

NGHIÊN CỨU THU NHẬN CHẾ PHẨM ENZYME PROTEASE TỪ RUỘT CÁ BASA (*Pangasius bocourti*)

Trần Quốc Hiền⁽¹⁾, Lê Văn Việt Mẫn⁽²⁾

(1) Trung tâm Công nghệ Sau thu hoạch, Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản II

(2) Trường Đại học Bách khoa, ĐHQG-HCM

1. MỞ ĐẦU

Ngành chế biến thủy sản trong nước và trên thế giới hàng năm thải ra một lượng lớn các phụ phẩm cần được xử lý hoặc chế biến tiếp. Phụ phẩm thủy sản thường là nội tạng, đầu, xương, da... Để giải quyết một lượng lớn phụ phẩm như hiện nay, tại Việt Nam và trên thế giới đang có xu hướng tận thu phần phụ phẩm để chế biến thành các sản phẩm có giá trị gia tăng[1]. Một số phụ phẩm có giá trị dinh dưỡng cao dùng để chế biến thành bột cá, dầu cá... [4]. Ngoài ra các sản phẩm như: chế phẩm enzyme, peptide có hoạt tính sinh học, màng sinh học được chế biến từ một số loại phụ phẩm thủy sản có thể mang lại những hiệu quả kinh tế rất lớn cho con người [8].

Tại Việt nam hiện nay, phụ phẩm của cá tra, basa được sử dụng chủ yếu làm thức ăn cho gia súc, thủy sản và làm phân bón. Việc thu nhận chế phẩm enzyme protease từ ruột cá basa là một vấn đề được đặt ra nhằm khai thác và sử dụng hiệu quả hơn phụ phẩm của ngành chế biến thủy sản.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Nội tạng của cá basa do nhà máy chế biến thủy sản Vĩnh Long cung cấp. Sau khi giết mổ, nội tạng được bảo quản ở nhiệt độ -20°C . Thời gian bảo quản nội tạng càng ngắn càng tốt để tránh hiện tượng enzyme bị biến tính.

Muối amonium sulfat, ethanol, aceton và isopropanol được sử dụng như là những tác nhân để kết tủa enzyme. Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu này đều do Trung Quốc sản xuất.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Ruột cá basa được cắt nhỏ đến kích thước 4×8 (mm x mm) và được phối trộn với dung môi theo tỷ lệ thích hợp. Nhiệt độ dung môi trước khi phối trộn là $2-4^{\circ}\text{C}$. Tiếp theo, hỗn hợp được nghiền trong thiết bị Ik T25 (Đức) với vận tốc 9000v/phút trong thời gian 3 phút trước khi quá trình trích enzyme bắt đầu. Trong quá trình nghiền, nhiệt độ hỗn hợp không vượt quá 5°C .

Việc tối ưu hóa quá trình chiết enzyme từ ruột cá basa được thực hiện theo phương pháp qui hoạch thực nghiệm. Ý nghĩa của các hệ số phương trình hồi qui được kiểm tra theo tiêu chuẩn *Student* và sự tương thích của phương trình hồi qui với thực nghiệm được kiểm tra theo tiêu chuẩn *Fisher* [3].

Các phương pháp phân tích

Hoạt tính protease được xác định theo phương pháp Anson cải tiến [1]. Hàm lượng protein được xác định theo phương pháp Lowry [1]

Công thức tính toán

Hoạt tính riêng là số đơn vị hoạt tính enzyme được tính trên 1mg protein của chế phẩm. Hiệu suất thu hồi protease là tỷ lệ giữa tổng hoạt tính enzyme thu được sau quá trình tinh sạch và tổng hoạt tính enzyme trong mẫu trước khi đem tinh sạch.

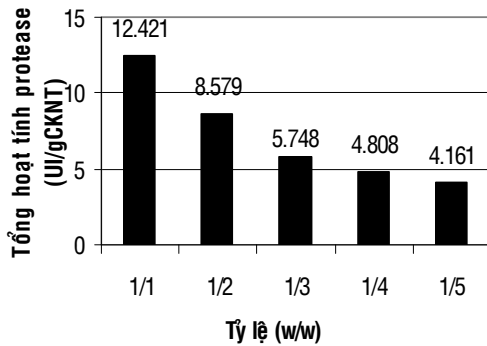
Độ tinh sạch là tỷ lệ giữa hoạt tính riêng của enzyme thu được sau quá trình tinh sạch và hoạt tính riêng của mẫu enzyme trước khi đem tinh sạch

