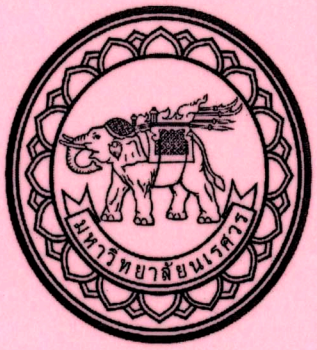
ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
250486



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตเปปโตนจากเศษเหลือจากปลาโดยแบคทีเรียโปรตีโอไลติก เพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปวีนา น้อยทัพ และคณะ

เมษายน ๒๕๕๕

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
250486
CO0256358

สัญญาเลขที่ R2554B816

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตเปปโตนจากเศษเหลือจากปลาโดยแบคทีเรียโปรติโอไลติก
เพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

PEPTONE PRODUCTION FROM FISH WASTE BY PROTEOLYTIC
BACTERIA FOR USE AS MICROBIAL GROWTH MEDIA

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปวีนา น้อยทัพ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรอินทุ์ ประไชโย

คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร

ชื่อโครงการ การผลิตเปปโตนจากเศษเหลือจากปลาโดยแบคทีเรียโปรติโอไลติกเพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

ผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปวีนา น้อยทัพ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรอินทุ์ ประไชโย

บทคัดย่อ

250486

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียโปรติโอไลติกที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส จาก *Bacillus cereus* TISTR 687 และ *Bacillus subtilis* TISTR 008 โดยประเมินจากการสร้างวงใสที่ปรากฏบนผิวหน้าอาหารสูตรจำเพาะ (skim milk agar) พบว่า *B. subtilis* TISTR 008 สร้างวงใสที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางกว้างที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำ *B. subtilis* TISTR 008 ไปใช้ในการย่อยสลายเครื่องในปลาทับทิมเพื่อผลิตเป็นเปปโตน ทั้งนี้พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยโปรตีนในตัวอย่างของเชื้อ *B. subtilis* TISTR 008 อยู่ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยให้ระดับการย่อยสลายอยู่ที่ร้อยละ 67.58 และปริมาณโปรตีน 2.52 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำเปปโตนที่ได้ไปทำแห้ง จะได้ผลผลิตคิดเป็นร้อยละ 7.75 ของปริมาณเครื่องในที่ใช้เริ่มต้น ต่อมาเมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผลผลิตแห้งที่ได้นี้ พบว่ามีปริมาณโปรตีน (ในรูปของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด) ไขมัน เถ้า และปริมาณความชื้นคิดเป็นร้อยละ 84.69, 1.71, 3.66 และ 9.31 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเปปโตนที่ผลิตได้ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นครบทั้ง 18 ชนิด และสามารถนำไปใช้ทดแทนอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยทำการทดสอบเลี้ยงแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 พบว่าเปปโตนที่ผลิตได้จากเครื่องในปลาทับทิมให้ผลในการเจริญของเชื้อที่ดีกว่าเปปโตนทางการค้า

คำสำคัญ: เปปโตน บาซิลลัส โปรติเอส เศษเหลือปลา อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

Title PEPTONE PRODUCTION FROM FISH WASTE BY PROTEOLYTIC BACTERIA FOR USE AS MICROBIAL GROWTH MEDIA

Author Assistant Professor Paweena Noitup, Ph.D.

Assistant Professor Orn-in Prachaiyo, Ph.D.

ABSTRACT

250486

The objective of this research was to evaluate the most efficient proteolytic bacteria for protease production. *Bacillus cereus* TISTR 687 and *Bacillus subtilis* TISTR 008 were screened by determination the diameter of a clear zone on the selective medium (skim milk agar) surface. The largest clear zone was observed when *B. subtilis* TISTR 008 grew on skim milk agar at pH 7.5, 45°C. Subsequently, *B. subtilis* TISTR 008 was used for digestion of red tilapia viscera to used as peptone. The suitable conditions for the production of hydrolysis enzyme from *B. subtilis* TISTR 008 were at 45°C, initial pH 7.5 for 6 hours the degree of hydrolysis of 67.58 and the soluble protein content of the hydrolyzate was 2.52 mg/ml. After freeze drying, the final yield was 7.75%. The proximate composition analysis showed that the percentage of total nitrogen, lipid, ash and moisture content were 84.69, 1.71, 3.66 and 9.31, respectively. The obtained peptone compose of 18 essential amino acids and could be utilized as microbial growth media. The 3 types of bacteria (*Bacillus subtilis* TISTR 008, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* TISTR 118) were grown in the red tilapia peptone in comparison with the commercial peptone. The results indicated that the red tilapia peptone demonstrated better growth promotion than that of the commercial peptone.

