วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องในปลา

ใช้เศษเหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปปลา (เครื่องในปลาทับทิม *Oreochromis niloticus* และ เครื่องในปลาช่อน *Channa striata*) จากร้านปลาสองแคว จังหวัดพิษณุโลก ขนส่งโดยแช่มาในลังน้ำแข็ง โดยมีระยะเวลาตั้งแต่ปลาตายจนถึงการเตรียมวัตถุดิบไม่เกิน 3 ชั่วโมง นำเครื่องในปลาทับทิมมาล้างทำความสะอาด ล้างไขมันบางส่วนออกด้วยเอทานอล (ethanol) ร้อยละ 95 (อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ของเครื่องในปลาทับทิมต่อปริมาณเอทานอล) หลังจากนั้นทำการล้างเอทานอลออกด้วยน้ำสะอาด 4 ถึง 5 ครั้ง นำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น (blender) คลุกเคล้าให้ผสมกันดี บรรจุใส่แก้วพลาสติกชนิดมีฝาปิดแก้วละ 90 กรัม แช่แข็งที่อุณหภูมิ –18 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บรักษาไว้จนกว่าจะนำมาทดลอง

2. กล้าเชื้อจุลินทรีย์

2.1 เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 008 และ *Bacillus cereus* TISTR 687 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เตรียมกล้าเชื้อโดยเพาะเชื้อลงอาหาร nutrient broth (NB) บ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหาร nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อการเก็บรักษาไว้จนกว่าจะนำมาทำการทดลอง (ถ่ายเชื้อทุก 48 ชั่วโมง)

2.2 เชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 จากภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เตรียมกล้าเชื้อโดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหาร nutrient agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อการเก็บรักษาไว้จนกว่าจะนำมาทำการทดลอง (ถ่ายเชื้อทุก 48 ชั่วโมง)

การเตรียมตัวอย่างและการเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียโปรติโอไลติก

การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเครื่องในปลาทำได้โดยนำตัวอย่างวัตถุดิบที่บดละเอียด ผสมน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (เครื่องในปลาบดละเอียด 25 กรัม ต่อ น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 25 มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปทำการทดลองตามสภาวะต่างๆ และหยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ

4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จะได้โปรตีนไฮโดรไลเซท สำหรับนำไปผลิตเป็นเปปโตนในขั้นต่อไป

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid, Univar, New Zealand)
2. กรดซัลฟูริก (sulfuric acid, LAB-SCAN, Thailand)
3. กรดบอริก (boric acid, RFCL Limited, India)
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, RCI Labscan, Thailand)
5. ไดเบสิก โซเดียมฟอสเฟต (dibasic sodium phosphate, Panreac, E.U)
6. กรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid, MERCK, Germany)
7. เอทานอล (ethanol 95%, MCC chemical, Thailand)
8. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride, MERCK, Germany)
9. ไดโซเดียมคาร์บอเนต (disodium carbonate, Panreac, E.U.)
10. ปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether, RCI Labscan, Thailand)
11. เคซีน (casein, Fluka, Swizerland)
12. ฟอสเฟต (phosphate, Fluka, Swizerland)
13. ฟอลิน ซิโอแคลตูรีเอเจนต์ (folin-ciocalteu reagent, MERCK, Germany)
14. ไทโรซีน (tyrosine, S.M. chemical supplies, Thailand)
15. เมทิลเรด (methy red, Fluka, Swizerland)
16. ซิลิเนียม (selenium, MERCK, Germany)

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

1. Bacto peptone (Difco, U.S.A)
2. 1% peptone water (HiMedia Laboratories, India)
3. Plate count agar : PCA (HiMedia Laboratories, India)
4. Nutrient broth : NB (HiMedia Laboratories, India)
5. Nutrient agar : NA (Difco, U.S.A)
6. Skim milk agar (Difco, U.S.A)

7. Salmonella Shigella agar : SS agar (MERCK, Germany)
8. Lactose broth (MERCK, Germany)
9. Eosin methylene blue agar : EMB agar (MERCK, Germany)
10. Patato dextrose agar (ภาคผนวก ข)
11. EC broth (ภาคผนวก ข)
12. LST broth (ภาคผนวก ข)
13. Standard plate count (ภาคผนวก ข)

