รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE (Angiotensin-I Converting Enzyme) จากโปรตีนปลานิล ด้วยปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์

Production of Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptides from Tilapia Protein using Enzymatic Membrane Reactor

นางสาวนรินทร์ เจริญพันธ์
นางสาววิยดา กวานเหียน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

รหัสโครงการ 222215

สัญญาเลขที่ 37/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE (Angiotensin-I Converting Enzyme) จากโปรตีนปลานิล ด้วยปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์

Production of Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptides from Tilapia Protein using Enzymatic Membrane Reactor

นางสาวนรินทร์ เจริญพันธ์
คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา
นางสาววิยดา กวานเหียน
สำนักวิชาสหเวชศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์
มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 37/2559

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 37/2559)

บทคัดย่อ

ระบบปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์หมุนเวียนแบบต่อเนื่อง (continuous enzymatic membrane reactor, CEMR) เป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับกระบวนการผลิตเพปไทด์ ซึ่งเป็นระบบที่มีประสิทธิภาพสูงกว่าระบบปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์แบบกะ ในการศึกษาครั้งนี้ระบบ CEMR ถูกนำมาใช้ในการผลิตเพปไทด์จากเนื้อปลานิลที่มีกิจกรรมในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ใช้เมมเบรนขนาด 1 กิโลดาลตัน เป็นตัวกรองสารละลายโปรตีนที่ผ่านการย่อยในถังปฏิกรณ์ ภายใต้สภาวะควบคุมที่ความดันขับ 1.3 บาร์ ความเร็วตามขวาง 1.5 เมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และความเป็นกรดด่าง 8 โดยศึกษารูปแบบที่เหมาะสมของการเติมสารตั้งต้นในถังปฏิกรณ์ ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ และผลของการไหลแบบ 2 สถานะ (two-phase flow) ของก๊าซของเหลว (gas-liquid) หรือ gas-liquid two-phase flow ต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยระบบ CEMR พบว่า รูปแบบ A คือการเติมสารตั้งต้นอย่างต่อเนื่องเข้าไปในระบบให้เท่ากับการไหลออกของเพอมิเอท เหมาะสมที่สุด เนื่องจากให้ค่าฟลักซ์ของเพอมิเอท และค่ากิจกรรมในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูง ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ 15 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน ให้ค่ากิจกรรมในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ค่าคอนเวอร์ชัน และค่าผลิตภาพของเพปไทด์สูง นอกจากนี้การใช้ gas-liquid two-phase flow ด้วยค่า gas injection factor เท่ากับ 0.35 ให้ค่าฟลักซ์ของเพอมิเอท ค่ากิจกรรมในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับที่ระบบที่ไม่เติมก๊าซ ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมของระบบ CEMR คือการเติมสารตั้งต้นอย่างต่อเนื่องเข้าไปในระบบให้เท่ากับการไหลออกของเพอมิเอท ด้วยค่า gas injection factor เท่ากับ 0.35 ความดันขับ 1.3 บาร์ ความเร็วตามขวาง 1.5 เมตรต่อวินาที ความเข้มข้นของเอนไซม์ 15 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน ที่เวลาในการดำเนินการ 720 นาที ให้ค่าคอนเวอร์ชัน และผลิตภาพของกิจกรรมในการยับยั้งเอนไซม์ ACE เท่ากับร้อยละ 400 และ 3.40 มิลลิกรัมของเพปไทด์ที่มีกิจกรรมในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ต่อยูนิตของเอนไซม์ การติดตามการย่อยของเพปไทด์ที่ผลิตได้ในระบบจำลองทางเดินอาหาร โดยเปรียบเทียบตัวอย่างเพปไทด์ที่ไม่ผ่านการกรอง เพปไทด์ในรีเทนเทท และเพปไทด์ในเพอมิเอท พบว่า เพปไทด์ในเพอมิเอทให้ค่ากิจกรรมในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงที่สุดหลังจากผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เพปซิน และแพนครีเอติน ดังนั้นการใช้ระบบ CEMR เป็นระบบหนึ่งที่สามารถผลิตเพปไทด์ที่มีกิจกรรมในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Abstract

The continuous enzymatic membrane reactor (CEMR) is the system of alternative for hydrolysis process involving proteins which has higher productivities and more uniform products than batch-type reactors. In this study, the CEMR was employed to produce ACE inhibitory peptides from tilapia protein. A hollow fiber membrane (MWCO 1 kDa) was equipped with stirred reactor tank. The enzymatic hydrolysis and separation of peptides conditions were performed at constant transmembrane pressure (1.3 bar), cross flow velocity (1.5 m s^{-1}), temperature (50°C) and pH (8). The investigations of the effect of substrate feeding pattern, enzyme concentration, and gas-liquid two-phase flow on performance of CEMR were studied. It was found that the substrate feeding pattern A which was the most suitable for producing of ACE inhibitory peptides because it gave constant flux and high ACE inhibitory activity. The enzyme concentration at 15 unit g^{-1}protein gave high ACE inhibitory activity conversion and productivity. Addition of gas sparging into the membrane module led to increase permeate flux compared with that without gas sparging. In addition, gas injection factor up to 0.35 gave the best improvement of permeate flux, and ACE inhibitory activity of permeate was increased. Operating using substrate feeding pattern A, at ε = 0.35, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, and enzyme concentration = 15 unit g^{-1}protein at 720 min of operation, ACE inhibitory activity conversion and productivity were 400 % and 3.40 mg ACE inhibitory peptides $unit^{-1}$ of enzyme. Simulated gastrointestinal digestion on the ACE inhibitory activity of peptides in pre-hydrolysis, retentate and permeate were investigated. The results showed that peptides in permeate gave the highest ACE inhibitory activity when digested with pepsin and pancreatin. This result indicates that CBEMR was successfully employed to produce ACE inhibitory peptides.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อ	iv
สารบัญเรื่อง (Table of Contents)	vi
สารบัญตาราง (List of tables)	vii
สารบัญภาพ (List of illustrations)	viii
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)	xii
บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	1
ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
อุปกรณ์และวิธีการ	5
สารเคมีและอุปกรณ์	5
วิธีการ	7
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	17
สรุปและข้อเสนอแนะ	36
สรุป	36
ข้อเสนอแนะ	37
ผลผลิต	38
รายงานการเงิน	39
บรรณานุกรม	40
ประวัตินักวิจัยและคณะ	45