Keywords: peptone, *Bacillus* sp., protease, fish waste, microbial growth media

บทสรุปผู้บริหาร

ชื่อโครงการ การผลิตเปปโตนจากเศษเหลือจากปลาโดยแบคทีเรียโปรติโอไลติก เพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

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

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ธันวาคม 2553 – 30 เมษายน 2555

ความเป็นมาของปัญหา

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

ดังนั้น เพื่อเป็นการลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม เพิ่มประโยชน์หรือเพิ่มมูลค่าเศษเหลือจากปลาน้ำจืด และลดการนำเข้าวัสดุอาหารเลี้ยงเชื้อจากต่างประเทศ จึงเป็นมูลเหตุใน

การศึกษาการผลิตเปปโตนจากเศษเหลือจากปลาโดยใช้แบคทีเรียโปรติโอไลติก โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียโปรติโอไลติก เพื่อเหนี่ยวนำให้เชื้อสร้างเอนไซม์โปรติเอสออกมาย่อยโปรตีนในสารตั้งต้น ทำการศึกษาทั้งสภาวะการผลิต การนำไปใช้ประโยชน์ และทดสอบประสิทธิภาพของผลผลิตที่ได้โดยเปรียบเทียบกับเปปโตนทางการค้า

วัตถุประสงค์

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

ผลการทดลอง

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

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

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

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

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

8. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี กายภาพ และจุลินทรีย์ของเปปโตนที่ผลิตได้จากเครื่องในปลาทับทิม

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

b. กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในเปปโตนที่ผลิตได้จากเครื่องในปลาทับทิม มีจำนวนของกรดอะมิโนครบทั้ง 18 ชนิดเหมือนกับเปปโตนทางการค้า แต่แตกต่างกันที่ปริมาณของกรดอะมิโนแต่ละชนิดเท่านั้น

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

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

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

ผลลัพธ์ของโครงการ

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

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

8. จัดแสดงนิทรรศการ "โปรตีนปลาไฮโดรไลเซท" ใน งานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 9 วันที่ 27 – 30 กรกฎาคม 2554 ณ คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.

9. นำเสนอในการประชุมวิชาการ ภาคบรรยาย:

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

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง "การผลิตเปปโตนจากเศษเหลือจากปลาโดยแบคทีเรียโปรติโอไลติกเพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์" ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2554 งานวิจัยประสบผลสำเร็จตามวัตถุประสงค์ได้ด้วยดี ทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบคุณ นางสาวอรพรรณ พยัฆกุล นิสิตปริญญาโท และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทดลองตลอดระยะเวลาที่ดำเนินการวิจัย

คณะผู้วิจัย

เมษายน 2555

สารบัญ

หน้า

บทนำ 1

ความเป็นมาของปัญหา 1

จุดมุ่งหมายของการศึกษา 3

ขอบเขตของงานวิจัย 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

ปลาทับทิม 5

คุณค่าทางโภชนาการของปลาทับทิม 5

แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุในการเน่าเสียของปลา 7

ลักษณะการเน่าเสียของปลา 8

การใช้ประโยชน์จากเศษเหลือจากปลา 8

การย่อยสลายโปรตีน 11

เอนไซม์โปรติโอไลติก 14

ประเภทของเอนไซม์โปรติโอไลติก 16

ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติโอไลติก 19

การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์โปรติโอไลติกในอุตสาหกรรม 20

การคัดเลือกแบคทีเรียโปรติโอไลติก 21

Bacillaceae 27

คุณสมบัติทั่วไปของ *Bacillus* sp 28

อนุกรมวิธานของเชื้อ *Bacillus* ที่ใช้ในงานวิจัย 28

เอนไซม์นิวทรัลโปรติเอส 29

เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส 30

เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่สร้างจากเชื้อจุลินทรีย์ 31

การใช้ประโยชน์จากโปรตีนไฮโดรไลเซทปลา 35

เปปโตน 36

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

มาตรฐานโปรติเอสเปปโตน..... 38
กรดอะมิโน..... 39

วิธีดำเนินการวิจัย..... 41
วัตถุดิบที่ใช้ในการวิจัย..... 41
การเตรียมตัวอย่างและการเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียโปรติโอไลติก..... 41
สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย..... 42
อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิจัย..... 42
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย..... 43
ขั้นตอนและวิธีการดำเนินการวิจัย..... 44

ผลการวิจัยและอภิปรายผล..... 51
การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเครื่องในปลา..... 51
การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรีย..... 52
การศึกษาระดับการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ของตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิม.. 55
การศึกษาสภาวะการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียต่อร้อยละของระดับการย่อยสลายของตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมเปรียบเทียบกับการย่อยสลายตัวเอง (autolysis)..... 55
การศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายเครื่องในปลาทับทิม..... 57
ระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายเครื่องในปลาทับทิม..... 59
การทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิม..... 62
การศึกษาการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่สภาวะการย่อยสลายของตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิม..... 64
การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี กายภาพ และจุลินทรีย์ของเปปโตนที่ผลิตจากเครื่องในปลาทับทิม..... 66

