

RECOVERY ENZIM PROTEASE DARI JEROAN IKAN TUNA DENGAN TEKNOLOGI ULTRAFILTRASI DAN REVERSE OSMOSIS

Recovery of Proteases from Tuna Viscera by Ultrafiltration and Reverse Osmosis

Bambang Riyanto*, Uju, Sofia Halimi

**Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Institut Pertanian Bogor**

Diterima 7 Mei 2010/Disetujui 16 Juli 2012

Abstract

Tuna viscera is highly potential as a source of protease enzyme. A wide enzyme applications requires an economical and efficient enzyme purification techniques and therefore can be applied in a large scale. The ultrafiltration (UF) process is one of the potential technology but has disadvantage due to fouling and concentration polarization. The studies on the operating trans-membrane pressure (TMP), the operating temperature, materials of the membrane and the molecular weight cut off (MWCO) of the membrane to reduce fouling and concentration polarization should be carried out. Reverse osmosis (RO) process at the next step was used to increase the concentration of the protease enzyme. This study was divided into several stages of preparation of protease enzyme, crude extract, pre-filtration, UF process, RO process and SDS-PAGE analysis. The tests included measurements of protein levels and activity of the protease enzyme. Optimum conditions for the purification of the UF polyacrylonitrile with MWCO 100 kDa was obtain on TMP 55 kPa and a temperature of 40 °C. Flux in both membrane was influenced by the TMP, temperature, the membrane material and MWCO. Rejection of protein and enzyme activity in both membrane is more influenced by the membrane material and MWCO of the membrane. Estimation of protein molecular weight after the RO from UF polyacrylonitrile with MWCO 100 kDa were 37.53; 27.77; 22.72 and 19.88 kDa while the specific activity of the protease was 1.38 unit/ mg.

Keywords: protease, tuna viscera, ultrafiltration, reverse osmosis.

Abstrak

Jeroan ikan tuna memiliki potensi yang sangat besar sebagai sumber enzim protease. Aplikasi enzim yang luas menuntut adanya teknik pemurnian enzim secara ekonomis, efisien, dan dapat diterapkan dalam skala besar. Ultrafiltrasi (UF) merupakan salah satu teknologi yang potensial, namun terkendala adanya fouling dan polarisasi konsentrasi. Kajian terhadap bahan penyusun membran, ukuran pori (MWCO) membran, tekanan transmembran (TMP) dan suhu operasi perlu dilakukan untuk mengurangi fouling dan polarisasi konsentrasi yang ada. Pemekatan menggunakan reverse osmosis (RO) pada tahap berikutnya berguna untuk meningkatkan kemurnian dari enzim protease yang dihasilkan. Tahapan penelitian meliputi pembuatan ekstrak kasar enzim protease, prefiltrasi, proses UF, proses RO dan analisis SDS-PAGE, sedangkan pengujian yang dilakukan meliputi pengukuran kadar protein dan aktivitas enzim protease. Kondisi optimum pemurnian diperoleh dengan UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa pada kondisi operasi TMP 55 kPa dan suhu 40 °C. Nilai fluks pada kedua membran dipengaruhi oleh TMP, suhu, MWCO serta material membran. Nilai rejeksi protein dan aktivitas enzim protease pada kedua membran lebih dipengaruhi oleh MWCO dan material membran. Estimasi bobot molekul protein setelah proses RO dari UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa adalah sebesar 37,53; 27,77; 22,72; dan 19,88 kDa serta mempunyai aktivitas spesifik enzim protease sebesar 1,38 unit/ mg.

Kata kunci: jeroan ikan tuna, protease, ultrafiltrasi, reverse osmosis.

*Korespondensi: Jln. Lingkar Akademik, Kampus IPB
Dramaga. Telp. +622518622915 Fax. +622518622916
e-mail: bambangriyanto.ipb@gmail.com

PENDAHULUAN

Industri pengolahan tuna menghasilkan limbah dalam jumlah besar, dimana sebanyak 25-30% merupakan limbah padat yang terdiri atas kepala, kulit dan jeroan, serta sebesar 30-35% merupakan limbah cair yang terdiri atas darah, konsentrat, dan minyak ikan tuna (Prasertsan *et al.* 1988). Jeroan ikan tuna juga memiliki potensi yang besar sebagai sumber enzim protease (Gildberg 1992; Guerard *et al.* 2002; Klomklao *et al.* 2005). Protease merupakan kelompok enzim yang sangat penting dalam industri enzim dunia saat ini dan tercatat hampir sekitar 50% dari total penjualan industri enzim diperoleh dari kelompok enzim ini (Rao *et al.* 1998). Aplikasi enzim yang luas menuntut adanya teknik pemurnian enzim yang ekonomis, efisien dan dapat diterapkan dalam skala besar.