สารบัญตาราง (List of tables)

Table		หน้า
1	Membrane fouling of UF membrane in CEMR at TMP of 1.3 bar and CFV of 1.5 m s^{-1}as varying substrate feeding pattern	19
2	Effect of substrate feeding pattern on average of T_p and bioactive activities during CEMR system (S_0 = 1 % w/v, E_0 = 20 unit g^{-1}protein, pre-hydrolysis time = 90 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL)	20
3	Membrane fouling of UF membrane in CEMR at TMP of 1.3 bar and CFV of 1.5 m s^{-1}as varying enzyme concentration	24
4	Effect of enzyme concentration on average of T_p and bioactive activities during CEMR system using substrate feeding pattern A (S_0 = 1 % w/v, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, time = 720 min, initial volume = 550 mL)	26
5	Membrane fouling of UF membrane in CEMR at TMP of 1.3 bar and CFV of 1.5 m s^{-1}as varying gas injection factor	29
6	Effect of gas-liquid two-phase flow on average of T_p and bioactive activities during CEMR system using substrate feeding pattern A (S_0 = 1 % w/v, E_0 = 15 unit.g^{-1}protein, pre-hydrolysis time = 120 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL)	30

สารบัญภาพ (List of illustrations)

Figure		หน้า
1	Schematic diagram of CEMR system	8
2	Effect of substrate feeding pattern on permeate flux during CEMR system (S_0 = 1 % w/v, E_0 = 20 unit g^{-1}protein, pre-hydrolysis time = 90 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL) (●,◆,▲ and ■; permeate flux of pattern A, B, C and D, respectively)	18
3	Effect of substrate feeding pattern on enzyme activity during CEMR system (S_0 = 1 % w/v, E_0 = 20 unit g^{-1}protein, pre-hydrolysis time = 90 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL) (○, ◆, △ and ■; permeate flux of pattern A, B, C and D, respectively)	20
4	Effect of substrate feeding pattern on protein conversion and productivity of protein during CEMR system (S_0 = 1 % w/v, E_0 = 20 unit g^{-1}protein, pre-hydrolysis time = 90 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL) (○,◇, △ and □; conversion of pattern A, B, C and D and ●, ◆, ▲ and ■; productivity of pattern A, B, C and D, respectively)	21
5	Effect of substrate feeding pattern on ACE inhibitory capacity conversion and productivity of ACE peptides during CEMR system (S_0 = 1 % w/v, E_0 = 20 unit g^{-1}protein, pre-hydrolysis time = 90 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL) (○,◇, △ and □; conversion of pattern A, B, C and D and ●, ◆, ▲ and ■; productivity of pattern A, B, C and D, respectively)	22
6	Effect of enzyme concentration on degree of hydrolysis (S_0 = 1 % w/v, temperature = 50 ^{0}C and ■, ▲, ◆, and ●; E = 5, 10, 15, and 20 unit g^{-1}protein, respectively)	23
7	Effect of enzyme concentration on permeate flux during CEMR system using substrate feeding pattern A (S_0 = 1 % w/v, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL) (▲,◇, and ●; permeate flux of E (pre-hydrolysis time) = 10 unit g^{-1}protein (150 min), 15 unit g^{-1}protein (120 min), and 20 unit g^{-1}protein (90 min), respectively)	24

