างระหว่าง CZ และ CO (CZ - CO) ตรวจสอบส่วนที่ให้ค่าผลต่างสูงสุดจากการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

5. ศึกษาสภาวะการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ของวัตถุดิบ

เลือกสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4 นำมาใช้เป็นแนวทางในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้เครื่องในปลาทับทิมเป็นสับสเตรทในการเลี้ยงเชื้อ *B. cereus* TISTR 687 (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^5 cfu/ml) ที่ระดับความเป็นกรดด่าง 6.5 7.5 8.5 9.5 และ10.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 31 37 45 และ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาทำการวัดระดับการย่อยสลายที่เกิดขึ้น (%DH) ในรูปของกรดอะมิโนอิสระ (α-amino acid) โดยวิธีของ Hoyle & Merritt (1994) โดยนำโปรตีนไฮโดรไลเซทปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่หลอด centrifuge เติม trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich, USA) เข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันประมาณ 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนของเหลวใสด้านบนไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ปล่อยให้เกิดการย่อยสลายด้วยตัวเอง

การคำนวณระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis)

$$\%\text{ระดับการย่อยสลาย (\%DH)} = \frac{\text{20\% TCA soluble N} * 100}{\text{Total N}}$$

เมื่อ Total N คือ ร้อยละไนโตรเจนในวัตถุดิบ (ตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิม)

ผลการศึกษา

1. องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเครื่องในปลาทับทิม พบว่ามีปริมาณความชื้นร้อยละ 76.30 โปรตีนร้อยละ 14.90 ไขมันร้อยละ 5.13 และเถ้าร้อยละ 1.64 (ตารางที่ 1) ซึ่งให้ปริมาณของความชื้นและโปรตีนที่สูง ในขณะที่ให้ค่าปริมาณของไขมันและเถ้าที่ค่อนข้างต่ำ จึงถือว่าเครื่องในปลาทับทิมเหมาะกับการนำไปใช้ในการเป็นสับเสรทในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ (เครื่องในปลาทับทิม)

ตัวอย่าง	ความชื้น (ร้อยละ)	โปรตีน (ร้อยละ)	ไขมัน (ร้อยละ)	เถ้า (ร้อยละ)
เครื่องในปลาทับทิม	76.30 ± 0.57	14.90 ± 0.95	5.13 ± 0.42	1.64 ± 0.07

2. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. cereus* TISTR 687 บนอาหารจำเพาะสูตร skim milk agar ที่ความเป็นกรดต่าง 6.5 7.5 8.5 9.5 และ 10.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่า *B. cereus* TISTR 687 สร้างวงใสวัดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยได้ 8.8–10.0 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซสเซียส และที่ 45 องศาเซสเซียส *B. cereus* TISTR 687 สร้างวงใสวัดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยได้สูงกว่า คือ 9.0 – 11.0 มิลลิเมตร (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. cereus* TISTR 687 บนอาหาร skim milk agar ที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

Temp.	pH	Øของวงใส*(มม) (CZ)	Øของโคโลนี*(มม) (CO)	ผลต่างระหว่าง Øของวงใสและโคโลนี(มม) (CZ - CO)
37	6.5	9.90	1.10	8.80 ± 0.12
37	7.5	11.20	1.20	10.00 ±0.00
37	8.5	10.70	1.40	9.30 ±0.17
37	9.5	11.20	1.20	10.00 ±0.00
37	10.5	10.10	1.10	9.00 ±0.00
45	6.5	10.10	1.10	9.00 ±0.00
45	7.5	12.20	1.20	11.00 ±0.00
45	8.5	11.10	1.10	10.00 ±0.00
45	9.5	10.70	1.10	9.60 ±0.23
45	10.5	10.10	1.10	9.00 ±0.00

* ค่าเฉลี่ยความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสและเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี ,3 ซ้ำ

3. สภาวะการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ของวัตถุดิบ

เมื่อทดสอบระดับการย่อยสลายโปรตีนของตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิม โดยทำการวัดระดับการย่อยสลายที่เวลา 0 ชั่วโมง พบว่ามีระดับการย่อยสลาย ร้อยละ 21.14 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ระดับการย่อยสลายตัวเองของตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมที่ 0 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	pH	Time (hr.)	% DH
เครื่องในปลาทับทิม	6.8	0	21.14

เมื่อนำสภาวะที่เหมาะสมจากการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. cereus* TISTR 687 บนอาหารเลี้ยงเชื้อมาใช้เป็นแนวทางกำหนดสภาวะการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. cereus* TISTR 687 เพื่อ

เหนี่ยวนำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนในตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมเทียบกับการย่อยสลายตัวเอง พบว่า เมื่อเพาะเชื้อลงในตัวอย่างที่ความเป็นกรดด่าง 6.5 7.5 8.5 9.5 และ 10.5 บ่มที่อุณหภูมิ 31 37 45 และ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่า *B. cereus* TISTR 687 เกิดการย่อยสลายได้สูงสุดที่ความเป็นกรดด่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยให้ค่าร้อยละของระดับการย่อยสลายเท่ากับ 67.00 (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ระดับการย่อยสลายตัวเอง และระดับการย่อยสลายหลังการเพาะเชื้อ *B. cereus* TISTR 687 ในตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิม ที่อุณหภูมิ 31 37 45 และ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

Temp.	pH	Control (autolysis)	*B. cereus* TISTR 687
31	6.5	37.15 ± 0.05	43.67 ± 1.26
31	7.5	37.19 ± 0.21	43.09 ± 0.64
31	8.5	36.82 ±0.00	41.46 ± 0.50
31	9.5	36.25 ± 0.05	41.52 ± 0.47
31	10.5	32.89 ± 1.17	39.74 ± 0.37
37	6.5	41.69 ± 0.03	59.00 ± 0.01
37	7.5	46.11 ± 0.06	63.02 ± 0.04
37	8.5	43.99 ± 0.06	56.94 ± 0.21
37	9.5	43.32 ± 0.45	55.78 ± 0.25
37	10.5	38.42 ± 0.13	50.25 ± 0.39
45	6.5	45.71 ± 0.32	59.22 ± 0.19
45	7.5	50.08 ± 0.07	67.00 ± 0.00
45	8.5	44.76 ± 1.03	62.08 ± 0.11
45	9.5	44.93 ± 0.72	59.37 ± 0.36
45	10.5	42.80 ± 1.49	58.20 ± 0.26
53	6.5	41.61 ± 0.03	43.07 ±0.13
53	7.5	43.91 ± 0.09	43.87 ± 0.15
53	8.5	41.26 ± 0.11	41.64 ± 1.52
53	9.5	41.12 ± 0.25	42.23 ± 0.68
53	10.5	41.96 ± 1.66	41.46 ± 0.50

อภิปรายผลการศึกษา

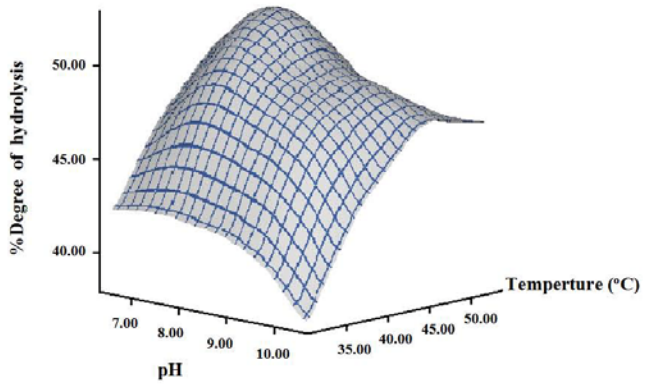
จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบพบว่า เครื่องในปลาทับทิมมีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก ร้อยละ 76.30 รองลงมาคือโปรตีนร้อยละ 14.90 นอกจากนี้มีไขมันและเถ้าร้อยละ 5.13 และ 1.64 โดยน้ำหนัก ซึ่งเห็นได้ว่าเครื่องในปลาทับทิมมีปริมาณของโปรตีนและไขมันค่อนข้างสูง โดยที่องค์ประกอบของวัตถุดิบที่ใช้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทมีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ วัตถุดิบที่นำมาใช้นั้นควรมีปริมาณโปรตีนสูงพอเหมาะ (Adler-Nissen, 1986) เนื่องจากโปรตีนเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญสำหรับการย่อยสลาย และในขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษานี้จำเป็นต้องมีขั้นตอนของการกำจัดไขมันออกจากวัตถุดิบ เนื่องจากไขมันในวัตถุดิบหากมีมากเกินไปอาจเกิดพันธะหรือจับกับโมเลกุลของโปรตีนเกิดเป็นลิโพโปรตีน ทำให้มีโครงสร้างที่ใหญ่และซับซ้อนขัดขวางการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์นั่นเอง (Adler-Nissen, 1986)