Proses ultrafiltrasi (UF) merupakan salah satu proses pemisahan dan pemurnian protein serta berbagai bentuk makromolekul lainnya yang memiliki keunggulan retensi tinggi (Saxena *et al.* 2008). Li *et al.* (2006) berhasil memisahkan enzim protease dari ekstrak limpa tuna dengan teknologi membran UF ini, namun tercatat ada beberapa kekurangan yaitu timbulnya *fouling* dan konsentrasi polarisasi yang tinggi. *Fouling* dan konsentrasi polarisasi pada membran umumnya sangat dipengaruhi oleh karakteristik membran yaitu ukuran pori atau *molecular weight cut off* (MWCO) dan material (bahan penyusun) dari membran. *Fouling* dan konsentrasi polarisasi dapat juga dipengaruhi oleh karakteristik umpan dan kondisi operasi yang meliputi tekanan transmbran (TMP), suhu serta laju alir (Noordmand *et al.* 2002). Pemilihan karakteristik membran dan pengoperasian parameter yang tepat pada proses UF diharapkan akan dapat meningkatkan kinerja proses membran dalam memisahkan dan memurnikan enzim protease dari jeroan ikan tuna.

Tujuan penelitian ini adalah: (1) memurnikan ekstrak enzim protease dari jeroan ikan tuna dengan proses ultrafiltrasi

(UF) dan *reverse osmosis* (RO), (2) mempelajari pengaruh MWCO, material membran serta kondisi operasi (TMP dan suhu) terhadap fluks dan rejeksi dari membran UF, (3) serta menganalisis tingkat kemurnian dari enzim protease dan menentukan bobot molekul protein yang terkandung dalam ekstrak enzim protease yang dihasilkan.

MATERIAL DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan meliputi jeroan ikan tuna, es batu, bufer tris base, HCl, NaN_3 , CaCl_2 , akuades, dan NaOH, sedangkan bahan untuk pengujian meliputi selenium, heksana, H_2SO_4 , NaOH 40%, H_3BO_3 2%, *brom cresol green methyl red*, HCl 0,1 N, *bovine serum albumin* (BSA), *comassie brilliant blue G-250*, etanol 95%, asam fosfat 85%, tirosin, TCA (0,1 M), kasein, bufer Tris HCl (pH 8, 0,2 M), akuades steril, Na_2CO_3 , folin, akrilamid, bis-akrilamid, SDS, amonium persulfat, glisin, gliserol, 2-merkaptotanol, *bromofenol blue*, metanol, asam asetat, formalin, akuades bebas ion, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, AgNO_3 , N_2CO_3 , dan asam asetat glasial.

Alat-alat yang digunakan terdiri atas UF poliakrilonitril dengan MWCO 100 kDa, membran UF polisulfon dengan MWCO 50 kDa, membran *reverse osmosis*, termostat, nilon ukuran 225 mesh dan 375 mesh, timbangan digital, pH meter, pompa vakum, kertas saring, pengaduk magnetik dan pemanas listrik. Peralatan untuk pengujian meliputi oven, tanur, desikator, labu Kjeldahl, pembakar (destruksi), destilator, sokhlet (kondensor dan labu lemak), vorteks, sentrifuge, inkubator, neraca analitik, spektrofotometer, tabung reaksi dan peralatan gelas lainnya.

Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dalam beberapa tahapan yang meliputi preparasi dan analisis proksimat jeroan ikan tuna (AOAC 2007), pembuatan ekstrak enzim protease dari jeroan ikan tuna dengan penambahan bufer Tris HCl (pH 8,0; 0,02 % NaN_3 ; 5 mM CaCl_2)

yang mengacu pada penelitian Li *et al.* (2006) dan prefiltrasi menggunakan nilon ukuran 225 mesh dan 375 mesh serta penyaringan vakum. Tahapan selanjutnya adalah karakterisasi membran berupa penentuan tingkat permeabilitas (Uju *et al.* 2009), kemudian dilanjutkan dengan proses filtrasi dengan membran ultrafiltrasi dan penentuan waktu tunak (*steady state*). Variabel bebas yang diteliti meliputi MWCO (membran UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa dan UF polisulfon MWCO 50 kDa), TMP (28 kPa-280 kPa) dan suhu (30 °C, 35 °C dan 40 °C). Variabel tak bebas yang diamati meliputi fluks dan rejeksi yang terdiri dari pengukuran kadar protein terlarut dan aktivitas enzim protease. Tahapan selanjutnya adalah proses pemekatan menggunakan membran reverse osmosis. Analisis meliputi pengukuran kadar protein terlarut (Bradford 1976) serta aktivitas enzim protease (Walter 1988). Tahapan terakhir adalah analisis kemurnian dan penentuan bobot molekul protein menggunakan SDS-PAGE (Laemmli 1970). Data yang diperoleh diolah dan dimodelkan menggunakan Microsoft Excel 2007.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Komposisi Kimia Jeroan Ikan Tuna

Hasil analisis komposisi kimia terhadap bahan baku jeroan ikan tuna yang digunakan adalah kadar air $75,42 \pm 0,35\%$; kadar abu $1,44 \pm 0,06\%$; kadar protein $17,11 \pm 0,18\%$; dan kadar lemak $1,63 \pm 0,30\%$. Hasil dari proses ekstraksi jeroan ikan tuna dengan penambahan bufer tris HCl (pH 8,0; 0,02% NaN_3 ; 5 mM CaCl_2) memperlihatkan hasil ekstrak enzim protease yang masih keruh dan banyak bahan pengotor lainnya yaitu remah daging dan lemak. Proses prefiltrasi menggunakan nilon ukuran 225 mesh dan 375 mesh menghasilkan ekstrak enzim protease yang lebih bersih dari bahan pengotor tersebut, sedangkan setelah dilakukan proses penyaringan vakum memperlihatkan bahwa ekstrak enzim protease yang dihasilkan makin terlihat lebih jernih.

Permeabilitas Membran

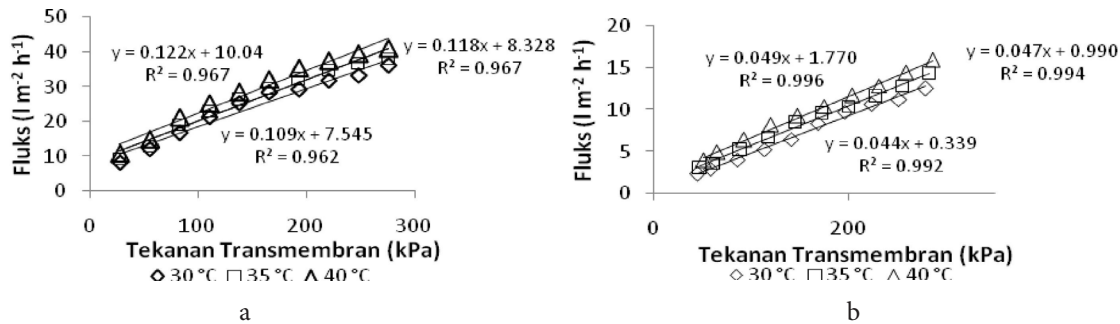
Karakteristik membran ditentukan dengan penentuan tingkat permeabilitas. Permeabilitas merupakan kemampuan membran mengalirkan air destilasi melalui pori yang terdapat didalamnya. Sifat permeabilitas membran dapat dilihat dengan mengukur nilai fluksnya. Hasil pengukuran menunjukkan nilai fluks membran UF polisulfon MWCO 50 kDa dan UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa meningkat secara linier dengan meningkatnya nilai TMP dan suhu. Nilai permeabilitas membran poliakrilonitril MWCO 100 kDa lebih tinggi dibandingkan dengan membran polisulfon MWCO 50 kDa. Hasil selengkapnya pengaruh TMP dan suhu umpan air destilasi terhadap fluks membran pada membran UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa dan polisulfon MWCO 50 kDa disajikan pada Gambar 1.