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

การทดสอบประสิทธิภาพของเปปโตนที่ผลิตได้ในการเป็นอาหารสำหรับจุลินทรีย์..... 73

บทสรุป..... 76

สรุปผลการวิจัย..... 76

ข้อเสนอแนะ..... 79

บรรณานุกรม..... 80

ภาคผนวก..... 95

ภาคผนวก ก วิธีวิเคราะห์..... 95

ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงเชื้อ..... 105

ภาคผนวก ค การเผยแพร่ผลงานวิชาการ..... 109

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเน่าเสียของปลา	8
2	ตัวอย่างเอนไซม์โปรติโอไลติกจากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ที่ใช้ในอาหาร	15
3	แหล่งของเอนไซม์โปรติโอไลติกที่ใช้มากในการผลิตระดับอุตสาหกรรม	24
4	เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ใช้ในการค้า	33
5	สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส	34
6	องค์ประกอบทางเคมีของเครื่องในปลาทับทิม	52
7	เส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของ *B. cereus* TISTR 687 และ *B. subtilis* TISTR 008 บนอาหาร skim milk agar ที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง	54
8	ระดับการย่อยสลายตัวเองของเครื่องในปลาทับทิม ที่อุณหภูมิ 31, 37, 45 และ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง	56
9	ระดับการย่อยสลายเครื่องในปลาทับทิมที่เติม *B. subtilis* TISTR 008 ที่อุณหภูมิ 31, 37, 45 และ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง	56
10	ผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างต่อปริมาณโปรตีนในสารละลายที่ได้จากการย่อยสลายตัวเองของตัวอย่าง (autolysis) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง	58
11	ผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างต่อปริมาณโปรตีนในสารละลายที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* TISTR 008 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง	58
12	ระยะเวลาในการย่อยตัวอย่างควบคุมที่มีผลต่อระดับการย่อยสลายและปริมาณโปรตีน ที่ค่าความเป็นกรด - ด่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	60
13	ระยะเวลาในการย่อยตัวอย่างที่เพาะ *B. subtilis* TISTR 008 ที่มีผลต่อระดับการย่อยสลายและปริมาณโปรตีน ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	60
14	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมที่ทำการเพาะ *B. subtilis* TISTR 008 ลงไปที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	63

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง หน้า

15 การเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของเปปโตนทางการค้า (bacto-peptone ของบริษัท Difco) เปปโตนจากเครื่องในปลาทูน่า โปรตีนไฮโดรไลเซทผงแห้งจากเศษเหลือจากโรงงานซูริมิ และเปปโตนที่ผลิตจากเครื่องในปลาทับทิม..... 67

16 ปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในเปปโตนทางการค้า และเปปโตนที่ผลิตจากเครื่องในปลาทับทิม..... 69

17 การเปรียบเทียบค่าสีของเปปโตนทางการค้า และเปปโตนที่ผลิตได้จากเครื่องในปลาทับทิมในรูปของผงแห้ง..... 71

18 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ของเปปโตนที่ผลิตได้จากเครื่องในปลาทับทิมตามมาตรฐานโปรติเอสเปปโตน..... 73

19 น้ำหนักแห้งเฉลี่ย (กรัม / 100 มิลลิลิตร) ของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดที่เจริญอยู่ในสารละลายเปปโตน..... 74

20 จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง..... 75

สารบัญภาพ

ภาพ หน้า

1 การสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติโอไลติก..... 14

2 เครื่องในปลาทับทิมสำหรับการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท (เปปโตน)..... 51

3 การสร้างวงใสจากการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *B. cereus* TISTR 687 และ *B. subtilis* TISTR 008 ที่สภาวะการเพาะเลี้ยง..... 54

4 ระดับการย่อยสลาย (ร้อยละ) ที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยเครื่องในปลาทับทิมของตัวอย่างที่มีการเติม *B. subtilis* TISTR 008 ลงไป และตัวอย่างควบคุม..... 61

5 ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยเครื่องในปลาทับทิมของตัวอย่างที่มีการเติม *B. subtilis* TISTR 008 และตัวอย่างควบคุม..... 61

6 การเจริญของแบคทีเรียในตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมที่เพาะ *B. subtilis* TISTR 008 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส..... 65

7 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส และการเจริญของแบคทีเรียที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส.. 66

8 การเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเปปโตนทางการค้าและเปปโตนที่ผลิตจากเครื่องในปลาทับทิมที่ *B. subtilis*, *E. coli* และ *S. aureus* ใช้ในการเจริญ..... 70

9 สีของเปปโตนทางการค้า และเปปโตนที่ผลิตได้จากตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมในรูปของผงแห้ง..... 71

10 สีของสารละลายเปปโตนที่เตรียมได้จากเปปโตนทางการค้า และเปปโตนที่ผลิตได้จากตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิม..... 72

11 สีของอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar ที่เตรียมได้จากเปปโตนทางการค้าและเปปโตนที่ผลิตได้จากตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิม..... 72