

## บรรณานุกรม

- กรรณิการ์ เสนทอง. (2551). การคัดเลือกและการวิเคราะห์แยกชนิด *Bacillus* ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนและ *Lactobacillus* จากน้ำนมดิบและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์, นครศรีธรรมราช.
- กรองจิตต์ ช้างแก้ว. (2541). ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Lactobacillus* sp., วิทยานิพนธ์ วท.ม., สถาบันเทคโนโลยีเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.
- กองควบคุมตรวจสอบผลิตภัณฑ์และการแปรรูปสัตว์น้ำ. (ม.ป.ป.). คู่มือประกอบการประเมินคุณภาพสัตว์น้ำ. กรุงเทพฯ: กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- เกษม พงษ์มณี. (2536). การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของโปรติเอสที่เสถียรต่ออุณหภูมิสูง. วิทยานิพนธ์ วท.ม., จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- จักรพันธ์ สุวรรณพิมพ์ และสุพรรณิ แก่นสาร อะโออิ. (2552). การคัดเลือก *Bacillus* sp. ที่ผลิตเอนไซม์ โปรติเอส อะไมเลส และไลเปสจากดิน. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี, 40(1), 389-392.
- จุฑาพร แสงวงแก้ว. (2543). การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- โชคชัย มนต์ประสาธน์. (2526). การศึกษาเบื้องต้นเพื่อนำเอนไซม์ย่อยโปรตีนมาใช้ในอุตสาหกรรม. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- ดวงพร คันธโชติ. (2537). อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ไอเดียนสโตร์.
- ดุชนี ธนะบริพัฒน์. (2537). จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ตรีสินธุ์ โภธารส. (2546). การสกัดเพปโตนจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์โอแถบโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติก. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ไตรตะวัน คงแก้ว. (2542). โปรตีนไฮโดรไลเซทและน้ำมันดิบจากหัวกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

- ทอม แม้ใจ [นามแฝง]. (2540). **วรรษัย แสงวณิช กับความสำเร็จการเลี้ยงปลานิลในกระชัง**.  
กรุงเทพฯ. : ม.ป.พ.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. (2544). **จุลชีววิทยาทั่วไป**. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เนตรนรินทร์ ขุนสูงเนิน. (2546). **การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปลานิลซึ่งเก็บรักษาภายใต้  
การปรับเปลี่ยนบรรยากาศ**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี,  
นครราชสีมา.
- บริษัทกรุงเทพฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จำกัด. (2542). **คุณภาพของผลผลิตปลาและเทคโนโลยีหลัง  
การจับ**. วารสารข่าวสัตว์น้ำ, 42(2), 2.
- บัญญัติ สุขศรีงาม. (2534). **จุลชีววิทยาทั่วไป**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.
- ปราณี อานเป็รื่อง. (2547). **เอนไซม์ทางอาหาร**. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พงษ์เทพ วิไลพันธ์. (2540). **จุลชีววิทยาประมง ห้องปฏิบัติการและวิธีการตรวจวิเคราะห์**.  
กรุงเทพฯ: ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พรรณศรี จริโมภาส. (2531). **ปลานิลแดงสายพันธุ์ไทย**. วารสารการประมง, 41(1), 41-43.
- พาขวัญ ทองรักษ์. (2546). **การยืดอายุการเก็บรักษาปลาหับทิมแล้แต่เย็นโดยวิธีการจุ่มน้ำ  
ร้อนและกรดแลกติก**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- พิชญา ชินอุปราวัฒน์. (2539). **การผลิตเปปโตินจากปลาตุ๊กบักอูยและจากเศษเหลือจากการ  
แปรรูปปลาตุ๊กบักอูย**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ไพรัตน์ ไสภโณดร. (2532). **การผลิตเปปโตินจากหัวกุ้ง**. วารสารอาหารและอุตสาหกรรมเกษตร  
3(1), 22-35.
- ภัยในอาหาร. (2547). **วารสาร สถาบันอาหาร**. 6(35), 20-21.
- ยุวพิน ด่านดุสิตาพันธ์. (2546). **เอนไซม์โปรตีนสกัดกับอุตสาหกรรมการผลิตที่อาจจะเกิดขึ้นใน  
เมืองไทย, เทคโนโลยีชีวภาพ ปริญญาตรี**, 1(6), 23-26.
- รุ่งอรุณ ตระการชัยวงศ์. (2545). **การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตไขมันดำจากของเหลือ  
อุตสาหกรรมการผลิตซูริมิ**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ฤทัยรัตน์ หวานจำ. (2547). **การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตผงแห้งจากเศษเหลือของโรงงาน  
ผลิตซูริมิ : การผลิตในระดับนำร่อง**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,  
กรุงเทพฯ.

- วรพงษ์ อัครเวศมณี. (2538). การผลิตเปปโตินจากหัวกุ้ง. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วรรณดี แสงดี. (2529). การหมักถั่วเหลืองด้วยเชื้อจุลินทรีย์ผสมเพื่อใช้เป็นอาหารลูกสุกรหย่านมก่อนกำหนด. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วรรณวิมล ททรัพย์ดี. (2540). การผลิตแอลคาไลน์โปรตีนเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง. วิทยานิพนธ์ วท.ม., จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- วันชัย เกียรติพิมม. (2545). การผลิตและการใช้โปรตีนไฮโดรไลเซตและสารสกัดจากปลาจากวัสดุเศษเหลือโรงงานแปรรูปอาหารทะเลเป็นสารดึงดูดการกินอาหารของปลากดเหลือง (*Mystus nemurus* cv. & val.). วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.
- วิชชุลดา ช่วยฉิม. (2544). การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรตีนเอสสำหรับย่อยเศษหัวกุ้ง. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. (2539). จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พรินต์ติ้งเฮาส์.
- วุฒิจันทร์ ศุภวิริยากร. (2548). การลดความขมของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากหัวกุ้งโดยใช้ถ่านกัมมันต์เพื่อใช้ผลิตผลต้มยำรสกุ้ง. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สันทัต ศิริอนันต์ไพบูลย์. (2551). ประสิทธิภาพของระบบเอสปีอาร์ซึ่งใช้เชื้อแคนดิดา ยูทิลลิส (ระยะที่ 1-2). กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล และประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. (2538). วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สิรินภา ช่วงโสภาส. (2550). การทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนเอสจาก *Bacillus* sp. A39. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.
- สีวิภา กิจสวัสดิ์. (2548). โปรตีนไฮโดรไลเซตจากเลือดสุกร. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพฯ.

- สุทธิพงศ์ พุกษ์ประเสริฐ. (2537). การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเลือดสุกรเพื่อใช้ใน  
ลูกชิ้นไก่. วิทยานิพนธ์ วท.ม., จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- สุปราณี แยมพราย. (2539). การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากของเหลือจากโรงงานผลิตซูริมิ  
เพื่อใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุมาลี เหลืองสกุล. (2527). จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพฯ: ชัยเจริญ.
- อภิรดี อุดมสิน. (2546). การหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตนิวทรัลโปรตีนเอสเทอร์จาก  
*Bacillus cereus* และ ลักษณะสมบัติของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วน. วิทยานิพนธ์  
วท.ม., จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- อัจฉริยา เชื้อช่วยชู. (2542). การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากหัวและเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์  
โอแถบ โดยวิธีการใช้เอนไซม์. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์,  
สงขลา.
- อัญชลี สาระโบก และอรุณ หันพงศ์กิตติกุล. (2542). การย่อยสลายน้ำนิ่งปลาทูน่าด้วยเอนไซม์เพื่อ  
ผลิตซอสปรุงรส. วารสารสงขลานครินทร์, 21, 491-500.
- อำนาจ พรานเบ็ด. (2543). กินข้าว กินปลา. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มติชน.
- Abbas, C.A. and Gander, J.E. (1989). Isolation, purification and properties of *Penicillium  
charlesii* alkaline protease. *Journal of Bacteriology*, 171(10), 5630-5637.
- Abdel-Naby, M.A., Ismail, A.M.S. Ahmed, S.A. and Fattah, A.F.A. (1998). Production and  
immobilization of alkaline protease from *Bacillus mycoides*. *Bioresource  
Technology*, 64, 205-210.
- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins*. New York: Elsevier  
Applied Science.
- Adler-Nissen, J. (1993). Proteases. In Nagodawithana, T. and Reed, G.(Eds.), *Enzymes  
in Food Processing* (pp.159-203). San Diego: Academic Press.
- Afolabi, O. A., Oka, O. L. and Umoh, I. B. (1980). The use of fish waste as animal feed.  
*Ntr Representative International*, 21, 901-906.
- Aftab, S., Ahmed, S., Saeed, S. and Rasool, S. A. (2006). Screening, isolation and  
characterization of alkaline protease producing bacteria from soil. *Park. Journal  
of Biology Sciences*, 9(11), 2122-2126.

