การศึกษาการสกัดโปรตีนจากใบกระถินด้วยเอนไซม์อัลคาเลส
Study of protein extraction from *Leucaena leucocephala* de Wit. leaves by alcalase

ธันยนันท์ ศรีพันธ์ลม* และ ฐิฏิพร ชูศรี

โปรแกรมวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม
**thanyanan_kae@hotmail.com*

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการสกัดโปรตีนจากใบกระถินด้วยเอนไซม์อัลคาเลส โดยศึกษาระยะเวลาในการย่อยและความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์อัลคาเลส โดยใช้ความเข้มข้นเอนไซม์อัลคาเลส ร้อยละ 0.3, 0.5, 0.7 และ 0.9 (%v/v) ย่อยที่อุณหภูมิ 60 ºC ที่ pH 8.0 เป็นเวลา 90, 120, 150 และ 180 นาที จากนั้นนำสารละลายโปรตีนมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry พบว่าความเข้มข้นเอนไซม์อัลคาเลส ร้อยละ 0.7 (%v/v) ในสัดส่วนเอนไซม์ต่อใบกระถินแห้งเป็น 0.00175 (%v/w) ที่เวลา 90 นาที มีปริมาณโปรตีนสูงสุด 249.55 µg/mL จากนั้นศึกษาการสกัดโปรตีนโดยวิธีทางกายภาพและเคมีร่วมกับการใช้เอนไซม์อัลคาเลส เปรียบเทียบ 3 วิธี คือ 1) สกัดโปรตีนโดยใช้ความร้อนและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 2) สกัดโปรตีนโดยใช้เบสและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 3) สกัดโปรตีนโดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส พบว่าการสกัดโปรตีนโดยใช้เบสและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการสกัดโปรตีนจากใบกระถินพบปริมาณโปรตีนมากที่สุด 481.82 µg/mL รองลงมา คือ การสกัดโปรตีนโดยใช้ความร้อนและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 275.29 µg/mL และ การสกัดโปรตีนโดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส พบว่า มีปริมาณโปรตีนสอดคล้องกับการทดลองข้างต้น

คำสำคัญ: กระถิน โปรตีน เอนไซม์อัลคาเลส

Abstract

In this study, the extraction of protein from the Leucaena leucocephala de Wit. leaves by alcalase was studied. The concentration of enzyme was varied between 0.3, 0.5, 0.7 and 0.9 (%v/v) at 60ºC and pH 8.0 for 90, 120, 150 and 180 mins. The extracted solution was analyzed to obtain protein content by Lowry method. The maximum protein content was 249.55 µg/mL by using 0.7 (%v/v) alcalase for 90 min. The results were also compared with 1) Using heat with alcalase and 2) Using base with alcalase . It can be observed from the results that using base with alcalase is the most efficient in extracting protein from the Leucaena leucocephala de Wit. leaves with the extracted protein content equaling 481.82 µg/mL. Using heat with alcalase gave the protein content only 275.29 µg/mL.

Keyword: Leucaena leucocephala de Wit. , Protein, Alcalase

1. บทนำ

โปรตีนเป็นสารอาหารที่มีความจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของร่างกาย ในปัจจุบันแหล่งอาหารโปรตีนส่วนใหญ่จัดอยู่ในประเภทนม ไข่ และเนื้อสัตว์ ซึ่งมีราคาค่อนข้างสูงสำหรับประชาชนที่มีรายได้น้อยจึงไม่สามารถบริโภคให้เพียงพอต่อความต้องการของร่างกายได้ ขณะเดียวกันแหล่งอาหารโปรตีนที่มีอยู่ในพืชบางชนิดก็ถูกมองข้ามไปโดยไม่ได้นำมาบริโภค