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. cereus* TISTR 687 บนอาหารจำเพาะสูตร skim milk agar ที่ระดับความเป็นกรดด่าง 6.5 7.5 8.5 9.5 และ 10.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่า *B. cereus* TISTR 687 สร้างวงใสวัดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยได้ 8.8 – 10.0 และ 9.0 – 11.0 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แสดงว่า *B. cereus* TISTR 687

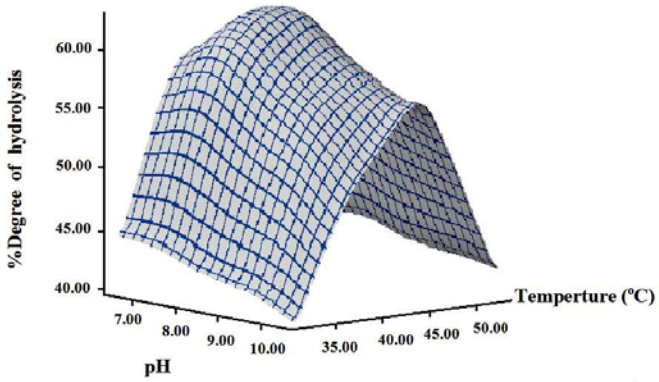
สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสย่อยสลายโปรตีนบนอาหารสูตรจำเพาะ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่เป็นด่างอ่อนได้ดีกว่าการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย การคัดเลือก *Bacillus* sp. ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และไลเปสจากดิน พบว่า *Bacillus* sp. สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และไลเปสได้ดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (จักรพันธ์ และสุพรรนี ,2552)

จากการศึกษาระดับการย่อยสลายโปรตีนของตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมที่เวลา 0 ชั่วโมง พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้ให้ค่าระดับการย่อยสลายตัวเองในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์จากภายนอกอยู่ที่ร้อยละ 21.14 ทั้งนี้เนื่องจากเกิดการย่อยสลายตัวเองจากเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวปลา โดยหลังจากที่ปลาตายนั้นเอนไซม์ทั้งหลายยังคงมีกิจกรรมอยู่ และย่อยองค์ประกอบของเนื้อและเครื่องในปลาให้มีโมเลกุลที่เล็กลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีน ซึ่งจะถูกย่อยสลายเป็นเปปไทด์ กรดอะมิโน แอมโมเนีย เอมีน และอื่นๆ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์จากเครื่องในปลาและทางเดินอาหารมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีนได้ เนื่องจากเอนไซม์ที่พบในเครื่องในปลาและทางเดินอาหาร (gut enzyme หรือ autolytic enzyme) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเอนโดเปปติเดสได้แก่ ทริปซิน ไคโมทริปซินและเปปซิน คุณสมบัติของเอนไซม์ในกลุ่มนี้คือทำงานได้ดีที่ pH ในช่วง 7 – 11 (Meinke *et al.*, 1972) และข้อดีของเอนไซม์จากเครื่องในปลาคือสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิห้องไปจนถึงอุณหภูมิที่ไม่สูงมากนัก (Kristinsson & Rasco, 2000) เมื่อทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อระดับการย่อยสลายโปรตีนโดยการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. cereus* TISTR 687 ในตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิม โดยเพาะเชื้อลงในตัวอย่างรวมถึงเตรียมตัวอย่างที่ไม่ได้ทำการเพาะเชื้อเพื่อใช้สำหรับเป็นตัวอย่างควบคุม กำหนดสภาวะที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีนเหมือนกันทั้งหมดโดยอยู่ที่ระดับความเป็นกรดด่าง 6.5 7.5 8.5 9.5 และ 10.5 บ่มที่อุณหภูมิ 31 37 45 และ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าทั้งตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมที่เพาะเชื้อ *B. cereus* TISTR 687 เพื่อเหนี่ยวนำให้เชื้อสร้างเอนไซม์โปรติเอสออกมาย่อยโปรตีนในสับสเตรทและตัวอย่างควบคุมนั้นเกิดการย่อยสลายได้สูงที่สุดที่สภาวะเดียวกันคือ ที่ระดับความเป็นกรดด่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยให้ค่าร้อยละของระดับการย่อยสลายเท่ากับ 67.00 และ 50.08 ตามลำดับ โดยตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมที่เพาะเชื้อให้ค่าของระดับการย่อยสลายสูงกว่าตัวอย่างที่ปล่อยให้เกิดการย่อยสลายตัวเองที่ระดับเดียวกันทั้งหมด