- Agar peptone and other. (1960). **Micro and Molecular Biology**. Retrieved November 1, 2011, from <http://www.condalab.com>
- Anson, M.L. (1983). The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. **Journal of General Physiology**, 22, 79-89.
- AOAC. (1990). **Official methods of analysis**. Washington, D.C. : Association of Analytical Chemists.
- AOAC. (2000). **Official methods of analysis**. Washington, D.C. : Association of Analytical Chemists.
- Ashie, A., Smith, P. and Simpson, K. (1996). Spoilage and shelf-life extension of fresh fish and shellfish. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 36 (2), 87-121.
- Asru, K. and Chatterjee, G. C. (1967). Amino acid metabolism and protein synthesis in a pyrithiamine-requiring *Staphylococcus aureus* mutant. **Journal of Chemistry**, 104, 888-892.
- Bailey, J. (1967). **Techniques in protein chemistry**. (2<sup>nd</sup> ed.). New York: Elsevier.
- Banerjee, U.C., Sani, R.K., Azmi, W. and Sani, R. (1999). Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterisation as a laundry detergent additive. **Process Biochemistry**, 35, 213-219.
- Barrett, A. J. (1994). Proteolytic enzymes : serine and cysteine peptidase. In **Method in enzymology** (Vol. 244, p. 765). London: Academic Press.
- Barrett, A.J., Rawlings, N. D. and Woessner, J. F. (2003). **Handbook of Proteolytic Enzymes** (2<sup>nd</sup> ed.) . San Diego: Academic Press, Calif.
- Benjakul, S. and Morrissey, M. T. (1997). Protein hydrolysates from pacific whiting solid wastes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45, 3423-3430.
- Brody, J. (1965). **Fishery by-product technology**. Westport, Connecticut: The AVI.
- Byrum, B. R. and Selmons, R. D. (1995). Detection of proteolytic bacteria in the upper respiratory tract flora of poultry. **Avian Diseases**, 39(3), 622-626.
- Callahan, T. and Herz, J. (1989). Flavor and texture improved canned animal flesh and process. **U.S. Patent**, 3310, 413.

- Chae, S. K., Itoh, H. and Nikkunis, S. (1989). Effect of soy sauce koji and commercial proteolytic enzyme on the acceleration of fish sauce production. **Korean Journal of Food Science and Technology**, 21(5), 639-648.
- Chaychotchaoen, N. (1987). Study of proteolytic activity of bacteria from fermented fish product. **Master thesis, M.S.**, King Mongkut' s Inst of Technology Thonburi Campus, Bangkok.
- Chen, H. C., Ho, W. L., Moody, M. W. and Jiang, S. T. (1992). Modification of *Cellulomanas flavigena* NTOU 1 characteristics for the production of shrimp hydrolysates. **Journal of Food Science**, 57(2), 271-276.
- Choorit, W. and Prasertsan, P. (1992). Characterization of protease produced by newly and identified proteolytic microorganisms from fermented fish (Budu). **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 8(3), 284-286.
- Chopra, A.K. and Mathur, D.K. (1984). Isolation screening and characterization of thermophilic *Bacillus* sp. from dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, 52, 263.
- Chu, W.H. (2007). Optimization of extracellular alkaline protease production from species of *Bacillus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 34, 241-245.
- Church, I. and Parsons, A. (1995). Modified atmosphere packaging technology: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 67(11), 143-152.
- Clausen, E., Gildberg, A. and Raa, J. (1985). Preparation and testing of an autolysate of fish viscera as growth substrate for bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 50(6), 1556-1557.
- Dalgaard, P., Gram, L. and Huss, H.H. (1993). Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmosphere. **International Journal of Food Microbiology**, 28 (4), 21-29.
- Debette, J. (1991). Isolation and characterization of an extracellular proteinase produced by a soil strain *Xanthomonas maltophila*. **Current Microbiology**, 22, 85-90.

- Diaz-Castaneda, M. and Brisson, G.J. (1987). Replacement of skimmed milk with hydrolyzed fish protein and nixtamal in milk substitutes for dairy calves. **Journal of Dairy Science**, 70, 130-140.
- Dixon, M. and Webb, E.C. (1979). **Enzyme** (3<sup>rd</sup>ed.). London: Longman.
- Endo, S. (1962). Studies on protease produced by thermophili bacteria. **Journal of Fermentation Technology**, 40, 346-353.
- Fagbenro, O.A. and Bello-Olusoji, O.A. (1997). Preparation, nutrient composition and digestibility of fermented shrimp head silage. **Food Chemistry**, 60, 480-493.
- Farber, J.M. (1991). Microbiological aspects of modified atmosphere packaging technology review. **Journal of Food Protection**, 54 (3), 58-70.
- Farber, J.M., Warburton, D.W., Gour, L. and Milling, M. (1990). Microbiology quality of foods packaged under modified atmospheres. **Food Microbiology**, 7 (4), 327-334.
- Ferrero, M.A., Castro, G.R., Abate, C.M., Baigori, M.D. and Sineriz, F. (1996). Thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* MIR 29 : Isolation, protuction and characterization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 45, 327-332.
- Fraser, O.P. and Sumar S. (1998). Composition changes and spoilage fish (part II) microbiological induced deterioration. **Nutrition and Food Science**, 6 (3), 325-329.
- Gagne, N. and Simpson, B.K. (1993). Use of proteolytic enzymes to facilitate recovery of chitin from shrimp wastes. **Food Biotechnology**, 7, 253-63.
- Garcia-Gomez, M. J., Huerta-Ochoa, S., Loera-Corral, O. and Prado-Barragan, L. A. (2009). Advantages of a proteolytic extract by *Aspergillus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. **Food Chemistry**, 112, 604-608.
- George, S., Raju, V. Krishnan, M.R.V., Subramanian, T.V. and Jayaraman, K. (1995). Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid-state fermentation and its application in the unhairing of hides and skin. **Process Biochemistry**, 30(5), 457-462.

- Gessesse, A. and Gashe, B.A. (1997). Production of alkaline protease by an alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline soda lake. **Biotechnology Letters**, 19(5), 479-481.
- Gildberg, A. (1993). Enzymic processing of marine raw materials. **Process Biochemistry**, 28, 1-15.
- Godfrey, T. (1983). Flavouring and coloring. In Godfrey, T. and Reichelt, J. (Eds.), **Industrial Enzyme** (pp. 305-314). London: Macmillan.
- Godfrey, T. and West, S. (1996). **Enzymology** (2<sup>nd</sup> ed.). New York: Stockton Press.
- Gray, R.J.H., Hoover, D.G. and Mur, A.M. (1983). Attenuation of microbial growth on modified atmosphere-packaged fish. **Journal of Food Protection**, 46(9), 600-613.
- Green, J.H. and Mattick, J.F. (1979). Fishery waste management. In **food processing waste management** (pp. 208-210). U.S.A.: Connecticut : Avi.
- Greene, R.V., Cotta, M.A. and Griffin, H.L. (1989). A novel, spiral-symbiotic bacterium isolated from marine shipworm secretes proteolytic activity. **Current Microbiology**, 19, 353-356.
- Griffin, P. L. and Forgarty, W. M. (1973). Production and purification of the metalloprotease of *Bacillus polymyxa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 26, 185-190.
- Guzzo, J., Murgier, M., Filloux, A. and Lazdunski, A.M. (1990). Cloning of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease gene and secretion of the protease into the medium by *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, 172(2), 942-948.
- Hall, G.M. and Ahmad, N.H. (1992). Functional Properties of Fish Protein Hydrolysates. In G.M. Hall (Ed.). **Fish Processing Technology** (pp. 249-274). New York: Van Nostrand Reinhold.
- He, H., Chen, X., Sun, C., Zhang, Y. and Gao, P. (2006). Preparation and functional evaluation of oligopeptide-enriched hydrolysate from shrimp (*Acetes chinensis*) treated with crude protease from *Bacillus* sp. SM98011. **Bioresource Technology**, 97, 385-90.