กระถิน หรือ Wild Tamarind ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Leucaena leucocephala de Wit.* วงศ์ Leguminosae Mimosoideae เป็นพืชจัดอยู่ในตระกูลถั่วไม้ยืนต้นทรงพุ่มขนาดย่อมใบประกอบแบบขนนก ดอกเล็กๆอัดแน่นกระจุกกลม เกสรเป็นพู่สีขาว ฝักแบนยาว เมล็ดรูปไข่แบน ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด ปลูกได้ทุกสภาพพื้นที่ทั่วประเทศ ทุกส่วนของกระถินนิยมใช้ผสมอาหารสัตว์โดยเฉพาะใบกระถินมีคุณค่าทางอาหารสูง โดยมีระดับโปรตีนเฉลี่ยระหว่าง 27-45 % ของน้ำหนักแห้ง กระถินจัดเป็นพืชที่พบทั่วทุกภาคของประเทศไทย ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำใบของกระถินมาทำการวิจัย เพื่อศึกษาการสกัดโปรตีนจากใบกระถินด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ศึกษาระยะเวลาในการย่อยและความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์อัลคาเลส และทำการสกัดโปรตีนจากใบกระถินโดยวิธีทางกายภาพและเคมีร่วมกับการใช้เอนไซม์อัลคาเลส จากนั้นนำสารละลายโปรตีนไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry ซึ่งผลจากการวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้น เพื่อนำพืชต่างๆที่มีในประเทศไทยไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อสุขภาพต่อไปในอนาคต

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมวัตถุดิบ

นำต้นกระถินมาล้างให้สะอาด เก็บเฉพาะใบของกระถิน หลังจากนั้นนำมาผึ่งแดดและอบให้แห้งที่อุณหภูมิไม่เกิน 60°C แล้วบดให้ละเอียด นำไปชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2.2 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ (ดัดแปลงจากวิธีของ Wang และ Hesseltine,1965)

เติมสารละลาย 1 % เคซีน ลงในหลอดทดลอง 1 mL อุ่นที่ 40°C นาน 5 นาที จากนั้นนำเอนไซม์อัลคาเลส (เจือจาง 1000 เท่าด้วยน้ำกลั่น) 1 mL ใส่ลงในหลอดทดลองข้างต้น ผสมและบ่ม นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติมสารละลาย 5% TCA 3 mL เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที กรองตะกอนโปรตีน นำสารละลายส่วนใส 1 mL ใส่ในหลอดทดลองที่มี 0.4 M Na_2CO_3 5 mL ผสมให้เข้ากัน เติม Folin–Ciocalteau reagent 1 N 1 mL ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร สำหรับหลอดควบคุมวิธีการเช่นเดียวกัน แต่เติมสารละลาย 5% TCA 3 mL ลงไปในเอนไซม์อัลคาเลส 1 mL ทิ้งไว้ 10 นาที จึงเติมสารละลาย 1% เคซีน ลงไป 1 mL

คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาเลส คำนวณได้จากสูตร ดังนี้

Units/mL คือ

$$\frac{\text{ปริมาณกรดอะมิโนไทโรซีน (µg/mL) x ค่าความเจือจาง x ปริมาตรทั้งหมด (5 mL)}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลกรดอะมิโนไทโรซีน (181.19 g/mole) x เวลา (10 min) x ปริมาตรเอนไซม์ที่ใส่ลงไป (1mL)}}$$

2.3 การศึกษาความเข้มข้นและระยะเวลาในการย่อยที่เหมาะสมของเอนไซม์อัลคาเลส

นำใบกระถินบดแห้ง 4 g. แช่สารละลาย NaOH pH 10 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วย 0.1 M NaOH จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้น ร้อยละ 0.3, 0.5, 0.7 และ 0.9 (%v/v) 1 mL คำนวณให้มีเอนไซม์ในสัดส่วน เอนไซม์ต่อใบกระถินแห้ง เป็น 0.00075, 0.00125, 0.00175 และ 0.00225 (%v/w) ย่อยสลายที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 90, 120, 150 และ 180 นาที เขย่าตัวอย่างเป็นระยะ เมื่อครบกำหนดเวลาให้ความร้อนที่ 100°C เวลา 15 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แล้วทิ้งไว้ให้เย็นนำไปหมุนเหวี่ยงแยกตะกอน 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 นาที เก็บส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