3.KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

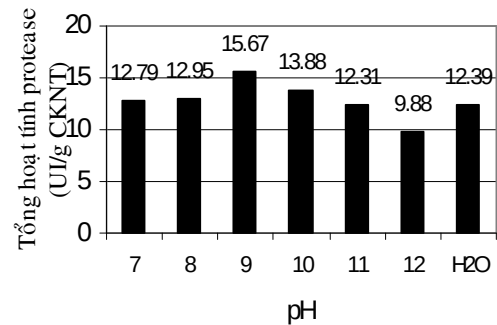
3.1.Trích ly enzym protease từ ruột cá Basa

3.1.1.Xác định tỷ lệ khối lượng nội tạng/ dung môi (w/w) cho quá trình trích ly enzyme protease

Ruột cá basa được đem trích ly bằng nước cất ở nhiệt độ 30⁰C trong thời gian là 10 phút. Tỷ lệ ruột/ nước cất (w/w) được thay đổi lần lượt là: 1/1; 1/2; 1/3; 1/4 và 1/5. Kết quả thực nghiệm được trình bày ở hình 1.



Hình 1. Ảnh hưởng của tỷ lệ ruột/dung môi đến quá trình trích ly protease từ ruột cá



Hình 2. Ảnh hưởng của pH dung môi đến quá trình trích ly protease từ ruột cá

Chúng tôi nhận thấy rằng dịch trích ly enzyme thu được có tổng hoạt tính protease cao nhất là 12,42UI/g CKNT (chất khô nội tạng) tương ứng với tỷ lệ ruột/ dung môi là 1/1(w/w).

Theo lý thuyết, khi tăng lượng dung môi thì quá trình trích ly enzyme từ nguyên liệu vào dung môi sẽ trở nên dễ dàng hơn. Tuy nhiên, khi ta thay đổi tỷ lệ ruột và nước cất sử dụng trong quá trình trích ly thì giá trị pH dịch trích cũng thay đổi theo và nó ảnh hưởng đến độ hòa tan và khả năng khuếch tán của các protein từ ruột vào dịch trích. Khi chúng tôi tăng lượng nước cất lên nhiều hơn so với tỷ lệ ruột/dung môi =1/1(w/w) thì tổng hoạt tính protease của dịch trích ly sẽ giảm.

3.1.2.Xác định pH trích ly

Thông thường, hệ enzyme protease trong ruột nhóm cá da trơn hoạt động tối ưu trong vùng pH kiềm [5]. Chúng tôi tiến hành trích ly protease từ ruột cá basa, sử dụng các dung dịch đệm có giá trị pH khác nhau như sau: dung dịch đệm 0,2 N phosphate (pH 7,0), đệm 0,2 N Tris-HCl (pH 8,0) và đệm 0,2 N Glycine-NaOH (pH 9,0-12,0). Nước cất được chọn làm dung môi đối chứng.

Chọn tỷ lệ nội tạng/ dung môi là 1/1 (w/w), nhiệt độ và thời gian trích ly lần lượt là 30°C và 10 phút. Kết quả được trình bày ở hình 2.

Chúng tôi nhận thấy rằng tổng hoạt tính protease của dịch chiết thu được sẽ thay đổi khi ta sử dụng các dung dịch đệm có giá trị pH khác nhau để trích ly enzyme. Dịch trích ly từ ruột có tổng hoạt tính protease cao nhất (15,67UI/g CKNT) khi sử dụng dung dịch đệm có giá trị pH 9,0. Khi tăng pH từ 7,0 đến 9,0, tổng hoạt tính protease của dịch trích ly enzyme thu được tăng từ 12,79 đến 15,67UI/g CKNT, tức tăng 22,5%. Tuy nhiên, nếu ta tiếp tục tăng giá trị pH từ 9,0 đến 12,0 thì tổng hoạt tính protease của dịch trích ly enzyme thu được sẽ giảm.

So với mẫu kiểm chứng sử dụng dung môi là nước cất, khi sử dụng dung dịch đệm pH 9,0 để trích ly enzyme từ ruột thì tổng hoạt tính protease thu được cao hơn gấp 1,59 lần.

3.1.3.Xác định nhiệt độ trích ly

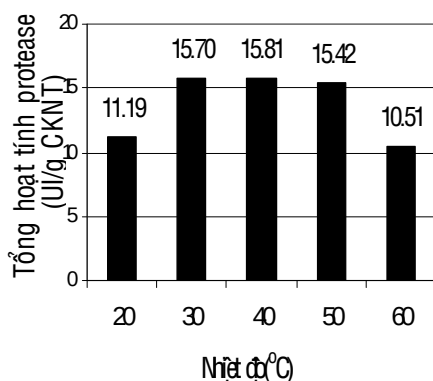
Tiến hành trích ly protease kiềm từ ruột cá basa trong dung dịch đệm pH 9,0 với tỷ lệ ruột/dung môi là 1/1(w/w) trong thời gian 10 phút. Nhiệt độ trích ly được thay đổi lần lượt là: 20, 30, 40, 50 và 60°C. Hoạt tính protease tổng của dịch trích ly thu được ở các giá trị nhiệt độ khác nhau được trình bày ở hình 3.