- Holt, J. G., Sneath, P.H., Krieger, N.R. (1994). **Bergey's manual of determinative bacteriology**, New York: Lippincott Williams and Wilkins. Ninth edition.
- Horikoshi, K. (1971). Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. **Agriculture Biological Chemistry**, 35, 1407-1414.
- Hoyle, N. T. and Merritt, J. H.. (1994). Quality of fish protein hydrolysates from herring. **Journal of Food Science**, 59, 76-79.
- Hyun, C.K. and Shin, H.K., (2000). Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides, **Process Biochemistry**, 36(1), 65-71.
- Jenkins, K.J., Emmons, D.B., Larmond, E. and Sauer, F.D. (1982). Soluble partially hydrolysed fish protein concentrate in calf milk replacers. **Journal of Dairy Science**, 65, 784.
- Jissim, S., Salt, W. G. and Stretton, R. J. (1988). The preparation and use of media base on a simple fish waste extract. **Letters in Applied Microbiology**, 6, 139-143.
- Kazanas, N. (1968). Proteolytic activity of microorganisms isolated from freshwater fish. **Journal of Applied Microbiology**, 16, 128-132.
- Kim, S.K., Jeon, Y.J., Byeun, H.G., Kim, Y.T. and Lee, C.K. (1997). Enzymatic recovery of cod frame proteins with crude proteinase from tuna pyloric caeca. **Fisheries Science**, 63, 421-427.
- Kobayashi, T., Hakamada, Y., Adachi, S., Hitomi, J., Yoshimatsu, T., Koike, K., et al. (1995). Purification and properties of alkaline protease from alkaline *Bacillus* sp. KSM-KK16. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 43, 473-481.
- Kristinsson, H. G. and Rasco, B. A. (2000). Kinetics of the hydrolysis of atlantic salmon (*Salmosalar*) muscle proteins by alkaline protease and a visceral serine protease mixture. **Process Biochemistry**, 36, 131-139.
- Kungsuwan, A., Ittipong, B., Chanarkrachang, S., Kiatkangwalkrai, P., Rao, M.S. and Stevens, W. (1996). **Batch fermentation on shrimp head**. Master thesis, M.S., Asian Institute of Technology, Bangkok.



- Kwon, Y.T., Kim, J.O., Moon, S.Y., Lee, H.H. and Rho, H.M. (1994). Extracellular alkaline protease from alkalophilic *Vibrio metschnikovii* strain RH530. **Biotechnology Letters**, 16, 413-418.
- Loffler, A. (1986). Proteolytic enzyme: sources and applications. **Food Technology**, 38(1), 63-70.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, 193, 265-275.
- Mackie, J.M. (1974). Proteolytic enzymes in recovery of protein from fish waste. **Process Biochemistry**, 9, 12-14.
- Malathi, S. and Chakraborty, R. (1991). Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. **Applied and Environmental Microbiology**, 57, 712-16.
- Manachini, P.L. and Fortina, M.O. (1998). Production in sea-water of the most stable alkaline protease by a halotolerant strain of *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology Letters**, 20(6), 565-568.
- Mandelstam, J., McQuillen, K. and Dawes, I. (1982). **Biochemistry of bacterial growth** (3<sup>rd</sup> ed.). London: A Halsted Press Book.
- Manzano-mazorra, M.A., Aguilar, R.P., Rojas, E.I. and Sanchez, M.E. (2000). Postmortem changes in black skipjack muscle during storage in ice. **Journal of Food Science**, 65 (5), 774-779.
- Maxcy, R. B. and Sikes, A. (1979). Differentiation of food spoilage bacteria on the basis of their ability to utilize different proteins. **Journal of Food Science**, 44, 1228-1231.
- McMurry, J. (1994). **Fundamentals of organic chemistry**. California: Cole Publishing.
- Meinke, W. W., Rahman, M. A. and Matti, K. K. F. (1972). Some factors influencing protection of protein isolate from whole fish. **Journal of Food Science**, 137, 195-198.

- Miller, R. and Groninger, H.S. (1976). Functional properties of enzymes modified acylated fish protein derivatives. **Journal of Food Science**, 41, 268-272.
- Miyaji, T., Ota, Y., Shibata, T., Mitsui, K., Nakagawa, T. and Watanabe, T. (2005). Purification and characterization of extracellular alkaline serine protease from *Stenotrophomonas maltophilia* strain S-1. **Letters in Applied Microbiology**, 41, 253-257.
- Mohr, V. (1978). Fish protein concentrate production by enzymic hydrolysis, In: Adler-Nissen, J., Eggum, B.O., Munch, L. and Olsen, H.S. (Eds.). **Biochemical Aspects of New Protein Food** (pp. 53-62). New York: Pergamon Press.
- Mohr, V. (1980). Enzyme technology in the meat and fish industries. **Process Biochemistry**, 15, 18-21.
- Molin, G., Stenstrom, M.I. and Ternstrom, A. (1983). The microbial flora of herring fillets after storage in carbon dioxide, nitrogen or air at 2°C. **Journal of Applied Bacteriology**, 55 (1), 49-56.
- Nakajima, M., Shoji, T. and Nabetani, H. (1992). Protease hydrolysate of water soluble fish proteins using a free enzyme membrane reactor. **Process Biochemistry**, 27, 155-160.
- Novo Industri. (1984). **Alcalase<sup>®</sup> Food grade**, Denmark: Novo Industri A/S, Bagsvaerd.
- O'Reilly, T. and Day, D.F. (1983). Effect of culture condition on protease production by *Aeromonas hydrophila*. **Applied and Environmental Microbiology**, 45(3), 1132-1135.
- Ogino, H., Yamada, M., Watanabe, F., Ichinose, H., Yasuda, M. and Ishikawa, H. (1999). Peptide synthesis catalyzed by organic solvent-soluble protease from *Pseudomonas aeruginosa* PST-01 in monophasic aqueous-organic solvent systems. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 87(1), 61-68.
- Oh, Y.S., Shih, I.L., Tzeng, Y.M. and Wang, S.L. (2000). Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, 27, 3-10.

- Ostrander, J.G., Nystrom, P.J. and Martinsen, C.S. (1997). Utilisation of a fish protein isolate in whipped gelatin desserts. **Journal of Food Science**, 42, 559-560.
- Oyama, H., Kinjoh, M., Watari, M. and Murao, S. (1997). Purification and characterization of an alkaline proteinase produced by *Pimelobacter* sp. Z-483. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 84(4), 351-353.
- Parry, R.T. (1993). **Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging of Foods**. Glasgow: Blackie.
- Payne, J.W. (1980). **Microorganisms and nitrogen sources**. New York: U.S.A. A wiley-interscience publication.
- Pedersen, H. H., Olsen, H. S. and Nielsen, P. M. (1994). Method for production of meat hydrolyzate and a use of the meat hydrolyzate. **PCT Patent Applied**, 94(20), 1003.
- Pero, J. and Sloma, A. (1993). In Sonenshien. A. L., (Ed.), **Bacillus subtilis and other gram- positive bacteria** (pp. 939-952). New York: The United State of America,
- Priest, F. G. (1977). Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. **Bacteriology Reviews**, 41, 711-753.
- Quaglia, G.B. and Orban, E. (1987). Influence of the degree of hydrolysis on the solubility of the protein hydrolysate from sardine (*Sardina pilchardus*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 38, 271-276.
- Quaglia, G.B. and Orban, E. (1990). Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine (*Sardina pilchardus*) protein hydrolysate. **Journal of Food Science**, 55, 1573.
- Rahman, R.N.Z.A., Razak, C.N., Ampon, K., Basri, M., Yunus, W.M.Z.W. and Salleh, A.B. (1994). Purification and characterization of heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 40, 822-827.
- Ray, B. (1996). **Fundamental Food Microbiology**. New York: CRC Press.

- Richter, E.R. and Banwart, G.J. (1983). Microbiology and sensory evaluation of fresh fish packaged in carbon dioxide for retail outlets in the midwest. **Journal of Food Protection**, 46(3), 245-247.
- Roe, S. (2001). **Protein purification techniques** (2<sup>nd</sup> ed.). New York: Oxford.
- Rutman, M. and Heimlich, W. (1974). The economic marketing and technology of fish protein concentrate : The fish protein hydrolysate process. **Journal of Food Science**, 74(1), 164.
- Sarles, W.B., Frazier, W.E., Wilson, J.B. and Knight, S.G. (1951). **Microbiology. General and applied**. New York: Haper and brothen publisher.
- Sathivel, S., Bechtel, P.J., Babbitt, J., Smiley, S., Crapo, C., Reppond, K.D., et al. (2003). Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) by product hydrolysates. **Journal of Food Science**, 68, 2196-2200.
- Sen, D.P., Sripathy, N.V., Lahiry, N.L., Sreenivasan, A. and Subrahmanyam, V. (1962). Fish hydrolysates : 1 Rate of hydrolysis of fish flash with papain ; 2 Standardization of digestion condition. **Food Technology**, 16, 138-142.
- Shahidi, F., Han, X, Q. and Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysate from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**, 53, 285-293.
- Shirai, K., Guerrero, I., Huerta, S., Saucedo, G., Castillo, A., Gonzatez, R.O. and Gall, G.M. (2001). Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. **Enzyme and Microbial Technology**, 28, 446-452.
- Sikorski, Z., Pan, B. and Shakidi, F. (1994). **Seafood Proteins**. London: Chapman & Hall.
- Sripathy, N.V., Sen, D.P., Lahiry, N.L., Sreenivasan, A. and Subrahmanyam, V. (1962). Fish hydrolysatesII standardization of digestion condition for preparation of hydrolysates rich in peptones and proteoses. **Food Technology**, 16(5), 141-142.
- Steel, D.B., Fiske, M.J., Steel, B.P. and Kelley, V.C. (1992). Production of a low-molecular-weight, alkaline-active, themostable protease by a novel, spiral-