สารบัญภาพ (List of illustrations) ต่อ

Figure		หน้า
8	Effect of enzyme concentration on enzyme activity during CEMR system using substrate feeding pattern A (S_0 = 1 % w/v, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL) (▲, ◆, and ●; enzyme activity at E_0 (pre-hydrolysis time) = 10 unit g^{-1}protein (150 min), 15 unit g^{1}protein (120 min), and 20 unit g^{-1}protein (90 min), respectively)	25
9	**9** Effect of enzyme concentration on protein conversion and productivity of protein during CEMR system using substrate feeding pattern A (S_0 = 1 % w/v, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL) (△, ◇, and ○; conversion and ▲, ◆, and ●; productivity at E_0 (pre-hydrolysis time) = 10 unit g^{-1}protein (150 min), 15 unit g^{-1}protein (120 min), and 20 unit g^{-1}protein (90 min), respectively)	27
10	Effect of enzyme concentration on ACE inhibitory conversion and productivity of ACE inhibitory peptides during CEMR system using substrate feeding pattern A (S_0 = 1 % w/v, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.3 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL) (△, ◇, and ○; conversion and ▲, ◆, and ●; productivity at E_0 (pre-hydrolysis time) = 10 unit g^{-1}protein (150 min), 15 unit g^{-1}protein (120 min), and 20 unit g^{-1}protein (90 min), respectively)	27
11	Effect of gas-liquid two-phase flow on permeate flux during CEMR system using substrate feeding pattern A (E_0 = 15 unit g^{-1}protein, S_0 = 1 % w/v, pre-hydrolysis time = 120 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL) (○, ◆, △ and ■; permeate flux of ε = 0, 0.25, 0.35 and 0.5, respectively)	28
12	Effect of gas-liquid two-phase flow on enzyme activity during CEMR system using substrate feeding pattern A (E_0 = 15 unit g^{-1}protein, S_0 = 1 % w/v, pre-hydrolysis time = 120 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL) (○, ◆, △ and ■; permeate flux of ε = 0, 0.25, 0.35 and 0.5, respectively)	30

สารบัญภาพ (List of illustrations) ต่อ

Figure		หน้า
13	Effect of gas-liquid two-phase flow on protein conversion and productivity of protein during CEMR system using substrate feeding pattern A (E_0 = 15 unit g^{-1}protein, S_0 = 1 % w/v, pre-hydrolysis time = 120 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL) (○, ◇, △ and □; conversion of ε = 0, 0.25, 0.35 and 0.5 and ●, ◆, ▲ and ■; productivity of ε = 0, 0.25, 0.35 and 0.5, respectively)	31
14	Effect of gas-liquid two-phase flow on ACE inhibitory capacity conversion and productivity of ACE inhibitory peptides during CEMR system using substrate feeding pattern A (E_0 = 15 unit g^{-1}protein, S_0 = 1 % w/v, pre-hydrolysis time = 120 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL) (○, ◇, △ and □; conversion of ε = 0, 0.25, 0.35 and 0.5 and ●, ◆, ▲ and ■; productivity of ε = 0, 0.25, 0.35 and 0.5, respectively)	32
15	Effect of simulated gastrointestinal digestion on the ACE inhibitory activity of peptides in pre-hydrolysis (E_0 = 15 unit g^{-1}protein, S_0 = 1 % w/v, pre-hydrolysis time = 120 min, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL). Pre-hudrolysis: The peptide solutions were incubated in buffer solutions (HCl and potassium chloride buffer). Pepsin: The peptide solutions were incubated with pepsin (20 ug/ml) solution for 4 hrs at 37°C. Pensin + panceatin: The peptide solutions were successively digested with pepsin for 4 hrs. They were further incubated in pancreatin solution for another 4 hrs at 37°C. The ACE inhibitory activity are expressed as mean ± standard deviation (n = 3).	33
16	Effect of simulated gastrointestinal digestion on the ACE inhibitory activity of peptides in retentate (E_0 = 15 unit g^{-1}protein, S_0 = 1 % w/v, pre-hydrolysis time = 120 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, initial volume = 550 mL, and ε = 0.35). Retentate: The peptide solutions were incubated in buffer solutions (HCl and potassium chloride buffer). Pepsin: The peptide solutions were incubated with pepsin (20 ug/ml) solution for 4 hrs at 37°C. Pensin + panceatin: The peptide solutions were successively digested with	34

สารบัญภาพ (List of illustrations) ต่อ

Figure		หน้า
	pepsin for 4 hrs. They were further incubated in pancreatin solution for another 4 hrs at 37°C. The ACE inhibitory activity are expressed as mean ± standard deviation (n = 3).	
17	Effect of simulated gastrointestinal digestion on the ACE inhibitory activity of peptides in permeate (E_0 = 15 unit g^{-1}protein, S_0 = 1 % w/v, pre-hydrolysis time = 120 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, initial volume = 550 mL, and ε = 0.35). Permeate: The peptide solutions were incubated in buffer solutions (HCl and potassium chloride buffer). Pepsin: The peptide solutions were incubated with pepsin (20 ug/ml) solution for 4 hrs at 37°C. Pensin + panceatin: The peptide solutions were successively digested with pepsin for 4 hrs. They were further incubated in pancreatin solution for another 4 hrs at 37°C. The ACE inhibitory activity are expressed as mean ± standard deviation (n = 3).	35