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (B-810, Buchi, Switzerland)
2. ชุดเครื่องมือวิเคราะห์โปรตีน (B-323, Buchi, Switzerland)
3. เครื่องย่อยโปรตีน (B-435, Buchi, Switzerland)
4. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Cyber Scan, Eutech instruments, Charan Associates, Thailand)
5. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Shel lab 2020, Shaldon Manufacturing Inc., U.S.A)
6. ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ –18 องศาเซลเซียส (SCM-320SBD, Sanden Intercool, Thailand)
7. ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส (nice SJ-J17A, Sharp, Thailand)
8. เครื่องบดอาหาร (MX-795 N, National, Thailand)
9. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (WB-710M, Optima, Thailand)
10. ตู้อบลมร้อนควบคุมอุณหภูมิได้ (UM-oven 120L, UMAC, Thailand)
11. ตู้อบลมร้อนแบบถาด (tray dryer) (1375 FX, SHEL LAB, Thailand)
12. ตู้ปลอดเชื้อ (Clean Air Techniek, Thailand)
13. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแบบควบคุมอุณหภูมิ (K240 R, Centurion, Thailand)
14. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Genesys 20, Themno, Thailand)
15. เครื่องวัดสี (DP 9000, Hunter Lab, U.S.A.)
16. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (ALP, KT 30L, Japan)
17. ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (N-Biotek, 205Q, Thailand)

18. เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (B-409, Buchi, Switzerland)
19. เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (MAXI dry lyo, Heto, UK.)
20. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 3 ตำแหน่ง (PE 503-S, Mettler Toledo, Thailand)
21. เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง (AC 2105, Mettler Toledo, Thailand)

ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเครื่องในปลา

ผสมเครื่องในปลาทับทิมหรือปลาช่อนที่บดละเอียดกับน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (เครื่องในปลาบด 25 กรัม ต่อ น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร) นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น โปรตีน เถ้า และไขมัน ตามวิธีของ AOAC (2000) (ภาคผนวก ก) และค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ pH meter (ภาคผนวก ก) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตอนที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรีย

เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียโปรติโอไลติกทั้ง 2 ชนิด โดยเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 008 และ *Bacillus cereus* TISTR 687 บนอาหารจำเพาะสูตร skim milk agar โดยวิธี agar diffusion ที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง 6.5, 7.5, 8.5, 9.5 และ 10.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ (clear zone diameter, CZ) ตรวจสอบส่วนที่ให้ค่าสูงสุดจากการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

ตอนที่ 3 การศึกษาระดับการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ของตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิม

ผสมเครื่องในปลาทับทิม (ที่นำออกจากตัวปลาทันทีหลังจากที่ปลาตาย) ที่บดละเอียดกับน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นนำไปทดสอบหาร้อยละของระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis : %DH) ในรูปของกรดอะมิโนอิสระที่เกิดขึ้น ณ เวลา 0 ชั่วโมง โดยวิธีของ Hoyle and Merritt (1994) (ภาคผนวก ก) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตอนที่ 4 การศึกษาสภาวะการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียต่อร้อยละของระดับการย่อยสลายของตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมเปรียบเทียบกับการย่อยสลายตัวเอง (autolysis)

นำแบคทีเรียโปรติโอไลติกที่คัดเลือกได้จากตอนที่ 2 มาใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยนำไปทดสอบหาร้อยละของระดับการย่อยสลาย ในรูปของกรดอะมิโนอิสระที่เกิดขึ้น โดยวิธีของ Hoyle and Merritt (1994) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

1. **ศึกษาร้อยละของระดับการย่อยสลายตัวเองของเครื่องในปลาทับทิมที่สภาวะต่างๆ**

ผสมเครื่องในปลาทับทิมที่บดละเอียดกับน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปรับสภาวะของค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 N ให้อยู่ที่ 6.5, 7.5, 8.5, 9.5 และ 10.5 ปล่อยให้เกิดย่อยสลายที่อุณหภูมิ 31, 37, 45 และ 53 องศาเซลเซียส เขย่าโดยใช้ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ ด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นำส่วนใสที่ได้ไปทดสอบหาร้อยละของระดับการย่อยสลายในรูปของกรดอะมิโนอิสระที่เกิดขึ้น โดยวิธีของ Hoyle and Merritt (1994) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2. **ศึกษาร้อยละของระดับการย่อยสลายตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมที่เติม *B. subtilis* TISTR 008 ที่สภาวะต่างๆ**

ทำการปรับความเข้มข้นของเชื้อ *B. subtilis* TISTR 008 ที่เตรียมได้จากข้อ 2 ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้มีค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (A600) เท่ากับ 0.3 (ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^8 cfu/ml) ดูดสารละลายของกล้าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิม (substrate) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (เครื่องในปลาทับทิมบด 25 กรัม ต่อ น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร) ปรับสภาวะของค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 N ให้อยู่ที่ 6.5, 7.5, 8.5, 9.5 และ 10.5 ปล่อยให้เกิดย่อยสลายที่อุณหภูมิ 31, 37, 45 และ 53 องศาเซลเซียส เขย่าโดยใช้ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ ด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นำส่วนใสที่ได้ไปทดสอบหาร้อยละของระดับการย่อยสลายในรูปของกรดอะมิโนอิสระที่เกิดขึ้น โดยวิธีของ Hoyle and