Waktu Tunak (*Steady State*) Fluks

Hubungan antara fluks dengan waktu operasi pada membran UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa dan UF polisulfon MWCO 50 kDa menunjukkan nilai fluks pada proses UF dengan membran UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa pada awal proses filtrasi mengalami penurunan yang tajam namun setelah 5 menit fluks mendekati konstan. Fluks pada membran UF polisulfon MWCO 50 kDa tidak memperlihatkan terjadinya penurunan yang tajam diawal proses dan cenderung terus konstan sepanjang proses. Penurunan fluks yang tajam pada beberapa menit pertama membran UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa diduga disebabkan oleh terjadinya konsentrasi polarisasi pada membran tersebut (Marshall *et al.* 1993). Hasil selengkapnya hubungan antara fluks dengan waktu pada membran UF polisulfon MWCO 50 kDa dengan UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa disajikan pada Gambar 2.

Pengaruh Tekanan Transmembran dan Suhu terhadap Fluks

Fluks adalah jumlah volume permeat



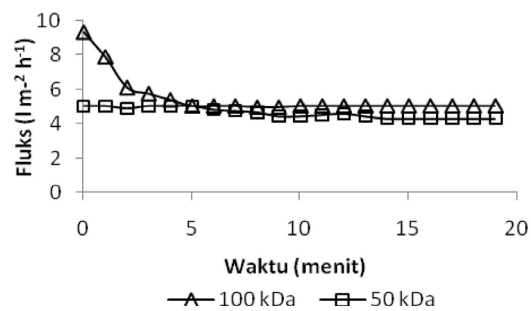
Gambar 1 Pengaruh TMP dan suhu umpan air distilasi terhadap nilai fluks pada membran UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa (a) dan polisulfon MWCO 50 kDa (b).

pada operasi membran per satuan waktu dan luas permukaan membran. Hasil pengukuran nilai fluks permeat akibat pengaruh TMP dan suhu memperlihatkan terjadinya peningkatan nilai fluks seiring dengan peningkatan nilai TMP dan suhu. Pola perubahan nilai fluks permeat pada membran UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa dan polisulfon MWCO 50 kDa menunjukkan bahwa TMP tidak berpengaruh terhadap nilai fluks ketika TMP secara berturut-turut lebih besar dari 110 dan 170 kPa, hal ini menunjukkan bahwa pada kondisi tersebut diduga telah terjadi *fouling* (Ghosh & Cui 2000). Nilai fluks permeat pada membran UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa dan polisulfon MWCO 50 kDa pada TMP dan suhu yang berbeda selengkapnya disajikan pada Gambar 3.

Pengaruh Tekanan Transmembran dan Suhu terhadap Nilai Rejeksi

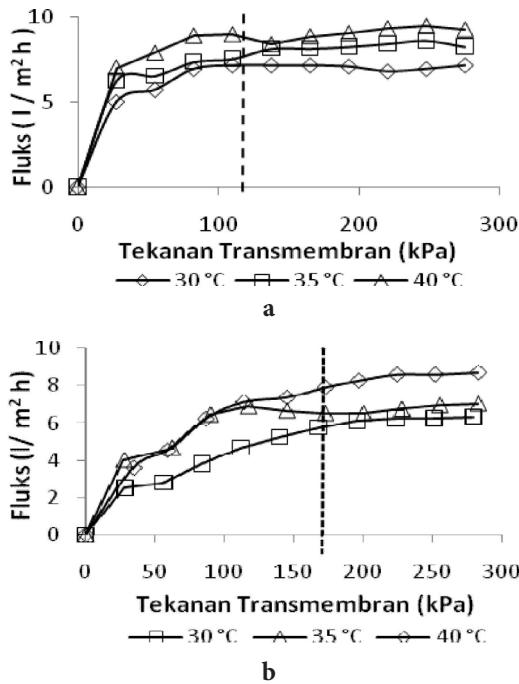
Rejeksi adalah kemampuan suatu membran untuk menahan partikel berukuran tertentu. Pola perubahan nilai rejeksi kadar protein terlarut dan aktivitas enzim protease pada membran UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa dan polisulfon MWCO 50 kDa terlihat cenderung berfluktuatif. Hal ini menunjukkan bahwa TMP dan suhu tidak berpengaruh terhadap besarnya nilai rejeksi kadar protein terlarut maupun aktivitas enzim protease. Kecenderungan ini dapat juga dipengaruhi oleh faktor-faktor lain, yang meliputi MWCO dan berat zat terlarut (Mulder 1996).