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

A_f	ความสามารถของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ในสารละลายเริ่มต้น (μg captopril g^{-1} protein)
Angiotensin Converting enzyme	ACE
A_p	ความสามารถของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ในเพอมิเอทที่เวลาใดๆ (*μ*g captopril g^{-1} protein)
C_f	ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายเริ่มต้น (mg mL^{-1})
Concentration polarization	คอนเซ็นเตรชั่นโพลาไรเซชั่น
Conversion	ค่าคอนเวอร์ชั่น
C_p	ความเข้มข้นของโปรตีนในเพอมิเอทที่เวลาใดๆ (mg mL^{-1})
Crossflow velocity (CFV)	ความเร็วตามขวาง (m s^{-1})
Degree of hydrolysis (DH)	ระดับการย่อย
Enzyme concentration	ความเข้มข้นของเอนไซม์ (unit mL^{-1} of protein)
Fouling	ฟาวลิ่ง
F_t	อัตราการไหลของเพอมิเอทที่เวลาการย่อยใดๆ (mL min^{-1})
Gas-liquid two-phase flow	การไหลแบบ 2 สถานะของก๊าซของเหลว
Molecular weight cut-off	ขนาด MWCO
Permeate	เพอมิเอท
Permeate flux (*J*)	ฟลักซ์ของเพอมิเอท (m s^{-1})
Productivity	ผลิตภาพ
Protein conversion$_t$	ค่าโปรตีนคอนเวอร์ชั่นที่เวลาใดๆ
Protein transmission (T_p)	ค่าการส่งผ่านโปรตีน
Recovery	ค่ารีคัฟเวอรี่
Retentate	รีเทนเทท
R_{if}	ความต้านทานฟาวลิ่งแบบผันกลับไม่ได้ (irreversible fouling) (m^{-1})
$R_{if\text{-}ex}$	ความต้านทานฟาวลิ่งภายนอกแบบผันกลับไม่ได้ (external irreversible fouling) (m^{-1})
$R_{if\text{-}ex}$	ความต้านทานฟาวลิ่งภายนอกแบบผันกลับไม่ได้ (external irreversible fouling) (m^{-1})

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations) ต่อ

R_m	ความต้านทานของเมมเบรน (m^{-1})
R_{rf}	ความต้านทานฟาวลิ่งแบบผันกลับได้ (reversible fouling) (m^{-1})
R_t	ความต้านทานรวม (m^{-1})
$S_{0,t}$	ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดในถังปฏิกรณ์ที่เวลาใดๆ (mg mL^{-1})
$Substrate\ volume_t$	ปริมาตรของสารละลายในถังปฏิกรณ์ที่เวลาใดๆ (mL)
t	เวลาในการย่อยสะสม (min)
Transmembrane pressure (TMP)	ความดันขับ (Pa)
U_g	ความเร็วในการไหลของก๊าซ (m s^{-1})
U_l	ความเร็วในการไหลของของเหลว (m s^{-1})
Ultrafiltration (UF)	อัลตราฟิลเตรชัน
V_f	ปริมาตของสารละลายเริ่มต้น (mL)
Volume concentration factor (VCR)	ค่าเฟคเตอร์ความเข้มข้นเชิงปริมาตร
V_p	ปริมาตของเพอมิเอทที่เวลาใดๆ (mL)
ε	Gas injection factor
N_S'	ค่า shear stress number
u_{liquid}	ความเร็วของของเหลว (m s^{-1})
$u_{mixture}$	ความเร็วของของผสม (m s^{-1})
ρ_{liquid}	ความหนาแน่นของของเหลว (kg m^{-3})
$\rho_{mixture}$	ความหนาแน่นของของผสม (kg m^{-3})
$[NH_2]_{T0}$	จำนวนของ α-NH_2 groups ที่เวลาในการย่อยด้วย 0 นาที
$[NH_2]_{Total}$	จำนวนของ α-NH_2 groups ในโปรตีนจากเนื้อปลานิลเมื่อถูกการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก
$[NH_2]_{Tx}$	จำนวนของ α-NH_2 groups ในส่วนที่อยู่เหนือตะกอนหลังจากการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส เมื่อเวลาผ่านไป x นาที ในแต่ละการทดลอง
μ	ความหนืดของเพอมิเอท (Pa.s)

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

กระบวนการผลิตสารยับยั้งแองจิโอเทนซิน คอนเวอร์ติงเอนไซม์ (Angiotensin Converting enzyme Inhibitor, ACE inhibitor) ซึ่งออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเปลี่ยน angiotensin I เป็น angiotensin II ซึ่งมีผลทำให้หลอดเลือดหดตัว และกระตุ้นการหลั่งของแอลโดสเตอโรน (aldosterone) ที่ทำหน้าที่ในการเพิ่มการดูดน้ำและเกลือแร่กลับสู่ร่างกาย ในอดีตกระบวนการผลิตสารยับยั้งแองจิโอเทนซิน คอนเวอร์ติงเอนไซม์แบบดั้งเดิมมีขั้นตอนการผลิตที่ยุ่งยากซับซ้อนหลายขั้นตอน เริ่มตั้งแต่กระบวนการสกัดการย่อยด้วยเอนไซม์ หลังการย่อยต้องหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ก่อนดำเนินการในขั้นตอนถัดไป คือ การแยกสารออกจากของผสม และกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ วิธีการผลิตแบบดั้งเดิมนี้ใช้ระยะเวลาในการดำเนินการผลิตนาน สิ้นเปลืองพลังงานและค่าใช้จ่ายสูง อีกทั้งคุณภาพและปริมาณของสารสำคัญที่ผลิตได้ยังมีปริมาณน้อย ดังนั้นการพัฒนากระบวนการผลิตให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นจะช่วยแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ ระบบปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์หมุนเวียนแบบต่อเนื่อง (continuous enzymatic membrane reactor, CEMR) เป็นระบบหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นกระบวนการที่ใช้ระยะเวลาสั้นกว่าเมื่อเทียบกับวิธีการผลิตแบบดั้งเดิม เนื่องจากเป็นระบบที่มีกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ และกรองสารละลายผ่านเมมเบรนในเวลาเดียวกัน ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ได้อย่างคุ้มค่า คุณภาพและปริมาณของสารสำคัญที่ผลิตได้ยังมีปริมาณสูงกว่ากระบวนการผลิตแบบดั้งเดิม ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษากระบวนการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยระบบ CEMR และติดตามผลของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ที่ผลิตได้ในระบบจำลองทางเดินอาหารของมนุษย์ องค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยจะเป็นประโยชน์ต่อการผลิตทางการค้า และประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษารูปแบบที่เหมาะสมของการเติมสารตั้งต้นต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยระบบ CEMR
2. เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยระบบ CEMR
3. เพื่อศึกษาผลของการไหลแบบ 2 สถานะ (two-phase flow) ของก๊าซของเหลว (gas-liquid) หรือ gas-liquid two-phase flow ต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยระบบ CEMR