- shaped bacterium, *Kurthia spiroforme* sp. nov. **Enzyme and Microbial Technology**, 14, 358-360.
- Stephens, N.L., Bough, W.A., Beuchat, L.R. and Heaton, B.K. (1976). Preparation and evaluation of two microbiological media from shrimp heads and hulls. **Applied and Environmental Microbiology**, 31(1), 1-6.
- Tannenbaum, S.R., Ahem, M. and Bates, R.P. (1970). Solubilisation of fish protein concentrate. **Food Technology**, 24, 604-608.
- Tarrant, P.J.V., Jenkins, N., Pearson, A.M. and Dutson, T.R. (1973). Proteolytic enzyme preparation from *Pseudomonas fragi*. Its action on pig muscle. **Applied Microbiology**, 25, 996.
- Tsuchiya, T. (1992). Fish as food, nutrition sanitation and utilization. **Biochemistry of fish oil**. New York: Academic Press.
- Vecht-Lifshitz, E., Almas, K.A. and Zomer, E. (1990). Microbial growth on peptone from fish industrial wastes. **Letters in Applied Microbiology**, 10, 183-186.
- Vojdari, F. and Whitaker, J.R. (1994). Chemical and enzymatic modification of proteins for improved functionality. In Hettiarachchy, N.S. and Ziegler, G.R. (Eds.), **Protein functionality in food systems** (pp. 261-309). New York: Marcel Dekker.
- Wang, S.L. and Chio, S.H. (1997). Deproteinization of shrimp and crab shell with the protease of *Pseudomonas aeruginosa* k-187. **Enzyme and Microbial Technology**, 22, 629-633.
- Wang, S.L., Wang, C.L. and Chio, Y.H. (2006). Two novel surfactant-stable alkaline proteases from *Vibrio fluvialis* TKU005 and their applications. **Enzyme and Microbial Technology**, 40(5), 1213-1220.
- Whitaker, J. R. (1994). **Principle of enzymology for the food science**. New York: Marcel Dekker.
- Yang, J.K., Shih, I.L., Tzeng, T.M. and Wang, S.L. (2000). Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. **Enzyme and Microbial Technology**, 26(5), 406-413.

- Yu, S.Y. and Tan, L.K. (1992). Enzymic solubilization of proteins of *Oreochromis mossambicus* by alkalase. **Asean Food Journal**, 7, 157-158.
- Yukio, T., Hisataka, T., Hidesato, S. and Yuzuru, S. (1987). *Bacillus stearothermophilus* KP 1236 neutral protease with thermostabiity comparable to thermolysin. **Letters in Applied Microbiology**, 27, 186-191.
- Zakaria, Z., Hall, G.M. and Shama, G. (1998). Lactic acid fermentation of scampi waste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recovery. **Process biochemistry**, 33, 1-6.
- Zhao, Q.Y., Garreau, I., Sannier, F. and Piot, J.M. (1997). Opioid peptides derived from hemoglobin : hemorphins. **Biopolymers**, 43(2), 75-98.
- Zhao, Q.Y., Piot, J.M., Gautier, V. and Cottenceau, G., (1996). Isolation and characterization of a bacterial growth-stimulating peptide from a peptic bovine hemoglobin hydrolysate, **Applied Microbiology and Biotechnology**, 45(6), 778-784

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์

## การวิเคราะห์ทางกายภาพ

### 1. สีของเปปโตินผง (colour) (AOAC, 1990)

นำเปปโตินผงแห้งมาวัดค่าสีด้วยเครื่อง 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  $L^*$  มากแสดงว่าสีสว่างมาก 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 จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักที่แน่นอน ชั่งตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ใส่ในจานอะลูมิเนียมให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 2 ถึง 5 กรัม แล้วนำเข้าอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 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 นำออกมาใส่ในเดซิเคเตอร์ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมาชั่ง จากนั้นนำมาเผาต่อจนได้น้ำหนักต่างกันไม่เกิน 12 มิลลิกรัม จุดน้ำหนักที่น้อยที่สุด 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 จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปกลั่นในชุดกลั่น โดยเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เก็บส่วนที่กลั่นได้ในสารละลายกรดบอริก (boric acid) ความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่มีอินดิเคเตอร์ผสมอยู่ ปฏิกริยาจะครบแน่นจนหมด จากนั้นปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 150 มิลลิลิตร ไตรเทอร์ทอลที่กลั่นได้ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นร้อยละ 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 ที่ใช้ไตเตรท blank (ml)

$v_2$  คือ ปริมาตรของ standard HCl ที่ใช้ไตเตรทสารตัวอย่าง (ml)

M คือ ความเข้มข้นของ standard HCl (Molar)

#### การคำนวณ

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

เมื่อ  $v_1$  คือ ปริมาตรของ standard HCl ที่ใช้ไตเตรท blank (ml)

$v_2$  คือ ปริมาตรของ standard HCl ที่ใช้ไตเตรทสารตัวอย่าง (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 เดิมตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ลงใน extraction cup ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปใส่ในเครื่อง extraction unit ทำการสกัด (boiling) นาน 20 นาทีและทำการชะล้าง (rinsing) นาน 45 นาที แล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อระเหยตัวทำละลายออกไป จากนั้นนำไปเก็บในเดซิเคเตอร์ 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 เป็น สับสเตรท เตรียมโดยชั่งเคซีน 2 กรัม ต้มด้วย NaOH 0.1 M 25 มิลลิลิตร จนกระทั่งเคซีน ละลายหมด ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.5 และปรับปริมาตรด้วย phosphate buffer 0.05 M ให้เป็น 100 มิลลิลิตร

6.1.2 สารละลาย trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ใช้เพื่อ หยุดกิจกรรมเอนไซม์ เตรียมโดยชั่ง trichloroacetic acid 10 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ เป็น 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 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  31.2 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : 0.2 M dibasic sodium phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  53.65 กรัม หรือ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  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 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

6.2.3 นำเอนไซม์ที่เจือจางแล้วมา 1 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายเคซีน ในข้อ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย trichloroacetic acid ร้อยละ 10 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 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

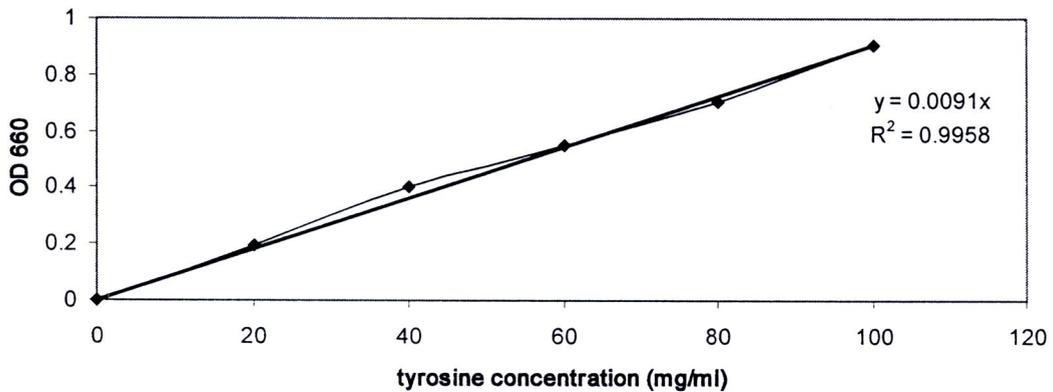
7.2.1 หากกราฟมาตรฐานของไทโรซีนโดยเจือจางสารละลายมาตรฐานไทโรซีนให้มีความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

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 นำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานแล้วคำนวณหาปริมาณไทโรซีนที่มีในตัวอย่าง



กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของไทโรซีนกับค่า absorbance ที่ 660 nm.



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

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

เมื่อ Total N คือ ร้อยละไนโตรเจนในวัตถุดิบ (ตัวอย่างเครื่องในปลาหับทิม)

## การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

### วิธีสเปรตเพลท (spread plate)

ถ่ายตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีตัวอย่างเครื่องในปลาที่บดละเอียดที่เจือจาง NaCl ร้อยละ 0.85 แต่ละความเจือจางลงบนผิวอาหารที่เตรียมไว้ลงในจานเพาะเชื้อ 2 จาน จานละ 0.1 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวน้ำของอาหารแต่ละจาน นำไปบ่มเพาะเชื้อโดยไม่ต้องคว่ำจาน

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

$$\text{cfu ต่อกรัม หรือ cfu ต่อมิลลิลิตร} = n/d$$

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

ใช้ห้วงเชื้อเชื้อที่ถ่ายจากหลอด 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 ใส่ขวดลูกผสมฟูที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติม 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

เติมส่วนผสมที่เหลือแล้วนำไปต้มจนอุ่นละลาย 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 ถ้ายาอาหารใส่หลอดทดลอง 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 มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

ประสิทธิภาพในการย่อยเนื้อในปลาตะเพียน (*Oreochromis niloticus*) ด้วยเอนไซม์โปรตีนจาก  
*Bacillus subtilis* TISTR 008 ที่สภาวะต่างๆ  
อรพรรณ พยัคฆ์<sup>1</sup> ปวีณา น้อยทรัพย์<sup>2</sup> วรสิทธิ์ โทจัมปา<sup>1</sup> และ อรอินทร์ ประไพชัย<sup>1</sup>