Nilai rejeksi kadar protein terlarut dan

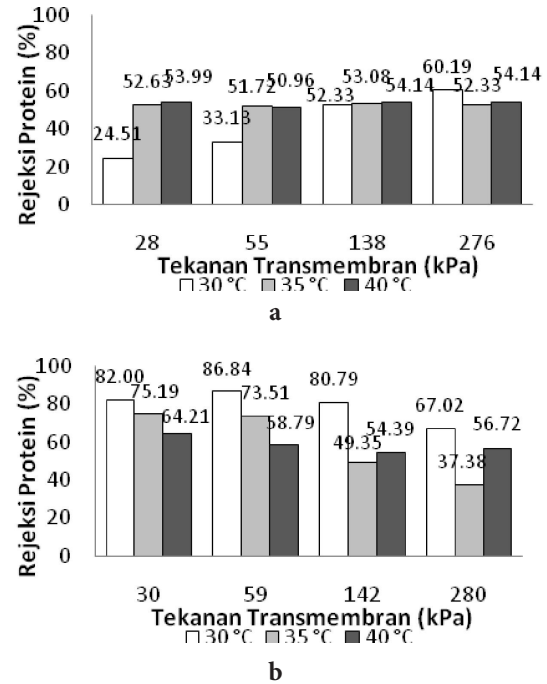


Gambar 2 Hubungan antara fluks dengan waktu pada membran membran pada membran UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa dan polisulfon MWCO 50 kDa pada suhu 30 °C.

aktivitas enzim protease pada membran UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa terlihat juga lebih rendah dibandingkan dengan membran UF polisulfon MWCO 50 kDa. Hal ini diduga jumlah protein maupun enzim protease yang ada lebih banyak mencemari pori membran, terutama pada membran berukuran pori lebih besar (Marshall *et al.* 1993). Cheryan (1998) menyatakan bahwa material membran yang berbeda dengan MWCO yang sama akan dapat menghasilkan rejeksi yang berbeda. Hal ini diduga disebabkan adanya pengaruh interaksi antara larutan umpan dan membran. Pola perubahan nilai rejeksi kadar protein terlarut dan aktivitas enzim protease pada permeat yang disebabkan oleh perubahan TMP dan suhu pada membran UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa dan polisulfon MWCO 50 kDa selengkapnya disajikan pada Gambar 4



Gambar 3 Pola perubahan nilai fluks permeal yang disebabkan oleh perubahan TMP dan suhu pada membran UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa (a) dan polisulfon MWCO 50 kDa (b).



Gambar 4 Pola perubahan nilai rejeksi kadar protein terlarut pada permeal yang disebabkan oleh perubahan TMP dan suhu pada membran UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa (a) dan polisulfon MWCO 50 kDa (b).

dan Gambar 5.

Kadar Protein dan Aktivitas Enzim pada Setiap Tahapan Filtrasi serta Penggunaan RO sebagai Diafiltrasi

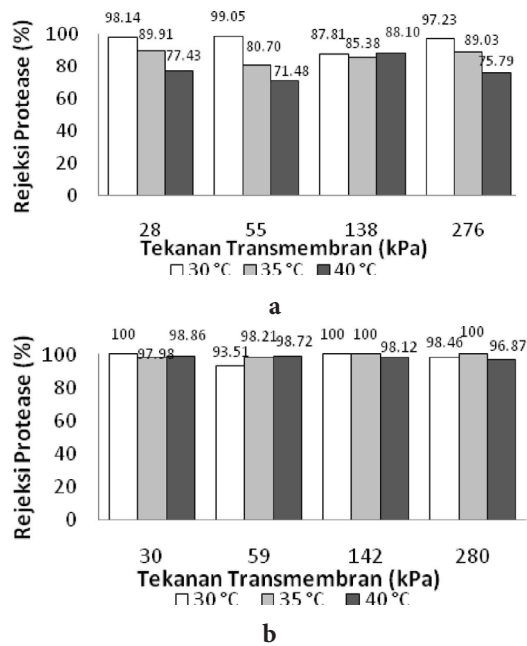
Hasil pengukuran kadar protein dan aktivitas enzim protease memperlihatkan nilai yang cenderung menurun setelah proses ultrafiltrasi, walaupun ukuran pori dari membran UF lebih besar daripada ukuran molekul protein, sekitar setengah dari keseluruhan protein masih ditahan oleh membran ini. Tertahannya protein ini diduga disebabkan oleh agregasi protein yang muncul pada larutan atau pada mulut pori di bawah kondisi dinamik atau konvektif (Tracey dan Davis 1994) dan formasi dari lapisan *fouling* pada permukaan membran. Rembesan dari permukaan bebas ini masih memungkinkan molekul yang lebih kecil untuk lewat walaupun agregasi protein dan endapan partikel besar lainnya pada permukaan membran membentuk lapisan *fouling*, oleh karena itu enzim dengan bobot