4. เพื่อศึกษาผลของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ที่ผลิตได้ใน CEMR ต่อระบบจำลองทางเดินอาหารของมนุษย์ (Gastrointestinal tract, GI-tract)

ขอบเขตของโครงการวิจัย

การทดลองเริ่มจากการศึกษารูปแบบที่เหมาะสมในการเติมสารตั้งต้น แบ่งเป็น 4 รูปแบบ คือ รูปแบบ A เป็นการเติมสารตั้งต้นเข้าไปในถังปฏิกรณ์ต่อเนื่องตลอดเวลาในปริมาณเท่ากับจำนวนเพอมิเอทที่ออกมาจากระบบ รูปแบบ B C และ D เป็นการเติมสารตั้งต้นเมื่อปริมาณสารตั้งต้นในถังปฏิกรณ์ลดลงร้อยละ 5 10 และ 25 ของปริมาตรเริ่มต้น ตามลำดับ ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการดำเนินการ และ การใช้ gas-liquid two-phase flow ในการผลิตเพปไทด์มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยด้วยระบบ CEMR จากนั้นนำเพปไทด์ที่ผลิตได้ไปทดสอบการย่อยในระบบจำลองทางเดินอาหารของมนุษย์

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สามารถผลิตได้จากโปรตีนปลานิล (Charoenphun *et al*, 2013) ดังนั้นการเลือกใช้กระบวนการผลิตที่เหมาะสม ทำให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ ลดต้นทุนการผลิตลงได้ การประยุกต์ใช้ปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์ในการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE เป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ สามารถลดระยะเวลาการผลิตลง และลดค่าใช้จ่ายเนื่องจากมีการหมุนเวียนเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่อย่างเต็มประสิทธิภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการผลิตแบบดั้งเดิม ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ด้วยระบบ CEMR ให้มีประสิทธิภาพ โดยศึกษารูปแบบการเติมสารตั้งต้น และปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม รวมถึงการประยุกต์ใช้ gas-liquid two-phase flow ในการลดการเกิดฟาวลิ่งและเพิ่มค่าฟลักซ์ในการกรองด้วยอัลตราฟิลเตรชัน โดยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัย ทำให้สามารถควบคุมกระบวนการผลิตได้อย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

กระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแบบดั้งเดิมประกอบด้วยขั้นตอนหลักคือ การสกัด การย่อย และการแยก อย่างไรก็ตามพบว่ามีข้อเสียหลายอย่างเกิดขึ้นในกระบวนการแบบดั้งเดิม เช่น การหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ หลังสิ้นสุดกระบวนการย่อย เป็นการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์อย่างไม่เต็มประสิทธิภาพ ได้ปริมาณผลผลิตที่ต่ำ และเสียค่าใช้จ่ายสูง (Charcosset, 2012) การพัฒนาระบบการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยการนำระบบ CEMR มาใช้เป็นสิ่งที่น่าสนใจในปัจจุบัน เนื่องจากเป็น

กระบวนการผลิตในขั้นตอนเดียวที่รวมเอาระบบการย่อยและการแยกไว้ด้วยกัน ซึ่งพบว่ามีข้อดีคือเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูง ควบคุมการทำงานง่าย เอนไซม์ถูกนำกลับมาใช้ใหม่ในระบบอย่างต่อเนื่องและเต็มประสิทธิภาพ ช่วยลดต้นทุนการผลิตลงได้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการผลิตแบบดั้งเดิม อีกทั้งผลิตผลที่ได้ยังมีปริมาณสูงและมีคุณภาพดี Perea และ Ugalde (1996) และ Prieto และคณะ (2007) กล่าวถึงการประยุกต์ใช้ระบบ CEMR ในกระบวนผลิตเพปไทด์ให้ผลิตผลสูงและทำให้ได้เพปไทด์ที่มีขนาดตามต้องการเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีการผลิตแบบดั้งเดิม และการผลิตด้วยปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์หมุนเวียนแบบกะ (Cyclic batch enzymatic membrane reactor, CBEMR) (Chiang *et al*., 2006) โดยในกระบวนการผลิตด้วยระบบ CEMR นี้ สารตั้งต้นจะถูกเติมลงไปในถังปฏิกรณ์ด้วยปริมาตรคงที่เท่ากับการไหลออกของเพอมิเอทอย่างต่อเนื่องและสม่ำเสมอ พบว่าระบบ CEMR ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากวัตถุดิบที่หลากหลาย อาทิ เวย์โปรตีน (Perea and Ugalde, 1996) ถั่วเหลือง (Chiang *et al*., 2006) ไข่ขาว (Chiang *et al*., 2008) เลือดหมู (Wei and Chiang, 2009) ข้าวโพด (Huang *et al*., 2011) และกลูเตนจากแป้งสาลี (Cui *et a*l., 2011).

ประสิทธิภาพของการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยระบบ CEMR ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย อาทิ กิจกรรมของเอนไซม์ ระยะเวลาในการดำเนินการในระบบ ความเข้มข้นของสารตั้งต้นและเอนไซม์ รูปแบบในการเติมสารตั้งต้นเข้าสู่ระบบ อัตราส่วนของสารตั้งต้นต่อเอนไซม์ และคุณสมบัติของเมมเบรน (Lee and Kim, 1993) โดยรูปแบบของการเติมสารตั้งต้นเข้าไปในระบบและการไหลของเพอมิเอทออกจากระบบอย่างต่อเนื่องเป็นสิ่งสำคัญต่อประสิทธิภาพของการผลิตเพปไทด์ (Lyagin *et al*., 2010) Lee และ Kim (1993) ศึกษาผลของรูปแบบของการเติมสารตั้งต้นในระบบ CEMR พบว่าปริมาณ ค่าคอนเวอร์ชั่น (conversion) หรือการเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบไปเป็นผลผลิตที่สนใจ สัมพันธ์กับอัตราการเติมสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตเซลลูโลสภายใต้สภาวะที่กำหนด นอกจากนี้ความเข้มข้นของสารตั้งต้น เวลาการดำเนินการ และความเข้มข้นของเอนไซม์ ส่งผลต่อประสิทธิภาพของระบบ CEMR Grzeoekowiak-Przywecka และ Slominska (2005) รายงานผลของความเข้มข้นเอนไซม์ในกระบวนการผลิตสตาร์ชจากมันฝรั่งด้วยระบบ CEMR พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์จาก 0.80 FAU g^{-1}DS ถึง 2.65 FAU g^{-1}DS ส่งผลการเพิ่มปริมาณมอลโทส 2.5 เท่า หลังผ่านการกรองด้วยอัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration)

โดยทั่วไปปัญหาสำคัญที่พบในกระบวนการกรองด้วยอัลตราฟิลเตรชันคือการลดลงของเพอมิเอทเนื่องจากการเกิดฟลาวลิ่ง (flouling) และคอนเซนเทรชัน โพลาไรเซชัน (concentration polarization) (Paolucci-Jeanjean et al., 2000b) ดังนั้นการควบคุมการเกิดฟลาวลิ่งจึงเป็นสิ่งจำเป็นในกระบวนการผลิตการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ปัจจุบันมีการนำหลายๆ เทคนิคมาประยุกต์ใช้ร่วมกับการกรองด้วยอัลตราฟิลเตรชันเพื่อเพิ่มค่าฟลักซ์ของเพอมิเอท (permeate flux) หรือลดการเกิดฟาวลิ่ง เช่น การกรองแบบกระแสน้ำหมุนวน (vortex flow filtration) (Agarwal, 1997) การปรับค่าความเป็นกรดด่าง (pH adjustment) (Waungana *et al*., 1998) การล้างตามขวาง (cross flushing) (Kennedy *et al*., 1998) ค่าฟลักซ์วิกฤต (critical flux) (Field *et al*., 1995) การใช้ความดันขับแบบผลัก หรือแบบย้อนกลับ

(transmembrane pressure pulsing or backpulsing) (Kim *et al*., 2007) และ การไหลแบบสองสถานะ (two-phase flow) (Lee *et al*., 1993) รูปแบบการไหลแบบ 2 สถานะ (two-phase flow) ของก๊าซของเหลว (gas-liquid) หรือ gas-liquid two-phase flow เป็นวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจที่ถูกนำมาใช้เพื่อช่วยลดการเกิดฟาวลิ่งของเมมเบรน โดยอนุภาคของฟองอากาศและการไหลของของเหลวจะช่วยพาโมเลกุลของสารที่ต้องการกรองผ่านรูพรุนของเมมเบรน และการถ่ายเทมวลของสารเข้าไปขัดขวางการสะสมของอนุภาคซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดฟาวลิ่ง ทั้งฟาวลิ่งแบบผันกลับได้และฟาวลิ่งแบบผันกลับไม่ได้ (Li *et al*., 2008; Youravong *et al*., 2010; Laorko *et al*., 2011; Charoenphun, 2013) การประยุกต์ใช้ระบบ gas-liquid two-phase flow ในกระบวนการกรองด้วยเมมเบรน เช่น การแยกเอนไซม์จากม้ามปลาทูนา (Li *et al*., 2008) ไวน์สับประรด (Youravong *et al*., 2010) น้ำแอปเปิ้ล (Laorko *et al*., 2011) การแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการจับแคลเซียม (Charoenphun, 2013) และการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ด้วยอัลตราฟิลเตรชัน (Charoenphun, 2015) ดังนั้นการผลิตสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยระบบ CEMR ร่วมกับการใช้ gas-liquid two-phase flow รวมถึงการตรวจสอบคุณภาพของเพปไทด์ที่ผลิตได้ในระบบจำลองทางเดินอาหารของมนุษย์ จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบถึง ความสำคัญของปัจจัยต่างๆ และสภาวะที่เหมาะต่อการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากโปรตีนปลานิล ด้วยปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์ให้มีคุณภาพ และมีปริมาณผลผลิตสูง
2. ภาคอุตสาหกรรมสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ไปพัฒนาต่อยอดในการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากโปรตีนปลานิล
3. การสร้างศักยภาพและความสามารถเพื่อการพัฒนาทางเศรษฐกิจ โดยสามารถสร้างมูลค่าทางการเกษตรให้กับกลุ่มเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงปลานิล และเป็นทางเลือกใหม่ให้กับกลุ่มผู้ส่งออกผลิตภัณฑ์แปรรูปจากปลานิล
4. องค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยเกิดประโยชน์และได้รับความสนใจจากกลุ่มเป้าหมาย ผู้ที่ใส่ใจในการดูแลสุขภาพ การลดความดันโลหิตในร่างกาย ตลอดจนหน่วยงานที่สนใจพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพ โดยการจัดสัมมนาย่อยเพื่อการเผยแพร่งานวิจัย รวมถึงการเผยแพร่ในวารสาร