Merritt (1994) เปรียบเทียบร้อยละของระดับการย่อยสลายกับตัวอย่างควบคุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตอนที่ 5 การศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายเครื่องในปลาทับทิม

1. ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างของการย่อยสลายตัวเองของเครื่องในปลาทับทิมต่อปริมาณโปรตีนที่ละลายได้

ผสมเครื่องในปลาทับทิมที่บดละเอียดกับน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปรับสภาวะของค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 N ให้อยู่ที่ 6.5, 7.5, 8.5, 9.5 และ 10.5 ปล่อยให้เกิดการย่อยสลายที่อุณหภูมิ 31, 37, 45 และ 53 องศาเซลเซียส เขย่าโดยใช้ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ ด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl method (AOAC, 2000) (ภาคผนวก ก) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2. ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างของการย่อยสลายตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมที่เติม *B. subtilis* TISTR 008 ต่อปริมาณโปรตีนที่ละลายได้

ทำการปรับความเข้มข้นของเชื้อ *B. subtilis* TISTR 008 ที่เตรียมได้จากข้อ 2 ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้มีค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (A600) เท่ากับ 0.3 (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8 cfu/ml) ดูดสารละลายของกล้าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิม ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับสภาวะของค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 N ให้อยู่ที่ 6.5, 7.5, 8.5, 9.5 และ 10.5 ปล่อยให้เกิดย่อยสลายที่อุณหภูมิ 31, 37, 45 และ 53 องศาเซลเซียส เขย่าโดยใช้ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ ด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl Method (AOAC, 2000) (ภาคผนวก ก) เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ละลายได้กับตัวอย่างควบคุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3. ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายเครื่องในปลาทับทิม

เลือกสภาวะที่ดีที่สุด (อุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่าง) จากตอนที่ 5.1 และ 5.2 นำมาใช้เป็นสภาวะในการย่อยสลายที่ระยะเวลาต่างๆ โดยทำการเก็บตัวอย่างตามช่วงเวลา ทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

3.1 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายตัวเองของเครื่องในปลาทับทิมต่อร้อยละของระดับการย่อยสลาย

ผสมเครื่องในปลาทับทิมที่บดละเอียดกับน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปรับสภาวะของค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 N ให้อยู่ที่ 7.5 ปล่อยให้เกิดการย่อยสลายที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่าโดยใช้ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ ด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่เวลา 6, 12, 18, 24, 30 และ 36 ชั่วโมง นำไปทดสอบหาร้อยละของระดับการย่อยสลายในรูปของกรดอะมิโนอิสระที่เกิดขึ้น โดยวิธีของ Hoyle and Merritt (1994) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2 ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายเครื่องในปลาทับทิมที่มีการเติม *B. subtilis* TISTR 008 ต่อร้อยละของระดับการย่อยสลาย

ทำการปรับความเข้มข้นของเชื้อ *B. subtilis* TISTR 008 ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้มีค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (A600) เท่ากับ 0.3 (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8 cfu/ml) ดูดสารละลายของกล้าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับสภาวะของค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 N ให้อยู่ที่ 7.5 ปล่อยให้เกิดย่อยสลายที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่าโดยใช้ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ ด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่เวลา 6, 12, 18, 24, 30 และ 36 ชั่วโมง นำไปทดสอบหาร้อยละของระดับการย่อยสลายในรูปของกรดอะมิโนอิสระที่เกิดขึ้น โดยวิธีของ Hoyle and Merritt (1994) เปรียบเทียบร้อยละของระดับการย่อยสลายกับตัวอย่างที่ไม่มีการเติมโปรติโอไลติกแบคทีเรียลงไปที่สภาวะเดียวกันทั้งหมด คัดเลือกเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลาย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตอนที่ 6 การทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิม (ดัดแปลงจาก Ferrero et al., 1996)

นำตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมที่ใช้เป็นสับเสรตทในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโปรติโอไลติกในสภาวะที่ได้จากการคัดเลือกจากตอนที่ 5 มาทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์