molekul yang kecil (24 kDa untuk tripsin dan 27 kDa untuk kemotripsin) menjaga struktur stabilnya pada bufer Tris HCl yang digunakan pada penelitian ini. Peningkatan TMP dan ukuran pori membran dapat menyebabkan penurunan aktivitas enzim protease pada permeal yang dihasilkan (Li *et al.* 2008).

Kadar protein dan aktivitas enzim protease setelah proses RO memperlihatkan adanya peningkatan pada aktivitas spesifik enzim protease dengan retentat membran RO dari permeal UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa dan UF polisulfon MWCO 50 kDa. Hal ini menunjukkan bahwa pemekatan menggunakan RO dapat efektif untuk digunakan dalam pemekatan enzim protease.

Penentuan Tingkat Kemurnian Enzim Protease dengan SDS-PAGE

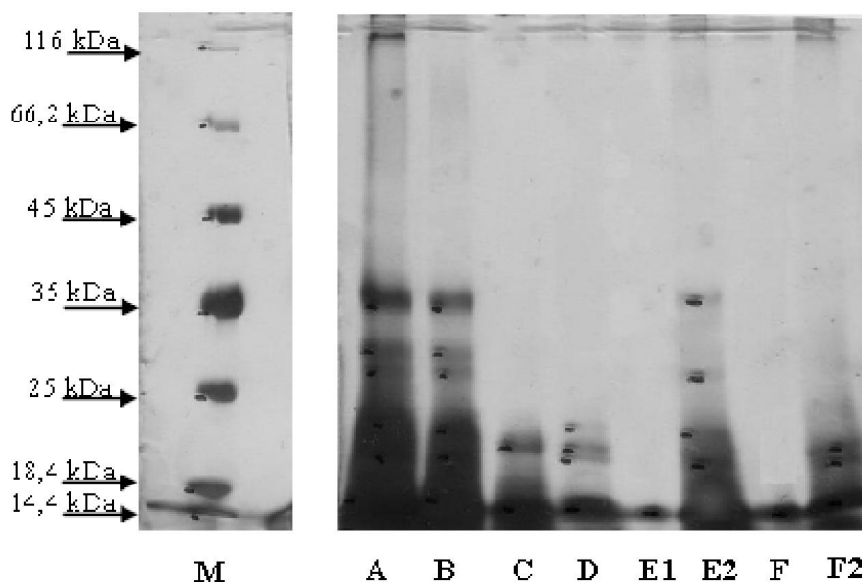
Elektroforesis gel poliakrilamida sodium dodesil sulfat (SDS-PAGE) digunakan untuk mengetahui kemurnian dan estimasi bobot molekul protein dari enzim protease. Hasil



Gambar 5 Pola perubahan nilai rejeksi aktivitas enzim protease pada permeat yang disebabkan oleh perubahan TMP dan suhu pada membran UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa (a) dan polisulfon MWCO 50 kDa (b).

analisis SDS-PAGE 10% menunjukkan profil pita protein enzim protease dari jeroan ikan tuna. Penyaringan dengan kertas saring meloloskan protein sebesar 100% dan hanya memisahkan pengotor berupa remah daging dan lemak. Enzim protease murni berhasil dipisahkan dengan UF dan dipekatkan dengan RO, akan tetapi RO tidak mampu merejeksi protein sebesar 100%, hal ini dibuktikan dengan permeat RO yang masih mengandung protein. Profil pita protein enzim protease dari jeroan ikan tuna hasil dari analisis SDS-PAGE 10% disajikan pada Gambar 6, sedangkan estimasi bobot molekul protein enzim protease dari jeroan ikan tuna hasil SDS-PAGE 10% disajikan pada Tabel 1.

