



Proceeding



การประชุมวิชาการ “วิทยาศาสตร์วิจัย” ครั้งที่ 3
The 3rd Science Research Conference

วันที่ 14-15 มีนาคม 2554 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

Oral Presentation

กลุ่มที่ 1 สาขาฟิสิกส์ ฟิสิกส์ประยุกต์ ฟิสิกส์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และพลังงาน วัสดุศาสตร์ และวิทยาศาสตร์ศึกษา

◎ ประสิทธิภาพของระบบผลิตไฟฟ้าแบบผสมระหว่างกังหันลมความเร็วต่ำ และเซลล์แสงอาทิตย์ บริเวณทุ่งทะเลแก้ว จังหวัดพิษณุโลก_____	1
◎ เครื่องกำเนิดไฟฟ้าแรงดันสูงแบบพัลส์ต้นทุนต่ำสำหรับการประยุกต์ใช้ในงานทางไฟฟ้าสถิต_____	6
◎ การศึกษาและพัฒนาเตาเกลือสำหรับการให้ความร้อนในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล_____	11
◎ การผลิตจนวนความร้อนจากเส้นใยไบโอสกับน้ำยางธรรมชาติ_____	16
◎ การใช้ตะกอนดินจากกระบวนการผลิตน้ำเพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม_____	22
◎ การออกแบบวงจรหน่วยควบคุมอิเล็กทรอนิกส์ชนิดแอนะล็อกสำหรับเครื่องยนต์แก๊สโซลีน_____	28
◎ การศึกษา Dicrotic Notch และรูปคลื่นพัลส์แรงดันเลือด ด้วยหลักการสัญญาณและระบบ_____	34
◎ การพัฒนาชุดการทดลองการหักเหของแสง เรื่อง ลึกลับจริงลึกลับปรากฏ เพื่อพัฒนาทักษะ_____	41
◎ การพัฒนาเครื่องกรองน้ำและทักษะการสร้างเครื่องกรองน้ำเพื่อการใช้อุปโภคของชุมชน ในเขตเทศบาลบึงสามพัน จังหวัดเพชรบูรณ์_____	46
◎ ผลของสนามโน้มถ่วงต่อการไหลของกระแสในมหาสมุทร_____	53
◎ สมบัติทางไฟฟ้าและแสงของฟิล์มบางเงินที่เตรียมบนแผ่นกระจกกรองรังด้วย เทคนิค ดีซี แมกนีตรอน สปีดเตอริง_____	57
◎ ผลของนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ต่อสมบัติของสีทอง_____	63

กลุ่มที่ 2 สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ เทคโนโลยีชีวภาพ และวิทยาศาสตร์ศึกษา

◎ ผลของการอบแห้งต่อการรอดชีวิตของ <i>Bacillus</i> spp. _____	69
◎ การคัดกรองเห็ดราที่ผลิตลิแกินโนไลติกเอนไซม์จากแหล่งธรรมชาติ _____	74
◎ สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>Acetobacter aceti</i> TISTR102 ในน้ำตาลโตน _____	80
◎ ประสิทธิภาพในการย่อยเครื่องในปลาทับทิม (<i>Oreochromis niloticus</i>) ด้วยเอนไซม์โปรติเอสจาก <i>Bacillus subtilis</i> TISTR 008 ที่สภาวะต่างๆ_____	85
◎ อิทธิพลของปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อการออกอาหารและแหล่งละอองเรณูของชันโรง <i>Trigona laeviceps</i> และผึ้งมิม <i>Apis florea</i> ในพื้นที่มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก_____	90
◎ ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของกล้วยไม้ดินบานดึก _____	95
◎ สันฐานวิทยาของกล้วยไม้นางกราย (<i>Habenaria lindleyana</i> Steud.) บริเวณสวนรุกขชาติ 100 ปี กรมป่าไม้ (ชัยสมบุญ) จังหวัดนครสวรรค์_____	100
◎ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อว่านสี่ทิศในสภาพปลอดเชื้อ_____	104

ประสิทธิภาพในการย่อยเครื่องในปลาทับทิม (*Oreochromis niloticus*) ด้วยเอนไซม์โปรติเอสจาก

Bacillus subtilis TISTR 008 ที่สภาวะต่างๆ

อรพรรณ พัยมงคล¹ ปวีณา น้อยทัพ^{2*} วรสิทธิ์ โทจำปา² และ อรอินท์ ประไชโย²

The digestion efficacy of red tilapia (*Oreochromis niloticus*) viscera using protease from *Bacillus subtilis*

TISTR 008 at various conditions

Orphan Payakkul¹ Paweena Noitup^{2*} Worarit Tochampa² and Orn-in Prachaiyo²

^{1,2} คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

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

บทคัดย่อ

ประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* ที่สภาวะต่างๆ ถูกคัดเลือกบนอาหารจำเพาะ (Skim milk agar) ที่ระดับ pH 6.5 7.5 8.5 9.5 และ 10.5 อุณหภูมิ 37°C และ 45°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ประเมินกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสที่ปรากฏ พบว่าที่อุณหภูมิ 37°C *B.subtilis* TISTR 008 สร้างวงใสที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 10.0-11.3 มิลลิเมตร ส่วนที่อุณหภูมิ 45°C เส้นผ่านศูนย์กลางที่ได้มีขนาด 10.5-14.0 มิลลิเมตร โดย *B.subtilis* TISTR 008 สร้างวงใสที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางกว้างที่สุด ที่ pH 7.5 อุณหภูมิ จากนั้นทำการเพาะเชื้อเริ่มต้น 10⁸ CFU ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างวัตถุดิบที่ได้จากการผสมเครื่องในปลาทับทิมปริมาณ 25 กรัมและน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่ปรับระดับ pH เป็น 6.5 7.5 8.5 9.5 และ 10.5 บ่มที่อุณหภูมิ 31 37 45 และ 53°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และวัดระดับการย่อยสลาย (%DH) ในรูปของกรดอะมิโนอิสระ (α -amino acid) พบว่า *B.subtilis* TISTR 008 มีระดับการย่อยสลายสูงสุดเท่ากับ 68.25 ที่ระดับ pH 7.5 อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

คำสำคัญ : บาซิลลัส, โปรติเอส, ระดับการย่อยสลาย

Abstract

The protease production efficacy of *Bacillus subtilis* TISTR 008 was screened using the selective medium (Skim milk agar) at various pH (6.5 7.5 8.5 9.5 and 10.5) and temperature (37°C and 45°C) for 12 hrs. The protease activity was determined by measuring the diameter of a clear zone on the agar surface. The results revealed that *B.subtilis* TISTR 008 were grown on skim milk agar medium and produced the clear zone with the diameters of 10.0-11.3 mm at 37°C and 10.5-14.0 mm at 45°C. The biggest clear zone was observed on skim milk agar with pH 7.5, 45°C. Subsequently, *B.subtilis* TISTR 008 was tested for the digestion of the red tilapia viscera. The red tilapia viscera mixture was prepared by mixing 25 g of viscera with 25 ml distilled water. The mixture was then adjusted to various pH (6.5 7.5 8.5 9.5 and 10.5) and inoculated with 1 ml of 10⁸ CFU inoculums. The inoculums were incubated at 31 37 45 and 53°C for 12 hrs. The degree of hydrolysis was measured as α -amino acid. The results indicated that *B.subtilis* TISTR 008 exhibited the maximum degree of hydrolysis (68.25) at pH 7.5, 45°C for 12 hrs.

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

1. บทนำ

โปรติเอส (protease) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีน ที่ถูกนำมาผลิตในเชิงการค้าจำนวนมากส่วนใหญ่ผลิตจากแบคทีเรียสกุลบาซิลลัส (*Bacillus*) โดยโปรติเอสจากแบคทีเรียนี้มีปริมาณการใช้สูงกว่าโปรติเอสจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ พบว่ามีการนำเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. มาใช้อย่างแพร่หลายทั้งในทางอุตสาหกรรม เกษตรกรรม เภสัชกรรมและทางการแพทย์ นอกจากนี้จะมีการนำเอนไซม์โปรติเอสมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ แล้ว ยังพบว่าโปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีส่วนแบ่งทางการตลาดสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่น (ยูวพิน คำานคูตีตาพันธ์, 2546) เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติค่อนข้างหลากหลาย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* โดยผู้วิจัยหวังว่าจะสามารถนำสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวไปใช้เป็นพื้นฐานในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 สายพันธุ์แบคทีเรีย

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

2.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

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

2.3 การเตรียมวัตถุดิบ

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

2.4 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

ผสมเครื่องในปลาหีบหิมที่บดละเอียดกับน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน และไขมัน ตามวิธีของ AOAC (2000) และค่าความเป็นกรดต่าง โดยใช้ pH meter

2.5 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรีย

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

2.6 ศึกษาสภาวะการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ของวัตถุดิบ

เลือกสภาวะจากขั้นที่ 2.5 มาใช้เป็นแนวทางในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้เครื่องในปลาหีบหิมเป็นสับสเตรทในการเลี้ยงเชื้อ (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10⁸ CFU/ml) ที่ระดับ pH 6.5 7.5 8.5 9.5 และ 10.5 บ่มที่อุณหภูมิ 31 37 45 และ 53°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาวัดระดับการย่อยสลาย (%DH) ในรูปของกรดอะมิโนอิสระ (α -amino acid) โดยวิธีของ Hoyle and Merritt (1994) เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ย่อยสลายด้วยตัวเอง

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเครื่องในปลาทับทิม

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

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างวัตถุดิบ (เครื่องในปลาทับทิม)

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

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรีย

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

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

Temp.	pH	ความยาว Ø วงใส (มม.) ของ <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

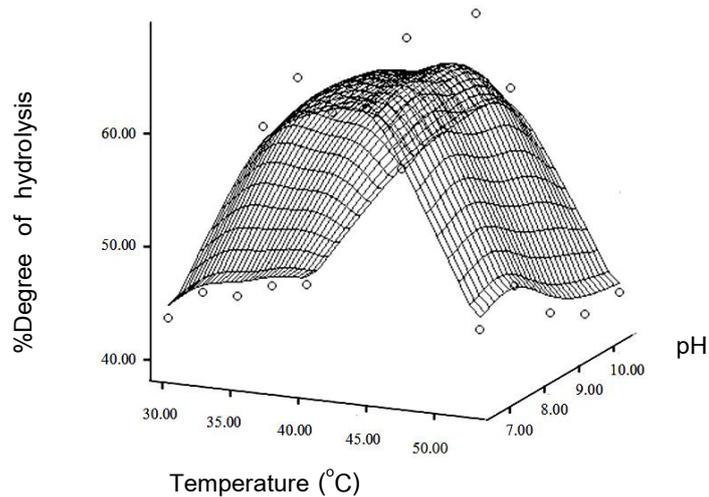
* ค่าเฉลี่ยความยาว Ø วงใส 3 ซ้ำ

3.4 การศึกษาระดับการย่อยสลายโปรตีนโดยการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียในตัวอย่างเครื่องในปลาหับทิม

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

ตารางที่ 4 ระดับการย่อยสลาย (% DH) ของการย่อยตัวเอง และระดับการย่อยสลายหลังการเพาะเชื้อ *B.subtilis* TISTR 008 ในตัวอย่างเครื่องในปลาหับทิม 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 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างต่อร้อยละของระดับการย่อยสลายของ *B. subtilis* TISTR 008 ที่เวลา 12 ชั่วโมง

4. สรุปผลการวิจัย

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

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร ปี 2554 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

6. เอกสารอ้างอิง

- จักรพันธ์ สุวรรณพิมพ์ และสุพรรณิ แก่นสาร อะ โอ. (2552). การคัดเลือก *Bacillus* sp. ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และไลเปสจากดิน. *วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*, 40(1), 389-392.
- ยุวพิน ค่านคูสีตาพันธ์ และทวีรัตน์ วิจิตรสุนทรกุล. (2546). การเพิ่มผลผลิตในกระบวนการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสของ *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.