นอกจากนี้ยังพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างต่อร้อยละของระดับการย่อยสลายทั้งตัวอย่างที่ปล่อยให้เกิดการย่อยสลายตัวเอง (รูปที่ 1) กับตัวอย่างที่เพาะเชื้อ *B. cereus* TISTR 687 (รูปที่ 2) ต่างก็ให้ค่าร้อยละของระดับการย่อยสลายสูงสุดเช่นเดียวกับที่สภาวะของการย่อยที่ระดับความเป็นกรดด่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่เวลา 12 ชั่วโมง



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างต่อร้อยละของระดับการย่อยสลายตัวเองของตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมที่เวลา 12 ชั่วโมง



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างต่อร้อยละของระดับการย่อยสลายของตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมที่ทำการเพาะเชื้อ *B. cereus* TISTR 687 ที่เวลา 12 ชั่วโมง

สรุปผลการศึกษา

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. cereus* TISTR 687 ในอาหารสูตรจำเพาะ พบว่า *B. cereus* TISTR 687 มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีที่สุด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk agar ที่ระดับความเป็นกรดด่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และเมื่อนำ *B. cereus* TISTR 687 มาใช้เพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับการย่อยสลายโปรตีนในตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิม พบว่า *B. cereus* TISTR 687 ยังคงให้ระดับการย่อยสลายสูงสุดที่ความเป็นกรดด่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการนำ *B. cereus* TISTR 687 มาใช้เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์โปรติเอสออกมาย่อยโปรตีนในตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมอยู่ที่ความเป็นกรดด่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยให้ร้อยละของระดับการย่อยสลายสูงที่สุดเท่ากับ 67.00

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ255 4 ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ขอขอบคุณกำลังใจจากครอบครัว รวมทั้งผู้ที่มีส่วนร่วมในการช่วยเหลือให้การทำงานสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีมา ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

จักรพันธ์ สุวรรณพิมพ์ และสุพรรนี แก่นสาร อะโอกิ. (2552). การคัดเลือก Bacillus sp. ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสอะไมเลสและไลเปสจากดิน. *วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*, 40(1), 389-392.

เพ็ญศิริ ธำรงลักษณ์. (2533). *การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเลือดเพื่อใช้ในอาหารสัตว์น้ำ* .รวมบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ, 555.

ยุวพิน ด่านดุสิตาพันธ์ และทวีรัตน์ วิจิตรสุนทรกุล .(2546) .การเพิ่มผลผลิตในกระบวนการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสของ *Aspergillus oryzae* โดยการป้องกันการย่อยสลายตัวเอง. *วารสารมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี*. ม.ป.ป.

สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์. (2549). *ประสิทธิภาพของระบบเอสบีอาร์ซึ่งใช้เชื้อแคนดิด้า ยูทิลลิส (ระยะที่ 1-2)*. ม.ป.ป.