The digestion efficacy of red tilapia (*Oreochromis niloticus*) viscera using protease from *Bacillus subtilis*  
TISTR 008 at various conditions  
Oraphan Payakul<sup>1</sup> Paweena Noitup<sup>2</sup> Worasit Tochampa<sup>1</sup> and Orn-in Prachaiyo<sup>1</sup>

<sup>1,2</sup> คณะเกษตรศาสตร์ วิทยาการธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ พิชญ์โลก 65000  
\*Corresponding author. E-mail: paweeran@nu.ac.th

บทคัดย่อ

ประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์โปรตีนจาก *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 ประเมินกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนจากเส้นผ่านศูนย์กลางของใสที่ปรากฏ 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 สร้างวงใสที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางกว้างที่สุด ที่ pH 7.5 อุณหภูมิ จากนั้นทำการเพาะเชื้อเริ่มต้น 10<sup>8</sup> CFU ปริมาตร 1 มิลลิตร ลงในตัวอย่างวัตถุดิบที่ได้จากการผสมเนื้อในปลาตะเพียนปริมาณ 25 กรัมและน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิตร ที่ปรับระดับ pH เป็น 6.5 7.5 8.5 9.5 และ 10.5 บันทึกอุณหภูมิ 31 37 45 และ 53°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และวัดระดับการย่อย (%DH) ในรูปของกรดอะมิโนอิสระ (α-amino acid) พบว่า *B. subtilis* TISTR 008 มีระดับการย่อยสูงสุดที่ 68.25 ที่ระดับ pH 7.5 อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง  
คำสำคัญ : แบซิลลัส, โปรตีนเอส, 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<sup>8</sup> 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

โปรตีนเอส (protease) เป็นเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสลายโปรตีน ที่ถูกนำมาผลิตในเชิงการค้ามีส่วนใหญ่ผลิตจากแบคทีเรียสกุลแบซิลลัส (*Bacillus*) โดยโปรตีนเอสจากแบคทีเรียชนิดนี้มีปริมาณการใช้สูงกว่าโปรตีนเอสจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ พบว่ามีการนำเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. มาใช้อย่างแพร่หลายทั้งในทางอุตสาหกรรม เกษตรกรรม ผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ นอกจากนี้จะมีการนำเอนไซม์โปรตีนเอสมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ แล้ว จึงพบว่าโปรตีนเอสเป็นเอนไซม์ที่มีส่วนแบ่งทางการตลาดสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่น (ยาพิน คำนาคูตีพันธ์, 2546) เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติค่อนข้างหลากหลาย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสของ *Bacillus subtilis* โดยผู้วิจัยหวังว่าจะสามารถนำสถานะที่เหมาะสมดังกล่าวไปใช้เป็นพื้นฐานในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 สายพันธุ์แบคทีเรีย

ก้านเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 008 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.)

2.2 การขยายเชื้อแบคทีเรีย

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

2.3 การเตรียมโคкультิว

ใช้ผสมเมล็ดจากอุตสาหกรรมแปรรูปปลา ถังรีองในปลาที่เก็บมา จากบ้านปลาสงแคว อ.พินธุ ภูเก็ต จนถึงโดยขบวนในถังน้ำแข็ง โดยมีระยะเวลาตั้งแต่ปลาตายจนถึงการเตรียมโคкультิวไม่เกิน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดรีองในปลาที่ขมมาล้าง ทำความสะอาด ทำการแยกไขมันออกบางส่วน นำไปให้ละเอียดและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18°C จนกว่าจะนำมาใช้ทดลอง

2.4 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของโคкультิว

ผสมตัวอย่างในปลาที่ขมที่บดละเอียดกับน้ำกลั่น ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนักคือ ปริมาณนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน และไขมัน คำนวณวิธีของ AOAC (2000) และค่าความเป็นกรดด้วย pH meter

2.5 ศึกษาผลกระทบบนขั้นตอนการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสของแบคทีเรีย

ทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์โปรตีนเอส 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 ชั่วโมง เพื่อให้เป็นแนวทางในการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

2.6 ศึกษาผลกระทบการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับการย่อยสลายตัวของโคкультิว

เลือกสถานะจากขั้นที่ 2.5 มาใช้เป็นแนวทางในการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอส โดยใช้เครื่องในปลาที่ขมเป็นสับสเตรทในการเลี้ยงเชื้อ (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น  $10^4$  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 หลังจากนั้นนำตัวอย่างวัดระดับการย่อยสลาย (%DH) ในรูปของกรดอะมิโนอิสระ (G-amino acid) โดยวิธีของ Hoyle and Merrin (1994) เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ย่อยสลายด้วยตัวเอง

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเครื่องในปลาหับทิม

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเครื่องในปลาหับทิม พบว่ามีปริมาณความชื้นร้อยละ 76.30 โปรตีนร้อยละ 14.90 ไขมันร้อยละ 5.13 และส่วร้อยละ 1.64 (ตารางที่ 1) สะท้อนได้ว่าเครื่องในปลาหับทิมมีโปรตีนอยู่ในปริมาณค่อนข้างสูง ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดโปรตีน ไสโครโกลบูลินได้เป็นอย่างดี

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างวัตถุดิบ (เครื่องในปลาทิม)

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

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์โปรตีนของแบคทีเรีย

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีนของ *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 สร้างวงไลติสเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยได้ 10.0-11.3 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 37°C และ 10.5-14.0 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 45°C แสดงว่า *Bacillus subtilis* TISTR 008 สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีนออกต่อสลายโปรตีนในอาหารจำเพาะ ที่อุณหภูมิ 45°C ในสภาวะที่เป็นด่างอ่อนได้ดีกว่าการผลิตเอนไซม์โปรตีนที่อุณหภูมิ 37°C (ตารางที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย การคัดเลือก *Bacillus* sp. ที่ผลิตเอนไซม์โปรตีนอะไมเลส และไลเปสจากดิน พบว่า *Bacillus* sp. สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีนอะไมเลส และไลเปสได้ดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 45°C (จักรพันธ์ สุวรรณพิมพ์ และสุพรรณิ แก้วสาร, 2552)

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

Temp.	pH	ความยาว Ø วงไล (มม.) ของ <i>Bacillus subtilis</i>
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

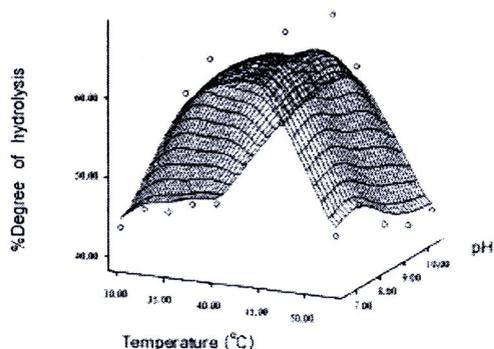
\* ค่าเฉลี่ยความยาว Ø วงไล 3 ซ้ำ

### 3.4 การศึกษาชะงักการย่อยสลายโปรตีนโดยการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียในตัวอย่างเครื่องในปลาที่หมัก

เมื่อนำสถานะจากการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์โปรติเอสมาใช้เป็นแนวทางการผลิตและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียเพื่อหมักเนื้อปลาให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนในตัวอย่างเครื่องในปลาที่หมักเทียบกับการย่อยสลายตัวเอง พบว่าเมื่อทำการเพาะเชื้อลงในตัวอย่างที่ระดับ 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 นั้นจะเกิดการย่อยสลายได้สูงที่สุดที่ระดับ pH 7.5 อุณหภูมิ 45°C ที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยให้ค่าร้อยละของระดับการย่อยสลายเท่ากับ 68.25 (ตารางที่ 4) ซึ่งพบว่าระดับการย่อยสลายมีค่าสูงกว่าการย่อยสลายตัวเองที่ระดับเดียวกันทั้งหมด

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

Temp.	pH	Time (h.)	Control (autolysis)	<i>Bacillus subtilis</i>
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 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดค่าแอมไนด์ของระดับการย่อยสลายของ *B. subtilis* TISTR 008 ที่เวลา 12 ชั่วโมง

#### 4. สรุปผลการวิจัย

*B. subtilis* TISTR 008 มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสได้ดีที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk agar ที่ระดับ pH 7.5 อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และมีอนำมาใช้ในการย่อยสลายโปรตีนในตัวอย่างเครื่องปั้นปลาพื้นบ้าน *B. subtilis* TISTR 008 ซึ่งคงให้ระดับการย่อยสลายสูงสุดที่ pH 7.5 อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