2.4 การสกัดโปรตีนโดยวิธีทางกายภาพและเคมีร่วมกับการใช้เอนไซม์อัลคาเลส

ทำการสกัดปรียบเทียบ 3 วิธี

1) สกัดโปรตีนโดยใช้ความร้อนและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส

นำใบกระถินบดแห้ง 4 g. ผสมน้ำกลั่น 20 mL กวนให้เข้ากัน ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120°C เป็นเวลา 60 นาที ทิ้งให้เย็น ปรับ pH 8.0 ด้วย 0.1 M NaOH เติมสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้น ร้อยละ 0.7 (%v/v) ลงไป 1 mL คำนวณให้มีเอนไซม์ในสัดส่วน เอนไซม์ต่อใบกระถินแห้ง เป็น 0.00175 (%v/w) ย่อยสลายที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 90 นาที เขย่าตัวอย่างเป็นระยะ นำไปให้ความร้อนเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 100°C 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

นำไป หมุนเหวี่ยงแยกตะกอน 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 นาที เก็บส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

2) สกัดโปรตีนโดยใช้เบสและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส

นำใบกระถินบดแห้ง 4 g. ผสมน้ำกลั่น 20 mL กวนให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 10 ด้วย NaOH เข้มข้น ร้อยละ 20 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปรับ pH 8.0 ด้วย 0.1 M HCl จากนั้นทำการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (เช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น)

3) สกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์อัลคาเลส

นำใบกระถินบดแห้ง 4 g. ผสมน้ำกลั่น 20 mL กวนให้เข้า ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วย 0.1 M NaOH จากนั้นทำการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (เช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น)

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (ดัดแปลงจาก Lowry et al. ,1951)

ปิเปตสารละลายโปรตีนที่ได้จากการสกัด 5 µL เติมลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Alkali copper 5 mL ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นเติม Folin–Ciocalteau reagent 0.5 mL ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA)

3. ผลการทดลอง

3.1 ผลการเตรียมวัตถุดิบ

น้ำหนักใบกระถินบดแห้งก่อนและหลังอบที่ตรียมได้ โดยน้ำหนักกระถินก่อนอบ 385.50 กรัม และน้ำหนักกระถินหลังอบ 267.42 กรัม ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 น้ำหนักใบกระถินบดแห้งก่อนและหลังอบ

ผลการทดลอง	น้ำหนักกระถินก่อนอบ (g)	น้ำหนักกระถินหลังอบ (g)
ใบกระถิน	385.50	267.42

3.2 ผลการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์

จากการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาเลสหรือความสามารถในการทำงานของเอนไซม์อัลคาเลส พบว่าหลอดตัวอย่างมีปริมาณกรดอะมิโนไทโรซีน 12 µg/mL และหลอดควบคุมมีปริมาณกรดอะมิโนไทโรซีน 6 µg/mL เมื่อนำมาคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาเลสได้ 16.557 Units/mL คือ เอนไซม์อัลคาเลส ปริมาตร 1 mL สามารถย่อยสลายสารละลายเคซีน ได้กรดอะมิโนไทโรซีน 16.557 µg ภายในเวลา 1 นาที ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณกรดอะมิโนไทโรซีน

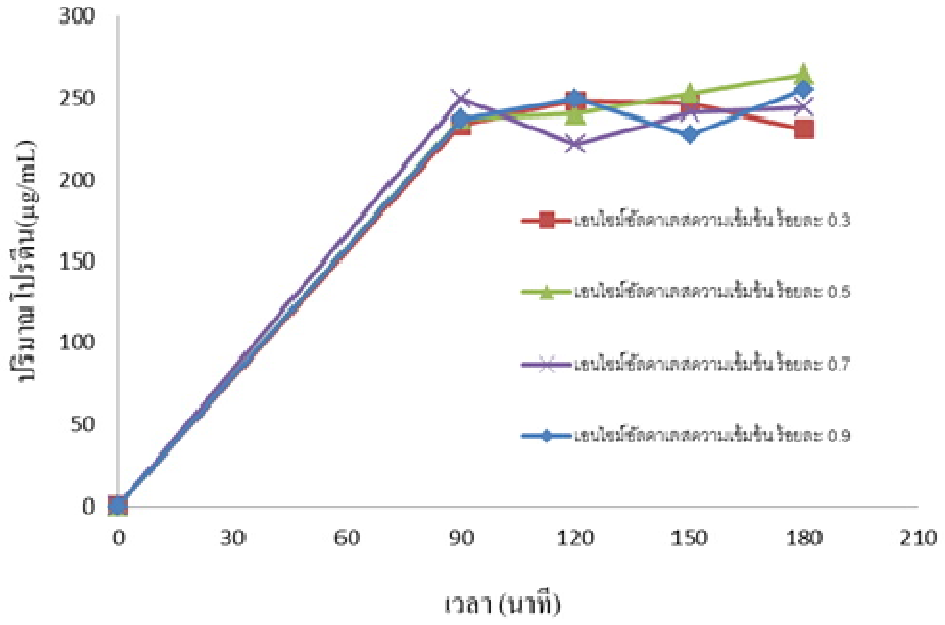
การทดลอง	ปริมาณกรดอะมิโนไทโรซีน (µg/mL)	กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาเลส (Units/mL)
หลอดตัวอย่าง	12	16.557
หลอดควบคุม	6	

หมายเหตุ : 16.557 Units/mL คือ เอนไซม์อัลคาเลส ปริมาตร 1 mL สามารถย่อยสลายสารละลายเคซีนได้กรดอะมิโนไทโรซีน 16.557 µg ภายในเวลา 1 นาที

3.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นและระยะเวลาในการย่อยที่เหมาะสมของเอนไซม์อัลคาเลส

จากการศึกษาพบว่าปริมาณโปรตีนที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ความเข้มข้น ร้อยละ 0.5 (%v/v) เวลาย่อยที่ 180 นาที มีปริมาณโปรตีนมากที่สุด 264.55 µg/mL แต่ในขณะเดียวกันที่ความเข้มข้นเอนไซม์อัลคาเลส ร้อยละ 0.7 (%v/v)

เวลาย่อยที่ 90 นาที มีปริมาณโปรตีนมากเช่นกัน 249.55 µg/mL จากการทดลองนี้จึงเลือกสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดโปรตีนจากใบกระถิน ที่ความเข้มข้นเอนไซม์อัลคาเลส ร้อยละ 0.7 (%v/v) คำนวณให้มีเอนไซม์ในสัดส่วน เอนไซม์ต่อใบกระถินแห้ง เป็น 0.00175 (%v/w) เวลาย่อยที่ 90 นาที เนื่องจากที่ความเข้มข้นเอนไซม์อัลคาเลส ร้อยละ 0.5 (%v/v) เวลาย่อยที่ 180 นาที เป็นเวลาที่นานเกินไป และปริมาณโปรตีนที่ได้ก็ไม่ต่างกันมากนัก ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ปริมาณโปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายเอนไซม์อัลคาเลสที่ความเข้มข้นและระยะเวลาการย่อยต่างๆ