อุปกรณ์และวิธีการ

สารเคมีและอุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

1.1 น้ำกรองระบบ RO (reverse osmosis water)
1.2 น้ำกลั่น (distilled water) สำหรับวิเคราะห์ทางเคมี
1.3 ปลานิลขนาดกลาง (350-500 กรัมต่อตัว)

2. สารเคมี

2.1 N-Hippuryl-His-Leu hydrate (Sigma Chemical Co., สหรัฐอเมริกา)
2.2 กรดไทรคลอโรอะซีติค (RCI Labscan, ไทย)
2.3 กรดบอริก (RCI Labscan, ไทย)
2.4 กรดฟอสฟอริก (RCI Labscan, ไทย)
2.5 กรดไฮโดรคลอริก (RCI Labscan, ไทย)
2.6 คอปเปอร์ (II) ซัลเฟต (Univar, ออสเตรเลีย)
2.7 แคปโตพริล (Captopril) (Sigma Chemical Co., สหรัฐอเมริกา)
2.8 โซดียม เตตราบอเรต เดคาไฮเดรท
2.9 โซเดียมคลอไรด์ (RCI Labscan, ไทย)
2.10 โซเดียมคาร์บอเนต (Univar, ออสเตรเลีย)
2.11 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (RCI Labscan, ไทย)
2.12 โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรท (RCI Labscan, ไทย)
2.13 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (RCI Labscan, ไทย)
2.14 โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Loba, อินเดีย)
2.15 ดีแอล-ไดไธโอไธรทอล (RCI Labscan, ไทย)
2.16 ไดโซเดียมฟอสเฟต (RCI Labscan, ไทย)
2.17 ไทโรซีน (RCI Labscan, ไทย)
2.18 ไนโตรเจนแก๊ส (Thai Industrial Gas Co., Ltd., ไทย)
2.19 โบวายซีรั่มอัลบูมิน (RCI Labscan, ไทย)
2.20 โพแทสเซียมคลอไรด์ (RCI Labscan, ไทย)
2.21 ฟอลินซิโอแคลตูรีเอเจน (Loba, อินเดีย)

2.22 โมโนโซเดียมฟอสเฟต (RCI Labscan, ไทย)

2.23 ออร์โท-พาทาลิก อัลดีไฮด์ (Sigma Chemical Co., สหรัฐอเมริกา)

2.24 เอทานอล (RCI Labscan, ไทย)

2.25 เอทิลอาซีเทต (RCI Labscan, ไทย)

2.26 เอนไซม์แพนครีเอติน จาก porcine pancreas (Sigma Chemical Co., สหรัฐอเมริกา)

2.27 เอนไซม์เพปซิน จาก porcine gastric mucosa (Sigma Chemical Co., สหรัฐอเมริกา)

2.28 เอนไซม์อัลคาเลส 2.4L จาก *Bacillus licheniformis* (Novozyme, เดนมาร์ก)

2.29 แองจิโอเทนซิน-คอนเวอร์ติงเอนไซม์ จาก rabbit lung (Sigma Chemical Co., สหรัฐอเมริกา)

2.30 แอล-ซีรีน (Sigma Chemical Co., สหรัฐอเมริกา)

3. เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1 เกจ์วัดความดัน (Sang Chai Meter Co., Ltd., ไทย)

3.2 เครื่องกรองน้ำระบบ RO (Drink Dee Co., Ltd, ไทย)

3.3 เครื่องกวนสารแบบ Overhead Stirrer (IKA, เยอรมนี)

3.4 เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า (AND Co., Ltd, ญี่ปุ่น)

3.5 เครื่องบดเนื้อ (Kenwood, Huizhuo, สาธารณรัฐประชาชนจีน)

3.6 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (Eutech Instruments Pte Ltd, สิงคโปร์)

3.7 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Thermo Scientific GENESYS 20, ญี่ปุ่น)

3.8 เครื่องวิเคราะห์โปรตีน วิธี Kjeldahl

Digestion Unit ยี่ห้อ Buchi รุ่น K-435 สวิตเซอร์แลนด์

Distillation Unit ยี่ห้อ Buchi รุ่น B-316 สวิตเซอร์แลนด์

3.9 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, เยอรมนี)