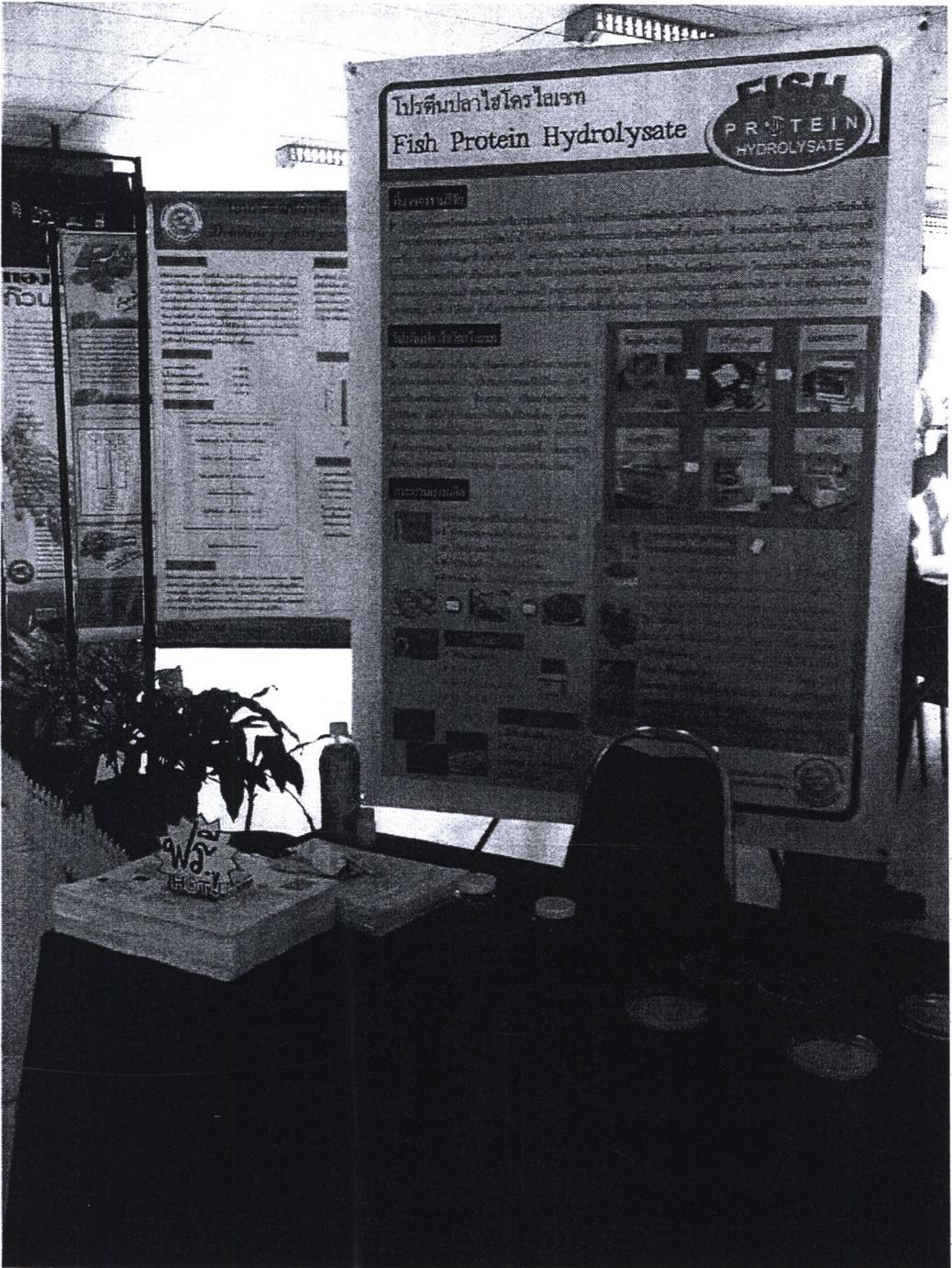
#### 5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ ปี 2554 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

#### 6. เอกสารอ้างอิง

- จักรพันธ์ สุวรรณพิมพ์ และสุพรรณิ แก่นสาร อะโอกิ, (2552). การคัดเลือก *Bacillus* sp. ที่ผลิตเอนไซม์โปรตีนเอส อะไมเลส และไลเปส จากดิน. *วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*, 40(1), 389-392.
- ชวาทิน คำนาคูสัตตพันธ์ และทวีวัฒน์ วิจิตรสุนทรกุล. (2546). การเพิ่มผลผลิตในกระบวนการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนเอสของ *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.

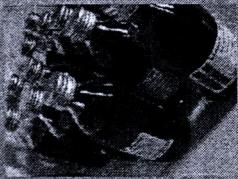
- 2) จัดแสดงนิทรรศการ ในงานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 9 วันที่ 27 – 31 กรกฎาคม 2554  
คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร





# โปรตีนปลาไฮโดรไลเซต

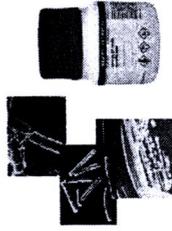
ผลการวิจัยได้พบว่าโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตที่ใช้จากปลา  
 ย่อยหัวปลาซึ่งไม่ผ่านการหมักและใช้เทคนิคการสกัดที่เรียกว่าไฮดรอลิ  
 ซ์สามารถช่วยเสริมสุขภาพของกระดูกและกล้ามเนื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ  
 นาน มีคุณสมบัติที่ช่วยลดน้ำหนักและช่วยเสริมสุขภาพของหัวใจและ  
 เส้นเลือดในหัวใจ นอกจากนี้ยังช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดและ  
 ช่วยเสริมสุขภาพของตับและไต นอกจากนี้ยังช่วยลดระดับคอเลสเตอรอล  
 ในเลือด และช่วยเสริมสุขภาพของหัวใจและเส้นเลือดในหัวใจ ซึ่ง  
 มีคุณประโยชน์สูงและช่วยเสริมสุขภาพของกระดูกและกล้ามเนื้อ  
 ได้อย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัย



ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร  
 คณะเกษตรศาสตร์  
 ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม



โปรตีนปลาไฮโดรไลเซต  
 Fish protein hydrolysate





งานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 9 (เกษตรภาคเหนือตอนล่าง)  
 “เกษตรกรรมไทยสู่ธุรกิจยั่งยืน”

27 - 31 กรกฎาคม 2554

ณ คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม  
 มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก

การจัดนิทรรศการและถ่ายทอดเทคโนโลยี

เรื่อง การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเศษเหลือของปลาเพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

รายชื่อผู้เข้าชมงาน

เลขที่	ชื่อ-สกุล	ลายเซ็น
1		
2		
3	น.ส. เกษณี เกษมพงษ์	TK
4		
5	นางอานนด ๒๕๓๓๓๓	อานนด
6	น.ส. อรุณรัตน์ มานะพงศ์	อรุณรัตน์
7	น.ส. อรุณรัตน์ มานะพงศ์	อรุณรัตน์
8	น.ส. อรุณรัตน์ มานะพงศ์	อรุณรัตน์
9	น.ส. อรุณรัตน์ มานะพงศ์	อรุณรัตน์
10	น.ส. อรุณรัตน์ มานะพงศ์	อรุณรัตน์
11	น.ส. อรุณรัตน์ มานะพงศ์	อรุณรัตน์
12	น.ส. อรุณรัตน์ มานะพงศ์	อรุณรัตน์
13	น.ส. อรุณรัตน์ มานะพงศ์	อรุณรัตน์
14	น.ส. อรุณรัตน์ มานะพงศ์	อรุณรัตน์
15	น.ส. อรุณรัตน์ มานะพงศ์	อรุณรัตน์
16	น.ส. อรุณรัตน์ มานะพงศ์	อรุณรัตน์



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

Proceedings การประชุมวิชาการ “นเรศวรวิจัย” ครั้งที่ 7

กลุ่มวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี



ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *Bacillus cereus* TISTR 687 ในการย่อยเครื่องในปลาที่ต้ม  
 อรพรรณ พยัคกุล<sup>1</sup> วรสิทธิ์ โทจำปา<sup>1</sup> อรินทร์ ประไซ์<sup>1</sup> และ ปวีณา น้อยทัพ<sup>1</sup>

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

Oraphan Payakkul<sup>1</sup>, Worasit Tochampa<sup>1</sup>, Om-in Prachaiyo<sup>1</sup> and Paweena Noitup<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

<sup>1</sup>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) ที่ระดับความเป็นกรดต่าง 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 สร้างวงใสมีเส้นผ่านศูนย์กลางกว้างที่สุดที่ความเป็นกรดต่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเพาะเชื้อเริ่มต้น  $10^8$  cfu ปริมาตร 1 มิลลิตร ลงในตัวอย่างวัดอุณหภูมิจากการผสมเครื่องในปลาที่ต้มปริมาณ 25 กรัมและน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิตร ที่ปรับระดับความเป็นกรดต่างเป็น 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 ( $\alpha$ -amino acid) พบว่า *B. cereus* TISTR 687 มีระดับการย่อยสลายสูงสุดเท่ากับ 67.00 ที่ระดับความเป็นกรดต่าง 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  $\alpha$ -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 จากการขยายตัวของอุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์น้ำ ทำให้มีเศษเหลือใช้จากกระบวนการแปรรูปเกิดขึ้นมาก ซึ่งเศษเหลือเหล่านี้มีมูลค่าต่ำ และหากมีการจัดการที่ไม่ดีพอจะเกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมได้ เพราะเศษเหลือเหล่านี้เกิดการเน่าเสียได้ง่ายเนื่องจากมีส่วนประกอบของโปรตีนและ