Chúng ta thấy rằng: khả năng trích ly enzyme protease từ ruột cá basa phụ thuộc vào nhiệt độ. Khi nhiệt độ tăng từ 20°C đến 40°C, sự khuếch tán và hòa tan enzyme từ ruột vào dung môi tăng theo, do đó tổng hoạt tính protease của dịch trích ly tăng từ 11,19 lên 15,81 UI/gCKNT, tức tăng 41,29%.

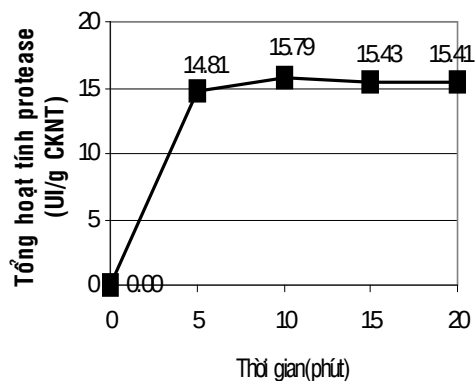
Khi chúng tôi tăng nhiệt độ trích ly cao hơn 40°C thì tổng hoạt tính enzyme thu được bị giảm đi. Có lẽ khoảng nhiệt độ 50-60°C là thích hợp cho các phân tử protease xúc tác thủy phân lẫn nhau. Hơn nữa, nhiệt độ cao có thể làm biến tính bất thuận nghịch enzyme.

3.1.4.Xác định thời gian trích ly

Tiến hành trích ly protease kiềm từ ruột cá basa trong dung dịch đệm 0,2 N Glycine-NaOH pH 9,0 với tỷ lệ ruột/dung môi là 1/1(w/w) ở nhiệt độ 40°C. Thời gian trích ly thay đổi lần lượt là: 5, 10, 15, và 20 phút. Kết quả được trình bày ở hình 4.



Hình 3. Ảnh hưởng nhiệt độ đến quá trình trích ly protease từ ruột cá



Hình 4. Ảnh hưởng thời gian trích ly đến hoạt tính protease thu nhận được từ ruột cá

Khi chúng ta tăng thời gian trích ly từ 5 phút lên 10 phút thì khả năng khuếch tán của enzyme protease vào dung môi tăng. Với thời gian trích ly là 10 phút, dịch trích ly enzyme từ ruột cho tổng hoạt tính protease cao nhất là 15,79 UI/g CKNT. Nếu ta kéo dài thời gian trích ly vượt hơn 10 phút thì tổng hoạt tính protease thu được trong dịch chiết không tăng nữa mà còn bị giảm nhẹ. Có lẽ do thời gian dài, các phân tử protease trong dịch trích ly xúc tác phản ứng thủy phân lẫn nhau.

3.1.4. Tối ưu hóa điều kiện trích ly protease từ ruột cá Basa (pH, nhiệt độ) bằng phương pháp qui hoạch thực nghiệm

Hai yếu tố pH và nhiệt độ trích ly được chọn để thực hiện qui hoạch thực nghiệm vì chúng ảnh hưởng rất lớn đến hiệu suất chiết enzyme protease.

Hai yếu tố không thay đổi trong quá trình khảo sát là:

+ Tỷ lệ Ruột/ dung môi: 1/1(w/w)

+ Thời gian trích ly: 10 phút.

Chúng tôi sử dụng phương án trực giao cấp 2:

Số thí nghiệm tối ưu: N = 9, trong đó có một thí nghiệm ở tâm phương án. Ngoài ra, chúng tôi thực hiện thêm ba thí nghiệm ở tâm nữa để kiểm tra ý nghĩa các hệ số của phương trình hồi qui.

Hai yếu tố cần khảo sát là:

+ X₁ là pH dung môi trích ly với mức dưới: 8,5; tâm: 9,0 và mức trên: 9,5

+ X₂ là nhiệt độ trích ly với mức dưới 35 °C, tâm 40 °C và mức trên: 45 °C

Hàm mục tiêu Y: Tổng hoạt tính protease thu được trong dịch trích ly (UI/g CKNT).