3.4 ผลการสกัดโปรตีนโดยวิธีทางกายภาพและเคมีร่วมกับการใช้เอนไซม์อัลคาเลส

จากการศึกษาการสกัดโปรตีนจากใบกระถิน โดยใช้สภาวะความเข้มข้นเอนไซม์อัลคาเลส ร้อยละ 0.7 (%v/v) คำนวณให้มีเอนไซม์ในสัดส่วน เอนไซม์ต่อใบกระถินแห้ง เป็น 0.00175 (%v/w) เวลาย่อยที่ 90 นาที เปรียบเทียบ 3 วิธี คือ การสกัดโปรตีนโดยใช้ความร้อนและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส การสกัดโปรตีนโดยใช้เบสและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และการสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณโปรตีนที่ได้จากการสกัดโดยวิธีทางกายภาพและเคมีร่วมกับการใช้เอนไซม์อัลคาเลส

วิธีการสกัดโปรตีนโดยวิธีทางกายภาพและเคมีร่วมกับการใช้เอนไซม์อัลคาเลส	เอนไซม์ต่อใบกระถิน (%v/w)	เวลาในการย่อย (นาที)	ปริมาณโปรตีน (µg/mL)
การสกัดโปรตีนโดยใช้ความร้อนและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส	0.00175	90	275.29
การสกัดโปรตีนโดยใช้เบสและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส	0.00175	90	481.82
การสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์อัลคาเลส	0.00175	90	249.55

จากตารางที่ 3 พบว่า วิธีการสกัดโปรตีนโดยใช้เบสและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการสกัดโปรตีนจากใบกระถิน เนื่องจากสารละลายเบสจะเข้าไปทำลายพันธะเพปไทด์ โดยทำให้โปรตีนมีประจุเปลี่ยนแปลงไป ทำให้โปรตีนเสียสภาพและตกตะกอนออกมา และเมื่อนำมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนเพิ่มมากขึ้น พบปริมาณโปรตีนมากที่สุด 481.82 µg/mL รองลงมา คือ วิธีการสกัดโปรตีนโดยใช้ความร้อนและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และวิธีการสกัดโปรตีนโดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส 275.29 µg/mL และ 249.55 µg/mL ตามลำดับ

4. สรุปผลการทดลอง

จากการเตรียมวัตถุดิบ (ใบกระถิน) น้ำหนักใบกระถินบดแห้งก่อนและหลังอบที่ตรียมได้ โดยน้ำหนักกระถินก่อนอบ 385.50 กรัม และน้ำหนักกระถินหลังอบ 267.42 กรัม คิดเป็นร้อยละ 69.37

จากการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาเลส เอนไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการทำงาน 16.557 Units/mL ซึ่งหมายถึง เอนไซม์อัลคาเลส ปริมาตร 1 mL สามารถย่อยสลายสารละลายเคซีนได้กรดอะมิโนไทโรซีน 16.557 µg ภายในเวลา 1 นาที

จากการศึกษาความเข้มข้นและระยะเวลาในการย่อยที่เหมาะสมของเอนไซม์อัลคาเลส จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า ที่ความเข้มข้นเอนไซม์อัลคาเลส ร้อยละ 0.7 (%v/v) คำนวณให้มีเอนไซม์ในสัดส่วน เอนไซม์ต่อใบกระถินแห้ง เป็น 0.00175 (%v/w) เวลาย่อยที่ 90 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดโปรตีนจากใบกระถิน พบปริมาณโปรตีนมากที่สุด 249.55 µg/mL

จากการศึกษาการสกัดโปรตีนโดยวิธีทางกายภาพและเคมีร่วมกับการใช้เอนไซม์อัลคาเลส จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า วิธีการสกัดโปรตีนโดยใช้เบสและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการสกัดโปรตีนจากใบกระถิน พบปริมาณโปรตีนมากที่สุด 481.82 µg/mLรองลงมา คือ วิธีการสกัดโปรตีนโดยใช้ความร้อนและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และวิธีการสกัดโปรตีนโดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส 275.29 µg/mL และ 249.55 µg/mL ตามลำดับ