Pemurnian dengan membran UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa kemudian dipekatkan dengan RO menghasilkan protease dengan bobot molekul 37,53; 27,77; 22,72; dan 19,88 kDa. Pemurnian menggunakan membran UF polisulfon MWCO 50 kDa kemudian dipekatkan dengan



Gambar 6 Profil pita protein enzim protease dari jeroan ikan tuna hasil dari SDS-PAGE 10% pada (A) Ekstrak kasar enzim protease dari jeroan ikan tuna, (B) Ekstrak enzim protease hasil penyaringan nilon ukuran 225 mesh dan 375 mesh serta penyaringan vakum, (C) Permeat membran UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa, (D) Permeat membran UF polisulfon MWCO 50 kDa, (E1) Permeat membran RO dari UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa, (E2) Retentat membran RO dari UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa, (F1) Permeat membran RO dari UF polisulfon MWCO 50 kDa, (F2) Retentat membran RO dari UF polisulfon MWCO 50 kDa, (M) Marker Unstained

Tabel 1 Kadar protein terlarut dan aktivitas protease pada ekstrak protease jeroan tuna

Sampel (Kode)	Kadar Protein (mg/ ml)	Aktivitas Enzim Protease (unit/ ml)	Aktivitas Spesifik Enzim Protease (unit/ mg)
Ekstrak enzim protease kasar (A)	0,42	0,75	1,77
Ekstrak enzim protease hasil penyaringan nilon ukuran 225 mesh dan 375 mesh serta penyaringan vakum (B)	0,15	0,22	1,42
Permeat membran UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa (C)	0,14	0,18	1,29
Permeat membran UF polisulfon MWCO 50 kDa (D)	0,30	0,16	0,53
Permeat membran RO dari UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa (E1)	0,03	0,01	0,25
Retentat membran RO dari UF poliakrilonitril MWCO 100 kDa (E2)	0,13	0,18	1,38
Permeat membran RO dari UF polisulfon MWCO 50 kDa (F1)	0,02	0,02	0,90
Retentat membran RO dari UF polisulfon MWCO 50 kDa (F2)	0,29	0,16	0,55

RO menghasilkan protease dengan bobot molekul 21,25; 19,88; dan 16,82 kDa. Li *et al.* (2006) telah berhasil memurnikan protease dari limpa ikan tuna dengan teknik UF dan diafiltrasi UF 30 kDa. Ekstrak protease yang diperoleh dari hasil penelitian memiliki bobot molekul 25, 80 kDa. Li *et al.* (2008) melaporkan bahwa estimasi bobot molekul dari tripsin dan kemotripsin dari limpa tuna yellowfin berturut-turut adalah 24 dan 27 kDa.

Enzim jeroan ikan tuna secara umum terdiri atas pepsin (pada bagian *gastric mucosa*), dan tripsin serta kemotripsin (pada bagian pankreas, *pyloric caeca*, dan usus) (Simpson 2000). Protease yang dihasilkan dari jeroan ikan tuna memiliki sifat unik untuk berbagai aplikasi industri seperti deterjen (Esposito *et al.* 2009; Li *et al.* 2010), makanan diantaranya digunakan untuk meningkatkan kualitas glutenin pada tepung dan coklat (Kara *et al.* 2005), meningkatkan volume spesifik dari brown rice bread (Renzetti dan Arendt 2009), farmasi, kulit dan industri tekstil atau

kain sutra (Haard 1992).

KESIMPULAN

Enzim protease dari jeroan ikan tuna dapat dimurnikan melalui proses UF dan RO. Teknik pemurnian enzim dengan metode UF bertingkat serta karakteristik bahan UF untuk enzim protease yang dihasilkan perlu dikembangkan untuk meningkatkan hasil yang lebih baik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional dan Direktorat Pendidikan Diniyah dan Pondok Pesantren Departemen Agama yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

[AOAC] Association of Official Analytical and Chemistry. 2007. Official Methods of Analysis. 18th Ed. Maylan: Association of Official Analytical and Chemists Inc.