Ma trận qui hoạch thực nghiệm quá trình trích ly protease từ ruột cá Basa được trình bày ở bảng 1

Bảng 1. Ma trận và kết quả qui hoạch thực nghiệm quá trình trích ly protease từ ruột cá Basa

Mẫu thí nghiệm	X ₁	X ₂	Y (UI/g CKNT)
M ₁	-	-	13.6161
M ₂	-	+	13.5490
M ₃	0	-	14.4855
M ₄	0	+	14.0125
M ₅	+	-	15.7796
M ₆	+	+	13.6581
M ₇	-	0	12.6888
M ₈	+	0	13.7048

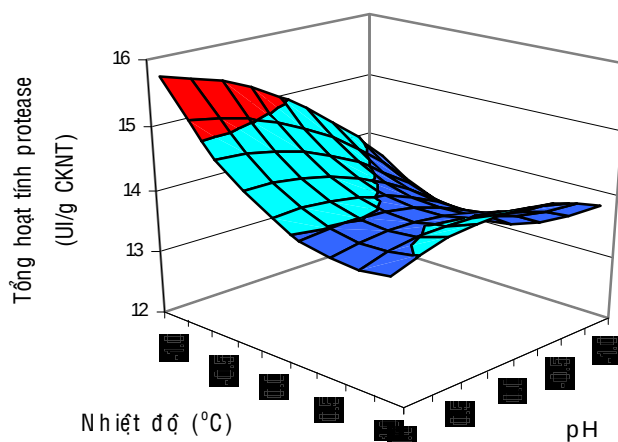
M_9	0	0	14.1111
M_{10}	0	0	14.2650
M_{11}	0	0	14.0330
M_{12}	0	0	14.0985
Phương trình hồi qui: $Y=13.9562+0.481x_1-0.4436x_2-0.5136x_1x_2-0.3703x_1^2+0.6819x_2^2$ (1)			

Ghi chú: (-): mức dưới ; (0): tâm; (+): mức trên

Sau khi giải bài toán qui hoạch thực nghiệm và tính các hệ số phương trình hồi qui, ý nghĩa của các hệ số được kiểm tra theo tiêu chuẩn *Student* với $p = 0,05$, số bậc tự do $f = 3-1 = 2$, chúng tôi thu được phương trình hồi qui (1)

Kiểm tra sự tương thích phương trình hồi qui với thực nghiệm theo tiêu chuẩn *Fisher* với $F = 4,645$; $F_{0,95}(9-2,3-1) = 19,3$. Do $F < F_{0,95}(9-2,3-1)$ nên phương trình hồi qui (1) tương thích với thực nghiệm.

Phương trình (1) với hệ trục tọa độ X_1 và X_2 nằm trong khoảng $[-1,1]$ được biểu diễn trên *hình 5*.



Hình 5. Tổng hoạt tính protease của dịch trích ly thu được từ ruột cá Basa trong thí nghiệm tối ưu hóa qui hoạch thực nghiệm

Chúng tôi nhận thấy rằng cả hai yếu tố pH và nhiệt độ đều ảnh hưởng đến quá trình trích ly protease từ ruột cá basa theo một qui luật phức tạp. Giá trị cao nhất của hàm mục tiêu Y khi X_1 có giá trị trong khoảng từ 0,5 đến 1,0 và X_2 có giá trị trong khoảng từ -1,0 đến -0,75.

Chúng ta có thể xác định được pH và nhiệt độ tối ưu cho quá trình trích ly enzyme từ ruột cá Basa khi giải phương trình hồi qui (1). Dựa theo kết quả thu được trên *hình 5*, chúng tôi chọn điều kiện thích hợp để chiết enzyme từ ruột cá basa cho những thí nghiệm tiếp theo như sau: $X_1=1$ và $X_2=-1$ tương ứng với pH 9,5 và nhiệt độ chiết 35°C.

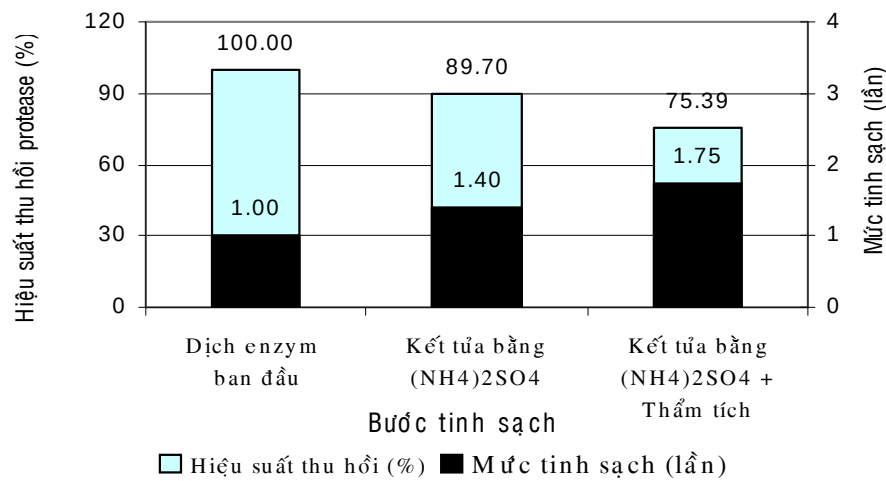
3.2. Tinh sạch enzyme protease trong dịch chiết từ ruột cá Basa bằng tác nhân $(NH_4)_2SO_4$

Chúng tôi chỉ khảo sát sự kết tủa enzyme trong dịch chiết từ ruột cá basa tại nồng độ muối $(NH_4)_2SO_4$ bão hòa là 70%. Chúng tôi bổ sung muối (dạng hạt) vào dịch chiết

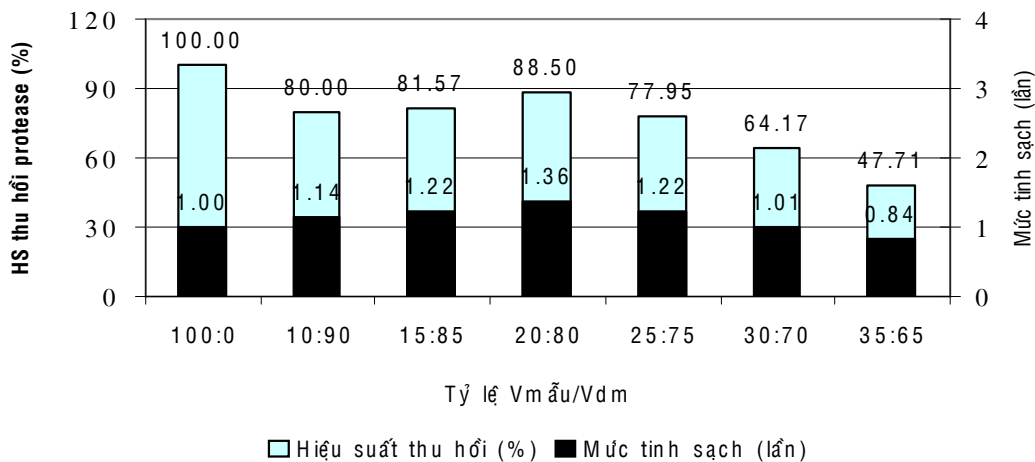
enzyme đã được làm lạnh (2°C) cho đến khi đạt nồng độ muối theo yêu cầu và khuấy đều. Protein sau khi kết tủa được tách và hòa tan trở lại trong một thể tích dung dịch đệm bằng thể tích dịch trích enzyme ban đầu. Sau đó, tiến hành loại bỏ muối bằng phương pháp thẩm tích qua màng cellophan [2, 7, 9]. Kết quả được trình bày ở *hình 6*.

Ta thấy rằng, nếu kết tủa enzyme protease kiềm bằng muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ thì hiệu suất thu hồi enzyme và mức tinh sạch đạt 89,70% và 1,39 lần.

Việc kết hợp phương pháp thẩm tích qua màng cellophan với phương pháp kết tủa enzyme bằng muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sẽ làm tăng độ tinh sạch của chế phẩm protease so với phương pháp chỉ kết tủa enzyme bằng muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Độ tinh sạch chế phẩm tăng từ 1,40 lên 1,75, tức tăng 25%. Tuy nhiên, hiệu suất thu hồi enzyme protease giảm từ 89,70% xuống 75,39%. Do trong quá trình thẩm tích, ngoài lượng muối thoát qua màng cellophan thì một lượng protein cũng có thể bị thất thoát.



Hình 6. Hiệu suất thu hồi và mức tinh sạch protease kiềm trong dịch trích ly ruột cá Basa (tác nhân kết tủa $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)



Hình 7. Hiệu suất thu hồi và mức tinh sạch protease kiềm trong dịch trích ly từ ruột cá Basa (tác nhân kết tủa: ethanol)

3.3. Tinh sạch enzyme protease có trong dịch chiết từ ruột cá basa bằng tác nhân dung môi hữu cơ (ethanol, aceton và isopropanol)

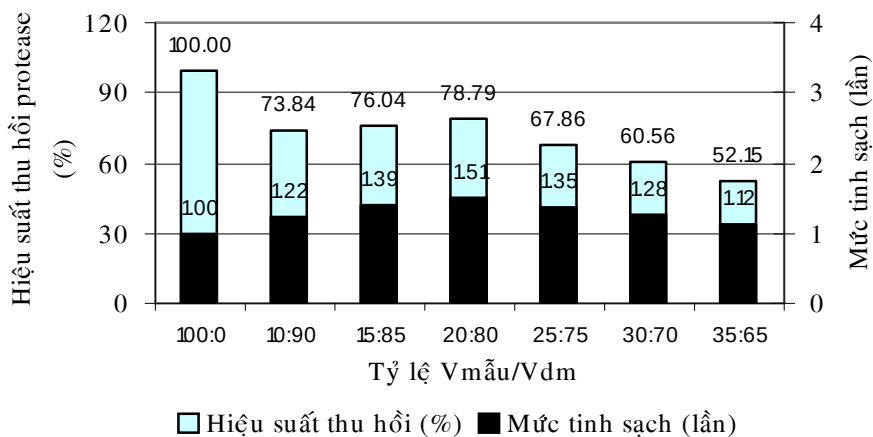
Dịch chiết enzyme ($V_{\text{mẫu}}$) và dung môi hữu cơ (V_{dm}) (ethanol, aceton và isopropanol) được làm lạnh lần lượt về 2°C và -18°C trước khi phối trộn với nhau. Sau khi phối trộn $V_{\text{mẫu}}/V_{\text{dm}}$ ở những tỷ lệ xác định, giữ hỗn hợp ở nhiệt độ 2°C trong thời gian 30 phút rồi tiến hành tách kết tủa ra khỏi hỗn hợp bằng phương pháp ly tâm lạnh (10000V/phút, 10 phút) [6,7].

Kết tủa protease bằng ethanol

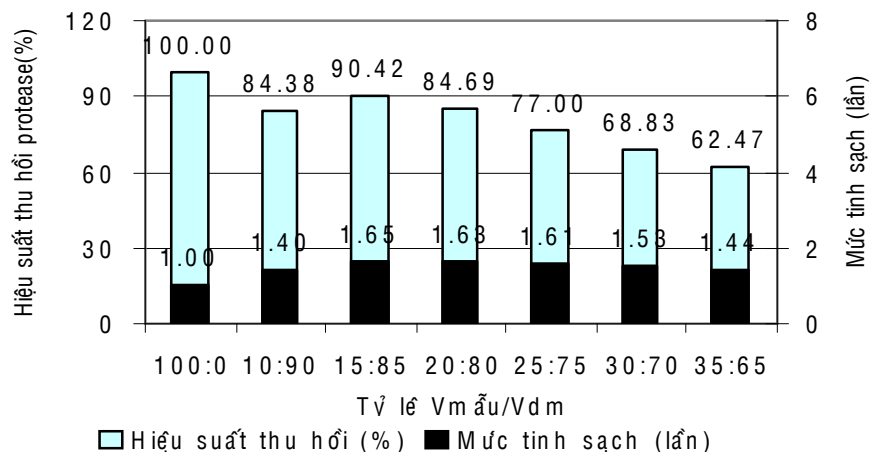
Kết quả thực nghiệm được trình bày ở hình 7. Khi tỷ lệ ethanol trong tổng thể tích hỗn hợp (dịch enzyme thô và dung môi) tăng dần thì hiệu suất thu hồi protease cũng như mức tinh sạch của chế phẩm sẽ tăng. Có lẽ đó là do khi số phân tử dung môi trong hỗn hợp tăng, chúng sẽ tách triệt để hơn lớp phân tử nước bao lấy xung quanh phân tử protein, làm giảm tính tan của protein, tăng khả năng kết tủa của chúng. Khi tỷ lệ $V_{\text{mẫu}}/V_{\text{dm}}$ là 20/80 thì hiệu suất thu hồi protease cao nhất (88,50%) và mức tinh sạch của chế phẩm cũng cao nhất (1,36 lần). Nếu ta tiếp tục tăng tỷ lệ ethanol trong tổng thể tích hỗn hợp vượt quá 80% thì hiệu suất thu hồi protease và mức tinh sạch của chế phẩm sẽ giảm.

Kết tủa protease bằng acetone

Kết quả được trình bày ở hình 8. Chúng ta thấy rằng khi tăng tỷ lệ aceton trong tổng thể tích hỗn hợp (dịch enzyme thô và aceton) thì hiệu suất thu hồi enzyme cũng như mức tinh sạch của chế phẩm sẽ tăng. Khi tỷ lệ $V_{\text{mẫu}}/V_{\text{dm}}$ là 20/80 thì hiệu suất thu hồi enzyme cao nhất (78,78%) và mức tinh sạch của chế phẩm cũng cao nhất (1,51 lần). Nếu tăng tỷ lệ aceton trong thể tích hỗn hợp vượt quá 80% thì hiệu suất thu hồi protease và mức tinh sạch của chế phẩm sẽ giảm.



Hình 8. Hiệu suất thu hồi và mức tinh sạch protease kiềm trong dịch trích ly từ ruột cá Basa (tác nhân kết tủa: aceton)



Hình 9. Hiệu suất thu hồi và mức tinh sạch protease kiềm trong dịch trích ly từ ruột cá Basa (tác nhân kết tủa: isopropanol)

Kết tủa protease bằng isopropanol

Kết quả được trình bày ở *hình 9*. Chúng ta thấy rằng isopropanol làm kết tủa enzyme theo qui luật tương tự như ethanol và aceton. Khi tỷ lệ isopropanol trong tổng thể tích hỗn hợp tăng dần thì hiệu suất thu hồi enzyme cũng như mức tinh sạch của chế phẩm sẽ tăng cao. Khi tỷ lệ $V_{mẫu}/V_{dm}$ là 15/85 thì hiệu suất thu hồi enzyme cao nhất (90,42%) và mức tinh sạch của chế phẩm cũng cao nhất (1,65 lần). Nếu ta tiếp tục tăng tỷ lệ isopropanol trong thể tích hỗn hợp vượt quá 85% thì hiệu suất thu hồi enzyme và mức tinh sạch của chế phẩm sẽ giảm.

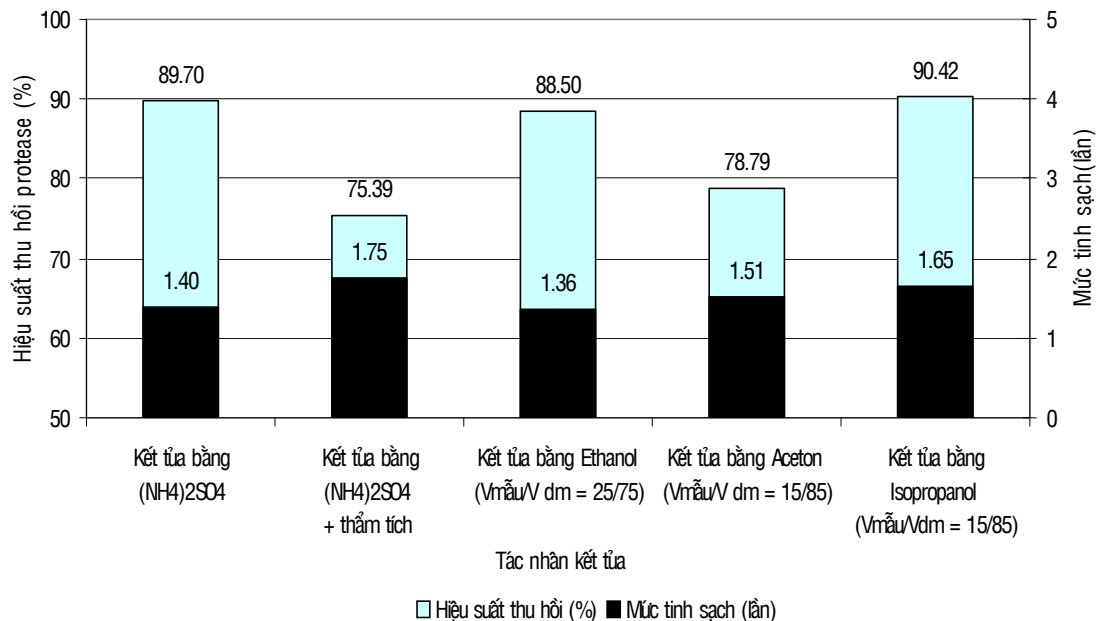
3.4.Lựa chọn tác nhân kết tủa thích hợp

Từ những kết quả nghiên cứu thu được ở trên chúng tôi nhận thấy rằng các tác nhân kết tủa protease đã được sử dụng đều cho hiệu suất thu hồi enzyme khá cao trên các mẫu dịch trích ly enzyme thô từ ruột cá basa (75,39-90,42%).