5. เอกสารอ้างอิง

[1] กระถินพืชมากสรรพคุณ. ค้นเมื่อ พฤศจิกายน 1, 2554, จาก http://www.crnfe.ac.th.
[2] พิมพา แก้วเต็มดวง และ มนสิการ บุษราคำ. (2550). การใช้ใบกระถินแช่น้ำเป็นแหล่งโปรตีนในสูตรอาหารนกกระทาเนื้อ. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร : มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี.
[3] มิโมซีนในกระถิน. ค้นเมื่อ พฤศจิกายน 5, 2554, จาก http://www.thailivestock.com.
[4] อรอนงค์ กังสดาลอำไพ, สุธี สุนทรธรรม, ธิติรัตน์ ปานม่วง และ แก้ว กังสดาลอำไพ. (2006). การศึกษาโปรตีนและสารต้านคุณค่าทางโภชนาการในกระถิน เมล็ดฟักทองและเมล็ดมะขาม : รายงานผลการวิจัย. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาอาหารเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
[5] สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกระทรวงศึกษาธิการ. (2549). เคมี เล่ม 5 กลุ่มสาระการเรียนรู้วิทยาศาสตร์. กรุงเทพฯ : คุรุสภาลาดพร้าว.
[6] การแตกตัวของกรดอะมิโน. ค้นเมื่อ มกราคม 16, 2555, http://www.thaigoodview.com.
[7] นิธิยา รัตนาปนนท์. (2553). เคมีอาหาร.กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.
[8] ภัทร คมกมล. (2552). การทำบริสุทธิ์และการจำแนกสมบัติเฉพาะของเอนไซม์เพคเตทไลเอสจากเชื้อแบคทีเรีย Paenibacillus polymyxa. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีการเกษตร : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
[9] ปราณี อ่านเปื่อง. (2543). เอนไซม์ทางอาหาร. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
[10] สุปราณี แย้มพราย. (2551). การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากของเหลือจากโรงงานผลิตซูริมิเพื่อใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
[11] อรอุมา เสลานนท์. (2553). ผลของโปรตีนสกัดจากเมล็ดสบู่ดำต่อการงอกของเมล็ดพริกขี้หนู. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี : มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

[12] สีวิกา กิจสวัสดิ์ และ นงพงา คุณจักร. (2008). โปรตีนไฮโดรไลเซทจากเลือดสุกร. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี : มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

[13] T.E.and Ekpenyong. (1986). “Nutrient and amino acid composition of Leucaena leucocephala (Lam.) de Wit.” Animal Feed Science and Technology, 15 (0377-8401/3), 183-187.

[14] Sereewatthanawut, I.,Prapintip, S.,and et. al. (2008). “Extraction of protein and amino acids from deoiled rice bran by subcritical water hydrolysis.” Bioresource Technology, 99(3), 555–561.

[15] Drew, J. and Charles, E. (2009). “Extraction of protein from distiller’s grain.” Bioresource Technology, 100(6), 2012–2017.

[16] นวลพรรณ ณ ระนอง. (2550). ปฏิบัติการเอนไซม์วิทยา.โครงการตำรา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง : กรุงเทพฯ

[17] พิลาณี ไวถนอมสัตย์ และคณะ. (2545). การแยกและใช้ประโยชน์ไหมจากน้ำกาวจากกระบวนการสาวไหม. ฝ่ายเทคโนโลยีเอนไซม์และการจัดการของเสีย สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

[18] พิลาณี ไวถนอมสัตย์ และคณะ. (2548). การวิจัยและพัฒนาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากไหมอีรี่โดยเทคโนโลยีทางด้านเอนไซม์. ฝ่ายเทคโนโลยีเอนไซม์และการจัดการของเสีย สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

[19] เรืองลักขณา จามิกรณ์. (2547). ชีวเคมีเบื้องต้น.กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

[20] พัชรา วีระกะลัส. (2541). เอนไซม์.กรุงเทพฯ : ศูนย์หนังสือแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.