โปรติเอส โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 N ให้เท่ากับ 7.5 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกนำมาทำ viable plate count (ตอนที่ 7) และส่วนที่ 2 นำมาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยวัดปริมาณไทโรซีน (tyrosin) ที่เกิดภายหลังจากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ (ดัดแปลงวิธีจากวิธีของ Anson, 1983) นำสารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร (ตอนที่ 6) ใส่ในหลอดทดสอบ เติมสารละลายเคซีนเข้มข้นร้อยละ 2 จำนวน 1 มิลลิลิตร บ่มให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย trichloroacetic acid (TCA) เข้มข้นร้อยละ 10 จำนวน 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำสารละลายที่กรองได้ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.4 N NaOH) ลงไป 5 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำหลอดทดลองไปแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติม folin-cieacalteau reagent ที่เจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วน 1:2 (w/v) ลงไป 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดสีที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทโรซีน (standard tyrosin curve)

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ เท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์โปรติเอสที่สามารถย่อยเคซีนแล้วเกิดไทโรซีน 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ใช้ในการทดลอง

ตอนที่ 7 การศึกษาการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่สภาวะการย่อยสลายของตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิม

นำตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมที่เตรียมได้จากตอนที่ 6 แยกมาทำการศึกษาการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีอยู่ในตัวอย่าง โดยนำมาทำ viable plate count ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar (ภาคผนวก ข) ทำการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง บันทึกผล

ตอนที่ 8 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี กายภาพ และจุลินทรีย์ของเปปโตนที่ผลิตจากเครื่องในปลาทับทิม

ผลิตเปปโตนผงแห้งจากตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมจากสภาวะที่คัดเลือกได้จากตอนที่ 7 นำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) จากนั้นนำเปปโตนผงแห้งที่ผลิตได้ไปวิเคราะห์สารประกอบที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายเปรียบเทียบกับเปปโตนทางการค้า โดยองค์ประกอบที่ทำการทดสอบ ได้แก่

1. การวิเคราะห์ทางเคมี

1.1 องค์ประกอบทางเคมีของเปปโตนที่ผลิตได้ ได้แก่ ปริมาณความชื้น เถ้า โปรตีน และไขมัน ตามวิธี AOAC (2000)

1.2 กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในเปปโตนที่ผลิตได้ โดยทำการส่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์กับบริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด จังหวัดเชียงใหม่ ตามวิธี AOAC (2000)

2. การวิเคราะห์ทางกายภาพ

วัดค่าสีของเปปโตนที่ผลิตได้ โดย Hunter lab (L*, a*, b*) เปรียบเทียบคุณภาพสีของเปปโตนที่ผลิตได้จากเศษเหลือจากปลาทับทิมกับเปปโตนทางการค้า

3. การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

วิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในตัวอย่างเปปโตนที่ผลิตได้จากเครื่องในปลาทับทิมตามมาตรฐานโปรติเอสเปปโตน Agar peptone and other (1960)

ตอนที่ 9 การทดสอบประสิทธิภาพของเปปโตนที่ผลิตได้ในการเป็นอาหารสำหรับจุลินทรีย์

ผลิตเปปโตนผงแห้งจากตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิมจากสภาวะที่คัดเลือกได้จากตอนที่ 7 นำไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) จากนั้นนำเปปโตนผงแห้งที่ผลิตได้มาทดสอบความสามารถในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เปรียบเทียบกับเปปโตนที่จำหน่ายในทางการค้า โดยทำการทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus subtilis* TISTR 008, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวและอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง

1. ทดสอบในอาหารเหลว

ใช้เปปโตนที่ผลิตได้จากเครื่องในปลาทับทิมมาทดแทนสารละลายเปปโตน (peptone water) โดยผสมเปปโตน 1 กรัม ต่อ น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำไปผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

ทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นที่ 10^8 cfu/ml ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาตกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลางด้วยความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งแล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ประมาณ 20 นาที นำมาชั่งหาน้ำหนักแห้ง (dry weight) จากนั้นนำไปอบอีกจนได้น้ำหนักแห้งคงที่ ทำการเปรียบเทียบปริมาณมวลชีวภาพของจุลินทรีย์แต่ละชนิด โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งที่ได้จากเปปโตนที่ผลิตได้กับเปปโตนทางการค้าโดยวิธี T-test วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมประมวลผลทางสถิติ

2. **ทดสอบในอาหารแข็ง**

ใช้เปปโตนที่ผลิตได้จากเครื่องในปลาทับทิมมาทดแทนเปปโตนที่ใช้ทางการค้าในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (plate count agar) ทำการเจือจางเชื้อที่ใช้ทดสอบในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0.85 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ให้ได้ความเจือจางที่เหมาะสม จากนั้นปิเปตสารละลายเชื้อที่ระดับความเจือจางที่เตรียมไว้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อหาปริมาณจุลินทรีย์ทดสอบด้วยวิธีสเปรดเพลท จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อบนอาหารที่มีเปปโตนที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับเปปโตนทางการค้าโดยวิธี T-test วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมประมวลผลทางสถิติ