

เอกสารประกอบการประชุมวิชาการ

นเรศวรวิจัย 7

Proceedings of the 7th Naresuan Research Conference Volume 1



Naresuan Research Conference

กองบริหารการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000
โทรศัพท์ +66 55 968 614, +66 55 968 641
โทรสาร +66 55 968 604
Dra@nu.ac.th
www.research.nu.ac.th



Proceedings
of the 7th
Naresuan
Research
Conference

7

1
Vol.



ก้าวสู่ทศวรรษที่ 3
มุ่งมั่นงานวิจัยพัฒนาชาติไทยให้ยั่งยืน
29-30 กรกฎาคม 2554
มหาวิทยาลัยนเรศวร



PRO-PRINT

SIEMENS

ISBN 978-616-7322-41-4

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

- การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี การย่อยได้ของโภชนะ และพลังงานที่ใช้ประโยชน์ได้ ของเม็ดลำไยและเนื้อในเมล็ดลำไยในไก่พื้นเมือง	
โดย บัวเรียม มณีวรรณ และคณะ.....	343
- การอนุรักษ์พลังงานของเครื่องสูบน้ำโดยการเติมสารละลายพอลิเมอร์	
โดย สัตยา ยัมประเสริฐ และคณะ.....	349
- การออกแบบการจัดเรียงเครื่องจักรที่สามารถหมุนได้แบบหลายแถวด้วยวิธีเจเนติกอัลกอริทึม	
โดย ศรีสัจจา วิทยศักดิ์ และ ภูพงษ์ พงษ์เจริญ.....	356
- การออกแบบและการสร้างห้องอบแห้งสำหรับอัฐิสามัญ	
โดย สรวิศ มูลอินตะ และ ศักดิพล เทียนเสมอ.....	367
- การออกแบบและทดสอบแผงรับแสงอาทิตย์แบบพาราโบลาสำหรับตู้อบแห้งพริก	
โดย วีระยุทธ หล้าอมรชัยกุล.....	377
- ความหลากหลายของชนิดพันธุ์พืชสกุลบิโกเนีย ในภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย	
โดย กฤษณธร ศรีภูเวียง และคณะ.....	387
- คุณลักษณะทางความดันต่อการเคลื่อนที่ของสารทำงานภายในท่อความร้อนแบบสั่นวงรอบ	
โดย พงษ์ศักดิ์ เกียรติเจริญศิริ และ ปิยะนันท์ เจริญสุวรรณค์.....	396
- การประยุกต์ใช้คุณลักษณะเด่นสำหรับการตรวจหาการกักตัวของโพลีทิฟ	
โดย สมเจตน์ บุญขึ้น และคณะ.....	406
- ตัวเก็บรังสีอาทิตย์ที่มีความเหมาะสม สำหรับการผลิตน้ำร้อนอุณหภูมิสูง โดยใช้ป้อนความร้อนเสริมพลังงานแสงอาทิตย์	
โดย สรวิศ สอนสารี และคณะ.....	417
- ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดไขมันจากสาหร่ายน้ำเค็ม <i>Chlorella</i> sp., <i>Spirulina</i> sp. และ <i>Chaetoceros</i> sp.	
โดย ภควรรณ เศรษฐมงคล และคณะ.....	426
- ทิศนะสถาปัตยกรรมยั่งยืนกับระบบผลิตน้ำร้อนพลังงานแสงอาทิตย์และเครื่องทำน้ำอุ่นแบบติดตั้ง	
โดย สิริมาส เฮงรัมย์ และ สันต์ จันทร์สมศักดิ์.....	433
- แนวทางใหม่ สำหรับการพัฒนาซอฟต์แวร์ประยุกต์บนเว็บไซต์บนพื้นฐานสถาปัตยกรรมที่ผลักดันโดยแบบซอฟต์แวร์	
โดย ภากร กัทชลี.....	443
- ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ <i>Bacillus cereus</i> TISTR 687 ในการย่อยเครื่องในปลาตะเพียน	
โดย อรพรรณ พยัมกุล และคณะ.....	449
- ประสิทธิภาพของสารละลายเกลืออินทรีย์และสารละลายเกลืออินทรีย์ผสม ในการลดปริมาณและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในกะหล่ำปลีหั่นฝอย	
โดย กานต์ แยมพงษ์ และคณะ.....	457
- ประสิทธิภาพของอนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ในการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวของหัวหอม	
โดย ชลดา อธิการุณวงศ์ และ วราภรณ์ ฉุยฉาย.....	467
- ปรากฏการณ์สูตรเสาเข็มตอกในพื้นที่มหาวิทยาลัยนเรศวร สนทนความยอมรับได้โดยโปรแกรม	
โดย อุดมฤกษ์ ปานพลอย.....	476

ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *Bacillus cereus* TISTR 687 ในการย่อยเครื่องในปลาทับทิม
อรพรรณ พัยกุล¹ วรสิทธิ์ โทจำปา¹ อรอินท์ ประไชโย¹ และ ปวีณา น้อยทัพ^{1*}

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

Oraphan Payakkul¹, Worasit Tochampa¹, Orn-in Prachaiyo¹ and Paweena Noitup^{1*}

¹ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

¹Department 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 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างวัตถุดิบที่ได้จากการผสมเครื่องในปลาทับทิมปริมาณ 25 กรัมและน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร 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 (α -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 α -amino acid. The results indicated that *B. cereus* TISTR 687 exhibited the maximum degree of hydrolysis (67.00) at pH 7.5, 45°C for 12 hrs.

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

บทนำ

ประเทศไทยสามารถส่งออกผลิตภัณฑ์แปรรูปในกลุ่มของสัตว์น้ำไปจำหน่ายยังต่างประเทศติดอันดับหนึ่งในสิบของตลาดการค้าโลก และมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น จากการขยายตัวของอุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์น้ำนี้ ทำให้มีเศษเหลือใช้จากกระบวนการแปรรูปเกิดขึ้นมาก ซึ่งเศษเหลือเหล่านี้มีมูลค่าต่ำ และหากมีการจัดการที่ไม่ดีพอจะเกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมได้ เพราะเศษเหลือเหล่านี้เกิดการเน่าเสียได้ง่ายเนื่องจากมีส่วนประกอบของโปรตีนและ

ไขมันเป็นส่วนใหญ่ โดยหากเป็นโรงงานแปรรูปขนาดใหญ่จะขายต่อให้แก่โรงงานผลิตอาหารสัตว์ในราคาถูก แต่หากเป็นผู้ประกอบการแปรรูปขนาดเล็กจะทิ้งเศษเหลือเหล่านี้ร่วมกับขยะอื่น ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาล้างแวล้อมได้ในกระบวนการแปรรูปปลาจะก่อให้เกิดวัสดุเศษเหลือประมาณร้อยละ 30 – 35 (สันติต, 2549) ที่พบมากคือเครื่องใน หนั กเลือด ไครงและก้าง ซึ่งเศษเหลือเหล่านี้ประกอบด้วยโปรตีนและกรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมาณสูง (Shahidi et al., 1997) ดังนั้นจึงมีการนำเศษเหลือดังกล่าวมาใช้ให้เกิดประโยชน์หรือเพิ่มมูลค่า พบว่าการนำวัสดุเศษเหลือจากปลามาใช้ได้รับความสนใจมานานกว่า 10 ปีแล้ว โดยนำมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซต (protein hydrolysate) เปปไทด์ (peptide) หรือสารสกัดจากปลา (fish extract) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์โปรตีเอส (protease) (Kim et al., 1997) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีส่วนแบ่งทางการตลาดในการนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรมต่าง ๆ สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ,ยูวีน) 2546 (เอนไซม์โปรตีเอสที่ถูกนำมาผลิตใช้ในเชิงการค้าส่วนใหญ่ผลิตจากแบคทีเรียสกุลบาซิลลัส (*Bacillus* sp.) ที่มีปริมาณการใช้ที่ค่อนข้างสูงกว่าเอนไซม์โปรตีเอสที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ โดยมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในทางอุตสาหกรรม เกษตรกรรม เภสัชกรรมและทางการแพทย์ เป็นต้น

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

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของ *B. cereus* TISTR 687 มาใช้เพื่อเหนี่ยวนำให้เชื้อสร้างเอนไซม์โปรตีเอสออกมาย่อยโปรตีนในสับสเตรท และนำโปรตีนดังกล่าวไปใช้เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยผู้วิจัยหวังว่าจะสามารถนำสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวนี้ไปใช้เป็นพื้นฐานในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม เพื่อเป็นการลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม และเพิ่มประโยชน์หรือเพิ่มมูลค่าเศษเหลือจากปลาน้ำจืดต่อไป

วัตถุประสงค์และวิธีการ

1. สายพันธุ์และการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

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

2. การเตรียมวัตถุดิบ

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

3. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

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

4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

อุปสรรคสภาพของเอนไซม์โปรติเอส โดยเลี้ยงเชื้อทดสอบ *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. ศึกษาสภาวะการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับกรื่อยสลายตัวเอง (autolysis) ของวัตถุดิบ

เลือกสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4 นำมาใช้เป็นแนวทางในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้เครื่องในปลาทับทิมเป็นสับสเตรทในการเลี้ยงเชื้อ *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 หลังจากนั้นนำมาทำการวัดระดับการย่อยสลายที่เกิดขึ้น (%DH) ในรูปของกรดอะมิโนอิสระ (α -amino acid) โดยวิธีของ Hoyle & Merritt (1994) โดยนำโปรตีนไฮโดรไลเซตปริมาณ 1 มิลลิลิตรใส่หลอด centrifuge เติม trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich, USA) เข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันประมาณ 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนของเหลวใสด้านบนไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ปล่อยให้เกิดการย่อยสลายด้วยตัวเอง

การคำนวณระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis)

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

เมื่อ Total N คือ ร้อยละไนโตรเจนในวัตถุดิบ (ตัวอย่างเครื่องในปลาทับทิม)

ผลการศึกษา

1. องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

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

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 บ่มที่อุณหภูมิ 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	ของวงใส* (มม) (CZ)	ของโคโลนี* (มม) (CO)	ผลต่างระหว่างของวงใสและโคโลนี (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. สภาวะการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับกร่อยสลายตัวเอง (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

เหี่ยวนำไปให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนในตัวอย่างเครื่องในปลาที่หมักเทียบกับการย่อยสลายตัวเอง 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 ในตัวอย่างเครื่องในปลาที่หมัก 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

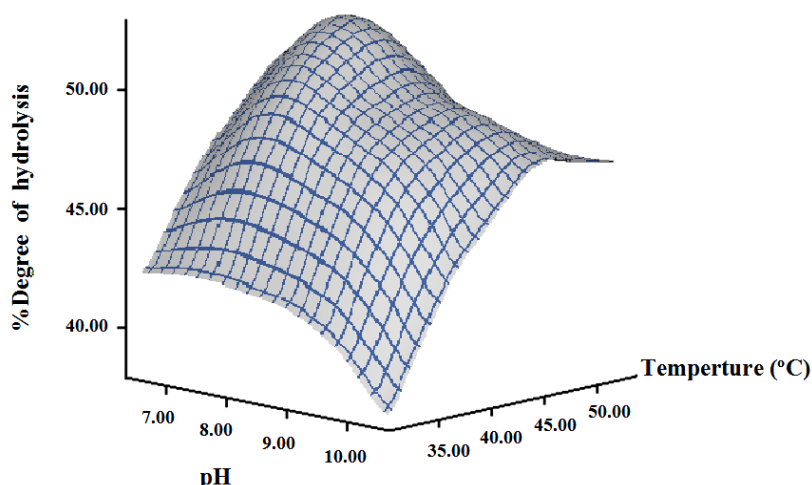
จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบพบว่า เครื่องในปลาที่หมักมีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก ร้อยละ 76.30 รองลงมาคือโปรตีนร้อยละ 14.90 นอกจากนี้มีไขมันและเถ้าร้อยละ 5.13 และ 1.64 โดยน้ำหนัก ซึ่งเห็นได้ว่าเครื่องในปลาที่หมักมีปริมาณของโปรตีนและไขมันค่อนข้างสูง โดยที่องค์ประกอบของวัตถุดิบที่ใช้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตมีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ วัตถุดิบที่นำมาใช้นั้นควรมีปริมาณโปรตีนสูงพอเหมาะ (Adler-Nissen, 1986) เนื่องจากโปรตีนเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญสำหรับการย่อยสลาย และในขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษานี้จำเป็นต้องมีขั้นตอนของการกำจัดไขมันออกจากวัตถุดิบ เนื่องจากไขมันในวัตถุดิบหากมีมากเกินไปอาจเกิดพันธะหรือจับกับโมเลกุลของโปรตีนเกิดเป็นลิพิดโปรตีน ทำให้มีโครงสร้างที่ใหญ่และซับซ้อนขัดขวางการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์นั่นเอง (Adler-Nissen, 1986)

เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *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

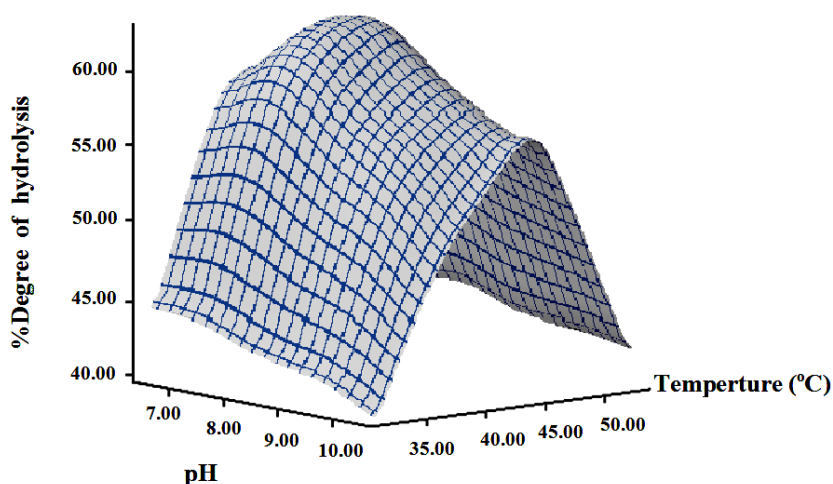
สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสย่อยสลายโปรตีนบนอาหารสูตรจำเพาะ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่เป็นต่างอ่อนได้ดีกว่าการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย การคัดเลือก *Bacillus* sp. ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส และไลเปสจากดิน พบว่า *Bacillus* sp. สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส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

จากการศึกษาระดับการย่อยสลายโปรตีนของตัวอย่างเครื่องในปลาที่บดที่เวลา 0 ชั่วโมง พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตได้ให้ค่าระดับการย่อยสลายตัวเองในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์จากภายนอกอยู่ที่ร้อยละ 21.14 ทั้งนี้เนื่องจากการย่อยสลายตัวเองจากเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวปลา 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 ในตัวอย่างเครื่องในปลาที่บด โดยเพาะเชื้อลงในตัวอย่างรวมถึงเตรียมตัวอย่างที่ไม่ได้ทำการเพาะเชื้อเพื่อใช้สำหรับเป็นตัวอย่างควบคุม กำหนดสภาวะที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีนเหมือนกันทั้งหมดโดยอยู่ที่ระดับความเป็นกรดต่าง 6.5 7.5 8.5 9.5 และ 10.5 บ่มที่อุณหภูมิ 31 37 45 และ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าทั้งตัวอย่างเครื่องในปลาที่บดที่เพาะเชื้อ *B. cereus* TISTR 687 เพื่อเหนี่ยวนำให้เชื้อสร้างเอนไซม์โปรติเอสออกมาย่อยโปรตีนในสับสเตรทและตัวอย่างควบคุมนั้นเกิดการย่อยสลายได้สูงที่สุดที่สภาวะเดียวกันคือ ที่ระดับความเป็นกรดต่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยให้ค่าร้อยละของระดับการย่อยสลายเท่ากับ 67.00 และ 50.08 ตามลำดับ โดยตัวอย่างเครื่องในปลาที่บดที่เพาะเชื้อให้ค่าของระดับการย่อยสลายสูงกว่าตัวอย่างที่ปล่อยให้เกิดการย่อยสลายตัวเองที่ระดับเดียวกันทั้งหมด

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



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างต่อร้อยละของระดับการย่อยสลายตัวเองของตัวอย่างเครื่องในปลาที่บดที่เวลา 12 ชั่วโมง



รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างต่อร้อยละของการย่อยสลายของตัวอย่างเครื่องในปลาที่ทำการเพาะเชื้อ *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 มาใช้เพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับการย่อยสลายโปรตีนในตัวอย่างเครื่องในปลาที่พบ พบว่า *B. cereus* TISTR 687 ยังคงให้ระดับการย่อยสลายสูงสุดที่ความเป็นกรดต่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการนำ *B. cereus* TISTR 687 มาใช้เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์โปรติเอสออกมาย่อยโปรตีนในตัวอย่างเครื่องในปลาที่พบอยู่ที่ความเป็นกรดต่าง 7.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยให้ร้อยละของระดับการย่อยสลายสูงที่สุดเท่ากับ 67.00

กิตติกรรมประกาศ

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

เอกสารอ้างอิง

- จักรพันธ์ สุวรรณพิมพ์ และสุพรรณิ แก่นสาร อะโอกิ. (2552). การคัดเลือก *Bacillus* sp. ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสอะไมเลสและไลเปสจากดิน. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 40(1), 389-392.
- เพ็ญศิริ อารังลักษณ์. (2533). การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเลือดเพื่อใช้ในอาหารสัตว์น้ำ. รวมบทความวิทยานิพนธ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ, 555.
- ยุวพิน ด่านดุสิตาพันธ์ และทวีรัตน์ วิจิตรสุนทรกุล. (2546). การเพิ่มผลผลิตในกระบวนการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสของ *Aspergillus oryzae* โดยการป้องกันการย่อยสลายตัวเอง. วารสารมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. ม.ป.ป.
- สันทนต์ ศิริอนันต์ไพบูลย์. (2549). ประสิทธิภาพของระบบเอสบีอาร์ซึ่งใช้เชื้อแคนดิดา ยูทิลลิส (ระยะที่ 1-2). ม.ป.ป.

- สุทธิพงศ์ พฤษทรัพย์เสริม. (2537). การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเลือดสุกรเพื่อใช้ในลูกชิ้นไก่, วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 111.
- A.O.A.C. (2000). *Official Methods of Analysis* (14th ed.). Washington D.C.: Association of Official Analytical Chemists.
- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymatic hydrolysate of food protein*. London: Elsevier Applied Science.
- Brody, J. (1965). *Fishery by-product technology*. Connecticut: AVI Publishing.
- Hoyle, N. T. & Merritt, J. H. (1994). Quality of fish protein hydrolysates from herring. *Journal of Food Science*, 59, 76-79.
- Hyun, C. K. & Shin, H. K. (2000). Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Process Biochemistry* (pp. 65-71), 36.
- Kim, S. K., Jeon, Y. J., Byeun, H. G., Kim, Y. T. & Lee, C. K. (1997). Enzymatic recovery of cod frame proteins with crude proteinase from tuna pyloric caeca. *Fisheries Science*. 63, 421-427.
- Kristinsson, H. G. & Rasco, B. A. (2000). Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline protease and a visceral serine protease mixture. *Process Biochemistry*, 36, 131-139.
- Meinke, W. W., Rahman, M. A. & Matti, K. K. F. (1972). Some factors influencing in production of protein isolate from whole fish. *Journal of Food Science*, 195-198.
- Ronald, A. (1963). Methods of protein hydrolysis. In A. Light & E. I. Smite (Eds.), *The protein ; composition, structure and function* (pp. 32-39). London: Academic Press.
- Shahidi, F., Han, X. Q. & Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysate from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53, 285-293.
- Zhao, Q. Y., Garreau, I., Sannier, F. & Piot, J. M., (1997), Opioid peptides derived from hemoglobin : hemorphins *Biopolymers*, 43, 75-98.
- Zhao, Q. Y., Piot, J. M., Gautier, V. & Cottenceau, G. (1996). Isolation and characterization of a bacterial growth-stimulating peptide from a peptic bovine hemoglobin hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, No. 6, 778-784.