Sử dụng muối $(NH_4)_2SO_4$ để kết tủa protease trong dịch chiết enzyme thô kết hợp với phương pháp thẩm tích qua màng cellophan cho chế phẩm protease kiềm với mức tinh sạch cao nhất là 1,75 lần, tuy nhiên hiệu suất thu hồi enzym lại thấp nhất 75,39%. Phương pháp kết tủa enzyme bằng muối $(NH_4)_2SO_4$ kết hợp với phương pháp thẩm tích qua màng cellophan khá phức tạp, tốn nhiều thời gian và chi phí hơn so với phương pháp sử dụng các tác nhân kết tủa khác.

Khi sử dụng tác nhân kết tủa enzyme là các dung môi hữu cơ như ethanol, aceton và isopropanol thì mức tinh sạch chế phẩm thu được thấp hơn đôi chút so với phương pháp kết tủa enzyme bằng muối $(NH_4)_2SO_4$ kết hợp với phương pháp thẩm tích qua màng cellophan nhưng hiệu suất thu hồi protease lại cao hơn. Trong các dung môi hữu cơ đã khảo sát, khi sử dụng isopropanol với tỷ lệ $V_{mẫu}/V_{dm}$ là 15/85, hiệu suất thu hồi protease từ dịch trích ly ruột cá basa đạt giá trị cao nhất là 90,42% *hình 10*. Việc sử dụng dung môi để tinh sạch enzyme nhìn chung có chi phí tương đối thấp, qui trình thực hiện đơn giản.

Chúng tôi chọn isopropanol là tác nhân kết tủa thích hợp nhất cho việc thu nhận chế phẩm protease kiềm từ ruột cá Basa.



Hình 10. Mức tinh sạch và hiệu suất thu hồi protease có trong dịch trích từ ruột cá Basa khi sử dụng các tác nhân kết tủa khác nhau

4. KẾT LUẬN

Dịch trích ly enzyme protease thu được từ ruột cá basa có tổng hoạt tính cao nhất là 15,78UI/gCKNT trong điều kiện trích ly: tỷ lệ mẫu/dung môi: 1/1 (w/w); pH 9,5; nhiệt độ 35°C; thời gian trích ly 10 phút.

Dung môi isopropanol được xem là tác nhân thích hợp nhất để kết tủa protease từ ruột cá Basa. Nếu sử dụng isopropanol với tỷ lệ $V_{\text{mẫu}}/V_{\text{dm}}$ là 15/85 thì hiệu suất thu hồi enzyme là 90,42% và chế phẩm protease kiểm đạt mức tinh sạch 1,65 lần. Tuy nhiên, dịch trích ly enzyme protease thu được từ ruột cá basa có tổng hoạt tính chỉ bằng 5,16% so với dịch trích ly enzyme từ ruột cá ngừ vây vàng [5] và chỉ bằng 1,26% khi so với dịch trích ly enzyme protease thu được từ *Bacillus subtilis* PE-11 [2].

Chúng tôi đang tiếp tục nghiên cứu xác định các tính chất và thông số động học của chế phẩm protease thu được từ ruột cá basa và thử ứng dụng chế phẩm để thủy phân protein trong công nghệ thực phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Đỗ Văn Ninh, *Một số tính chất cơ bản của enzyme protease nội tạng cá thu*, Tạp chí thủy sản số 3, trang 20-22, (2003).
- [2]. Adinarayana. K, Ellaiah. P, Prasad. D. S., *Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated Bacillus subtilis PE-11*, AAPS Pharm. Sci. Tech. 2003, Article 56, 9p (2003)
- [3]. Douglas C. Montgomery, *Design and analysis of experiments*, John Wiley & Son, Inc, 684p (2002)
- [4]. Goh Kian Heng and Yeap Soon Eong, *Maximizing utilization of fish catch for human consumption*, Region workshop on low value and trash fish in the Asia-pacific region, Ha Noi, Viet Nam, 3p (2005)
- [5]. Klomklao. S, Bebjakul. S and Visessanguan. S, *Comparative studies on proteolytic activity of splenic extract from three tuna species commonly used in Thailand*, Journal of Food Biochemistry 28, pp 355-372 (2004)
- [6]. Rodney. F. B, *Modern experimental biochemistry*, The Benjamin/ Cummings Publishin Company, Inc, 555p (1993)
- [7]. Roe. S, *Protein purification techniques*, Oxford University press, 262p (2001)
- [8]. Rustad, T, *Utilisation of marine by products*, Electronic journal of inveromental, agricultural and food chemistry, No.2, 6p (2003)
- [9]. Thangam. E. B. and Rajkumar. G. S, *Purification and characterization of alkaline protease from Alcaligenes faecalis*, Biochem 35, pp149-154 (2002)