ไขมันเป็นส่วนใหญ่ โดยหากเป็นโรงงานแปรรูปขนาดใหญ่จะขายต่อให้แก่โรงงานผลิตอาหารสัตว์ในราคาถูก แต่หากเป็นผู้ประกอบการแปรรูปขนาดเล็กจะทิ้งเศษเหลือเหล่านี้ร่วมกับขยะอื่น ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมได้ ในกระบวนการแปรรูปปลาจะก่อให้เกิดวัสดุเศษเหลือประมาณร้อยละ 30 - 35 (สันทัด, 2549) ที่พบมากคือ เครื่องใน หนัง เกล็ด โครงและก้าง ซึ่งเศษเหลือเหล่านี้ประกอบด้วยโปรตีนและกรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมาณสูง (Shahidi et al., 1997) ดังนั้นจึงมีการนำเศษเหลือดังกล่าวมาใช้ให้เกิดประโยชน์หรือเพิ่มมูลค่า พบว่าการนำวัสดุเศษเหลือจากปลามาใช้ได้รับความสนใจมานานกว่า 10 ปีแล้ว โดยนำมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซต (protein hydrolysate) เปปไทด์ (peptide) หรือสารสกัดจากปลา (fish extract) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์โปรตีเอส (protease) (Kim et al., 1997) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีส่วนแบ่งทางการตลาดในการนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรมต่างๆ สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ,ยวพันธ์ 2546 (เอนไซม์โปรตีเอสที่ถูกนำมาผลิตใช้ในเชิงการค้าส่วนใหญ่) นั้นผลิตจากแบคทีเรียสกุลบาซิลลัส (*Bacillus* sp.) ที่มีปริมาณการใช้ที่ค่อนข้างสูงกว่าเอนไซม์โปรตีเอสที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ โดยมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในทางอุตสาหกรรม เกษตรกรรม เภสัชกรรมและทางการแพทย์ เป็นต้น

การศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนไฮโดรไลเซตได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเซตมีคุณสมบัติที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้หลากหลาย เช่น เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) ในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์น้ำ (สุทธิพงษ์, 2537; เพ็ญศิริ, 2533) กระตุ้นการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Zhao et al., 1996) เป็นสารที่มีสมบัติในการออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนในทางการแพทย์ (Zhao et al., 1997) และเป็นสารที่มีสมบัติในการออกฤทธิ์เพื่อลดความดันโลหิต (Hyun & Shin, 2000) เป็นต้น ซึ่งในกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตอาจใช้กรด ต่าง หรือเอนไซม์ในการย่อยสลาย แต่การใช้กรดต่างในการสกัดนั้นทำให้คุณสมบัติเชิงหน้าที่ลดลง จึงมีการแก้ไขปัญหาดังกล่าวโดยการนำเอนไซม์ที่สกัดได้จากแหล่งต่างๆ มาใช้แทน เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงเพราะเอนไซม์จะมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น (substrate) ความเป็นกรดต่าง ความคงตัวต่อความร้อน ตัวกระตุ้นและตัวยับยั้ง จึงสามารถเลือกใช้ชนิดของเอนไซม์และสภาวะในการย่อยสลายได้ตามความเหมาะสม อีกทั้งสภาวะในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์นั้นไม่รุนแรง ทำให้ได้โปรตีน ไฮโดรไลเซตที่มีคุณภาพดีและมีสมบัติเชิงหน้าที่ตามต้องการ เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายด้วยสารเคมี และเอนไซม์โปรตีเอสจะพบว่าการย่อยสลายโดยการใช้น้ำมันสามารถตัดลีนชอบเซตการย่อยสลายและขนาดของเปปไทด์ (peptide) (ที่เกิดขึ้นได้ (Adler & Nissen, 1986) ในขณะที่การย่อยด้วยสารเคมีนั้นจะไม่สามารถระบุถึงการแตกตัวของพันธะและขนาดของเปปไทด์ได้ แต่ข้อจำกัดของการใช้น้ำมันคือมีต้นทุนการผลิตที่สูง (Brody, 1965 ; Light & Smith, 1963) จึงมีการนำเอนไซม์โปรตีโอไลติก (proteolytic enzyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอสที่ได้จากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์มาใช้ในกระบวนการย่อยสลาย พบว่าการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีโอไลติกเป็นการย่อยสลายโปรตีนที่บริเวณพันธะเปปไทด์ทำให้ได้เปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระ (free amino acids) ออกมา ปกติแล้วโปรตีนปลาสามารถเกิดการย่อยสลายได้เองด้วยเอนไซม์โปรตีเอสที่มีอยู่ตามธรรมชาติในกล้ามเนื้อและเครื่องในปลา (autolysis) เช่น เปปซิน ทริปซิน โคโมทริปซิน และคาเทปซิน เป็นต้น แต่วิธีการย่อยสลายนี้เป็นวิธีที่ค่อนข้างซับซ้อน เนื่องจากเอนไซม์โปรตีเอสที่มีอยู่ในปลามีมากมายหลายชนิด และแต่ละชนิดมีกิจกรรมการทำงานที่แตกต่างกัน ทำให้ไม่สามารถควบคุมการย่อยสลายและต้องใช้เวลาในการย่อยสลายยาวนาน ผลิตภัณฑ์โปรตีนปลาไฮโดรไลเซตที่ได้จึงมีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่ไม่ดีนัก นิยมใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร เช่น น้ำปลา เป็นต้น

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของ *B. cereus* TISTR 687 มาใช้เพื่อเหนี่ยวนำให้เชื้อสร้างเอนไซม์โปรตีเอสออกมาย่อยโปรตีนในสับสเตรท 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

ใช้เชื้อเหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปปลา (เครื่องในปลาทั้งตัว) จากร้านปลาสองแคว จังหวัดพิษณุโลก ชนส่งโดยแช่ในถังน้ำแข็ง โดยมีระยะเวลาตั้งแต่ปลาตายจนถึงการเตรียมวัตถุดิบไม่เกิน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำเครื่องในปลาทั้งตัวมาล้างทำความสะอาด แยกและล้างไขมันออก ปั่นให้ละเอียด เก็บในแก้วพลาสติกชนิดมีฝาปิด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส จนกว่านำมาใช้ทดลอง

#### 3. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

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

#### 4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

อุปสรรคคุณภาพของเอนไซม์โปรติเอส โดยเลี้ยงเชื้อ *B. cereus* TISTR 687 บนอาหารจำเพาะสูตร skim milk agar (Becton Dickinson and Company, USA) ที่ระดับความเป็นกรดต่าง 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. ศึกษาสภาวะการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับ การย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ของวัตถุดิบ

เลือกสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4 นำมาใช้เป็นแนวทางในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้เครื่องในปลาทั้งตัวเป็นสับสเตรทในการเลี้ยงเชื้อ *B. cereus* TISTR 687 (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น  $10^8$  cfu/ml) ที่ระดับความเป็นกรดต่าง 6.5 7.5 8.5 9.5 และ 10.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 31 37 45 และ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมทำการวัดระดับการย่อยสลายที่เกิดขึ้น (%DH) ในรูปของกรดอะมิโนอิสระ ( $\alpha$ -amino acid) โดยวิธีของ Hoyle & Merritt (1994) โดยนำโปรตีนไฮโดรไลเซทปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่หลอด centrifuge เต็ม 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)

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

เมื่อ Total N คือ ร้อยละไนโตรเจนในวัตถุดิบ (ตัวอย่างเครื่องในปลาทั้งตัว)



## ผลการศึกษา

### 1. องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเครื่องในปลาหับทิม พบว่ามีปริมาณความชื้นร้อยละ 76.30 โปรตีนร้อยละ 14.90 ไขมันร้อยละ 5.13 และเถ้าร้อยละ 1.64 (ตารางที่ 1) ซึ่งให้ปริมาณของความชื้นและโปรตีนที่สูง ในขณะที่ให้ค่าปริมาณของไขมันและเถ้าที่ค่อนข้างต่ำ จึงถือว่าเครื่องในปลาหับทิมเหมาะกับการนำไปใช้ในการเป็นสับเสทในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ (เครื่องในปลาหับทิม)