- Bradford. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Journal Analytical Biochemistry* 56(7): 248-254.
- Cheryan M. 1998. *Ultrafiltration and Microfiltration Handbook*. Technomic Publ. New Holland Avenue.
- Esposito TS, Amaral IPG, Buarque DS, Oliveira GB, Carvalho LB, Bezerra RS. 2009. Fish processing waste as a source of alkaline proteases for laundry detergent. *Food Chemistry* 112: 125-130.
- Gildberg A. 1992. Recovery of proteinase and protein hydrolysate from fish viscera. *Bioresource Technology* 39: 271-276.
- Ghosh R, Cui ZF. 2000. Simulation study of the fractionation of proteins using ultrafiltration. *Journal of Membrane Science* 180: 29-36.
- Guerard F, Guimas L, Binet A. 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 19-20: 489-498.
- Haard NF. 1992. A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *Journal of Aquatic Food Products Technology* 1: 17-35.
- Kara M, Sivri D, Koksel H. 2005. Effects of high protease-activity flours and commercial proteases on cookie quality. *Food Research International* 8: 479-486.
- Klomkloa S, Benjakul S, Visessanguan W, Simpson BK, Kishimura H. 2005. Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two phase system. *Process Biochemistry* 40: 3061-3067.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Li ZY, Youravong W, H-Kittikun A. 2006. Separation of proteases from yellowfin tuna spleen by ultrafiltration. *Bioresource Technology* 97: 2364-2370.
- Li ZY, Youravong W, H-Kittikun A. 2008. Separation of proteases from yellowfin tuna spleen extract by ultrafiltration: effect of hydrodynamics and gas sparging on flux enhancement and selectivity. *Journal of Membrane Science* 311: 104-111.
- Li ZY, Youravong W, H-Kittikun A. 2010. Protein hydrolysis by protease isolated from tuna spleen by membrane filtration: a comparative study with commercial proteases. *Journal of Food Science and Technology* 43: 166-172.
- Marshall AD, Munro PA, Tragardh G. 1993. The effect of protein fouling in microfiltration and ultrafiltration on permeate flux, protein retention and selectivity: A literature review. *Desalination* 91: 65-108.
- Mulder M. 1996. *Basic Principles of Membrane Technology*. Nederland: Kluwer Academic Publisher.
- Noordman TR, Ketelaar TH, Donkers F, Wesselingh JA. 2002. Concentration and desalination of protein solutions by ultrafiltration. *Chemical Engineering Science* 57: 693-703.
- Prasertsan P, Wuttijumnong P, Sophanodora P, Choorit W. 1988. Seafood processing industries within Songkhla-Hat Yai region: the survey of basic data emphasis on wastes. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 10: 447-451.
- Rao MB, Tranksale AM, Ghatge MS, Desphande VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial protease. *Journal of Microbiology and Molecular Biology Review* 62: 597-635.
- Renzetti S, Arendt EK. 2009. Effect of protease treatment on the baking quality of brown rice bread: From textural and rheological properties to biochemistry and microstructure. *Journal of Cereal Science* 50: 22-28.
- Saxena A, Tripathi BP, Kumar M, Shahi VK. 2008. Membran-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview. *Advances in Colloid and Interface Science* 145: 1-22.
- Simpson BK. 2000. Digestive proteinases from marine animals. In: Haard NF, Simpson

- BK (Eds), *Seafood enzymes: utilization and influence on postharvest seafood quality*. New York: Marcel Dekker.
- Tracey EM, Davis RH. 1994. Protein fouling of track-etched polycarbonate microfiltration membrane. *Journal of Colloid and Interface Science* 167: 104-116.
- Uju, Nurhayati T, Ibrahim B, Trilaksani W, Siburian M. 2009. Karakterisasi dan recovery protein dari air cucian minced fish dengan membran reverse osmosis. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 12(2): 115-127.
- Walter HE. 1988. Methods with Haemoglobin, Casein and Azool as Substrate. Di dalam: Bergmeter HU, Bergmeyer J and Garbi M. *Methods of Enzymatic Analysis*. 3rd Ed. Jerman: Weinheim.