ตัวอย่าง	ความชื้น (ร้อยละ)	โปรตีน (ร้อยละ)	ไขมัน (ร้อยละ)	เถ้า (ร้อยละ)
เครื่องในปลาหับทิม	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 ปมที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่า *B. cereus* TISTR 687 สร้างวงใสวัดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยได้ 8.8-10.0 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และที่ 45 องศาเซลเซียส *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	ชอของวงใส* (มม) (CZ)	ชอของโคโลนี* (มม) (CO)	ผลต่างระหว่าง	ชอของวงใสและโคโลนี (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. สภาวะการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับ การย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ของวัตถุดิบ

เมื่อทดสอบระดับการย่อยสลายโปรตีนของตัวอย่างเครื่องในปลาหับทิม โดยทำการวัดระดับการย่อยสลายที่เวลา 0 ชั่วโมง พบว่ามีระดับการย่อยสลาย ร้อยละ 21.14 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ระดับการย่อยสลายตัวเองของตัวอย่างเครื่องในปลาหับทิมที่ 0 ชั่วโมง

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

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



เหนี่ยวนำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนในตัวอย่างเครื่องในปลาที่บดเทียบกับการย่อยสลายตัวเอง พบว่า เมื่อเพาะเชื้อลงในตัวอย่างที่ความเป็นกรดต่าง 6.5 7.5 8.5 9.5 และ 10.5 บ่มที่อุณหภูมิ 31 37 45 และ 53 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่า *B. cereus* TISTR 687 เกิดการย่อยสลายได้สูงสุดที่ความเป็นกรดต่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยให้ค่าร้อยละของระดับการย่อยสลายเท่ากับ 67.00 (ตารางที่ 4)

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

Temp.	pH	Control (autolysis)	<i>B. cereus</i> 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 เครื่องในปลาที่บดมีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก ร้อยละ 76.30 รองลงมาคือโปรตีนร้อยละ 14.90 นอกจากนี้มีไขมันและเถ้าร้อยละ 5.13 และ 1.64 โดยน้ำหนัก ซึ่งเห็นได้ว่าเครื่องในปลาที่บดมีปริมาณของโปรตีนและไขมันค่อนข้างสูง โดยที่องค์ประกอบของวัตถุดิบที่ใช้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตมีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ วัตถุดิบที่นำมาใช้นั้นควรมีปริมาณโปรตีนสูงพอเหมาะ (Adler-Nissen, 1986) เนื่องจากโปรตีนเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญสำหรับการย่อยสลาย และในขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษานี้จำเป็นต้องมีขั้นตอนของการกำจัดไขมันออกจากวัตถุดิบ เนื่องจากไขมันในวัตถุดิบหากมีมากเกินไปอาจเกิดพันธะหรือจับกับโมเลกุลของโปรตีนเกิดเป็นลิพิดโปรตีน ทำให้มีโครงสร้างที่ใหญ่และซับซ้อนขัดขวางการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์นั่นเอง (Adler-Nissen, 1986)

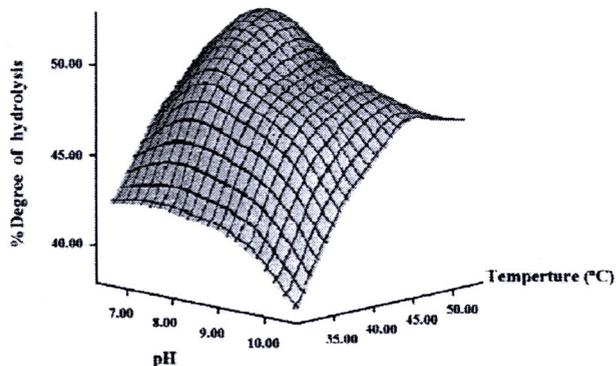
เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของ *B. cereus* TISTR 687 บนอาหารจำเพาะสูตร skim milk agar ที่ระดับความเป็นกรดต่าง 6.5 7.5 8.5 9.5 และ 10.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่า *B. cereus* TISTR 687 สร้างวงใสวัดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยได้ 8.8 - 10.0 และ 9.0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



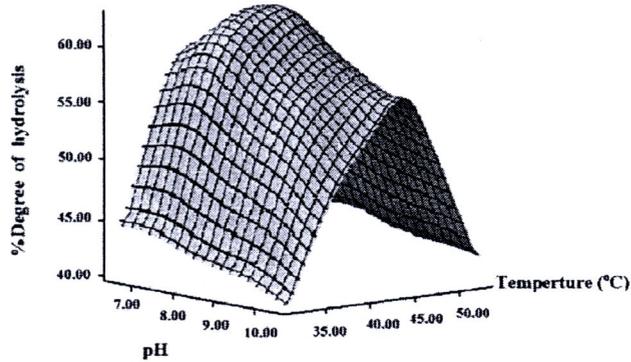
สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสย่อยสลายโปรตีนบนอาหารสูตรจำเพาะ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่เป็นต่างอ่อนได้ดีกว่าการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย การคัดเลือก *Bacillus* sp. ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และไลเปสจากดิน พบว่า *Bacillus* sp. สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส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

จากการศึกษาระดับการย่อยสลายโปรตีนของตัวอย่างเครื่องในปลาที่บดหิมที่เวลา 0 ชั่วโมง พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ผลิตได้ให้ค่าระดับการย่อยสลายตัวเองในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์จากภายนอกอยู่ที่ร้อยละ 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 ในตัวอย่างเครื่องในปลาที่บดหิม โดยเฉพาะเชื่อมโยงในตัวอย่างรวมถึงเตรียมตัวอย่างที่ไม่ได้ทำการเพาะเชื้อเพื่อใช้สำหรับเป็นตัวควบคุม กำหนดสภาวะที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีนเหมือนกันทั้งหมดโดยอยู่ที่ระดับความเป็นกรดต่าง 6.5 7.5 8.5 9.5 และ 10.5 บ่มที่อุณหภูมิ 31 37 45 และ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าทั้งตัวอย่างเครื่องในปลาที่บดหิมที่เพาะเชื้อ *B. cereus* TISTR 687 เพื่อเหนี่ยวนำให้เชื้อสร้างเอนไซม์โปรติเอสออกมาย่อยโปรตีนในสับสเตรทและตัวอย่างควบคุมนั้นเกิดการย่อยสลายได้สูงที่สุดที่สภาวะเดียวกันคือ ที่ระดับความเป็นกรดต่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยให้ค่าร้อยละของระดับการย่อยสลายเท่ากับ 67.00 และ 50.08 ตามลำดับ โดยตัวอย่างเครื่องในปลาที่บดหิมที่เพาะเชื้อให้ค่าของระดับการย่อยสลายสูงกว่าตัวอย่างที่ปล่อยให้เกิดการย่อยสลายตัวเองที่ระดับเดียวกันทั้งหมด

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



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างต่อร้อยละของระดับการย่อยสลายตัวเองของตัวอย่างเครื่องในปลาที่บดหิมที่เวลา 12 ชั่วโมง



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

#### สรุปผลการศึกษา

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. cereus* TISTR 687 ในอาหารสูตรจำเพาะ พบว่า *B. cereus* TISTR 687 มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีที่สุด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk agar ที่ระดับความเป็นกรดต่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และเมื่อนำ *B. cereus* TISTR 687 มาใช้เพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับการย่อยสลายโปรตีนในตัวอย่างเครื่องในปลาที่หมัก พบว่า *B. cereus* TISTR 687 ยังคงให้ระดับการย่อยสลายสูงสุดที่ความเป็นกรดต่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการนำ *B. cereus* TISTR 687 มาใช้เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์โปรติเอสออกมาย่อยโปรตีนในตัวอย่างเครื่องในปลาที่หมักอยู่ที่ความเป็นกรดต่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยให้ร้อยละของระดับการย่อยสลายสูงที่สุดเท่ากับ 67.00

#### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ ประจำปีงบประมาณ 2554 ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ ขอขอบคุณกำลังใจจากครอบครัว รวมทั้งผู้ที่มีส่วนร่วมในการช่วยเหลือให้การทำงานสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีมา ณ โอกาสนี้

#### เอกสารอ้างอิง

- จักรพันธ์ สุวรรณพิมพ์ และสุพรรณิ แก่นสาร ละเอียด. (2552). การคัดเลือก *Bacillus* sp. ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสอะไมเลสและไลเปสจากดิน. *วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*, 40(1), 389-392.
- เพ็ญศิริ อารังลักษณ์. (2533). *การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเลือดเพื่อใช้ในอาหารสัตว์น้ำ*. รมบตคัดย่อวิทยานิพนธ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ, 555.
- ยุวพิน ด่านคูสิตาพันธ์ และทวีรัตน์ วิจิตรสุนทรกุล. (2546). การเพิ่มผลผลิตในกระบวนการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสของ *Aspergillus oryzae* โดยการป้องกันการย่อยสลายตัวเอง. *วารสารมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี*. น.ป.ป.
- สันทัต ศิริอนันต์ไพบูลย์. (2549). *ประสิทธิภาพของระบบเอนไซม์บิอาร์ซึ่งใช้เชื้อแคนดิดา ยูทิลิส (ระยะที่ 1-2)*. น.ป.ป.