3.10 ชุดถังปฏิกรณ์ (B.E.Marubishi (Thailand) Co., Ltd., ไทย)

3.11 ปั๊มรีดสายยาง (Masterflex, สหรัฐอเมริกา)

3.12 โพลิซัลโฟนเมมเบรน (Healthcare Bio-Science (Thailand) Ltd, ไทย)

3.13 มาตรวัดความหนืดแบบไหลผ่านช่องแคบ (Schott instruments, เยอรมนี)

3.14 สายยางซิลิโคน (Masterflex, สหรัฐอเมริกา)

3.15 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, เยอรมนี)

วิธีการ

1. การผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยระบบ CEMR

การเตรียมสารละลายโปรตีนจากเนื้อปลานิล

การเตรียมตัวอย่างสารละลายโปรตีนจากเนื้อปลานิลใช้วิธีการปรับสภาพด้วยอัลคาไลน์ (alkaline treatment) โดยดัดแปลงวิธีการของ Raghavan และ Kristinsson (2008) นำปลานิลสดขนาดกลาง (350-500 กรัมต่อตัว) แล่เอาแต่ส่วนที่เป็นเนื้อ แยกก้าง และหนังปลาออก บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ ได้เนื้อปลาบดละเอียดที่มีโปรตีนเริ่มต้นอยู่ในช่วงร้อยละ 17 ถึง 25 จากนั้นชั่งให้ได้อัตราส่วนผสมระหว่างเนื้อปลาบดละเอียดต่อน้ำในอัตราส่วนของเนื้อปลาบดละเอียด 1 ส่วนต่อน้ำ 14 ส่วน ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 11 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ และกวนผสมในถังผสมเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และปรับค่าความเป็นกรดด่างของของผสมเท่ากับ 8 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และฟอสเฟตบัพเฟอร์กวนผสมในถังผสมเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง กรองสารละลายผสมทั้งหมดด้วยผ้าขาวบาง เก็บตัวอย่างสารละลายผสมที่ผ่านการกรองไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนให้ด้วยวิธี Kjeldahl (AOAC, 1999) โดยจะได้สารละลายที่มีโปรตีนความเข้มข้นประมาณร้อยละ 1 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) สารละลายที่ได้มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันสีขาวขุ่นนำไปวัดความหนืดด้วยมาตรวัดความหนืดแบบไหลผ่านช่องแคบได้ค่าเท่ากับ 0.0019 ปาสคาลต่อวินาที และวัดน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้าได้ค่าเท่ากับ 1366 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสโดยใช้สารละลายโปรตีนจากเนื้อปลานิลเป็นสารตั้งต้น ดัดแปลงวิธีการของ Wang และ Hesseltine (1965) เอนไซม์โปรตีเอสที่ใช้ในการทดลองคือ เอนไซม์อัลคาเลส 2.4L จาก *Bacillus licheniformis* ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพในกาย่อยโปรตีนในเนื้อปลานิลให้ได้เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูง (Charoenphun *et al*., 2013) เริ่มจากการนำเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที ก่อนผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลายโปรตีนจากปลาเนื้อนิลที่มีความเข้มข้นของโปรตีนร้อยละ 1 ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมกรดไทรคลอโรอะซีติคที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 30 นาที และกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 นำสารละลายที่ผ่านการกรองแล้ว 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมฟอลินซิโอแคลตูรีเอเจนความเข้มข้น 1 นอร์มัล

ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบลงค์ กราฟมาตรฐานใช้สารละลายไทโรซีนเป็นสารมาตรฐานที่ช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสคำนวนตามสมการที่ (1)

$$\textit{กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส*} = \frac{[\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ } 600 \text{ นาโนเมตร } x \text{ ปริมาตรทั้งหมด } x \text{ จำนวนเท่าความเจือจาง}]}{[\text{ค่าความชันของสมการ } x \text{ เวลา}]} \quad (1)$$

*กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส มีหน่วยเป็นยูนิตต่อกรัมของโปรตีนปลานิล

1.1 การศึกษารูปแบบที่เหมาะสมของการเติมสารตั้งต้นต่อประสิทธิภาพของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยระบบ CEMR

นำสารละลายโปรตีนจากเนื้อปลานิลที่เตรียมได้ปริมาตร 550 มิลลิลิตร ใส่ในถังปฏิกรณ์ ควบคุมค่าค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสตลอดการทดลอง เติมเอนไซม์อัลคาเลส 2.4L (อัตราส่วนเอนไซม์ต่อสารละลายโปรตีนเท่ากับ 20 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน) ย่อยในถังปฏิกรณ์เป็นเวลา 90 นาที ก่อนเริ่มกรอง โดยใช้เมมเบขนาด 1 กิโลดาลตัน สภาวะที่ใช้ในการกรองของเมมเบรนคือความดันขับ 1.3 บาร์ ความเร็วตามขวาง 1.5 เมตรต่อวินาที ลักษณะการจัดวางระบบดังแสดงใน Figure 1 ประกอบด้วยตัวกรองคือโพลิซัลโฟนเมมเบรเมมเบรนที่มี MWCO ขนาด 1 กิโลดาลตัน เกจวัดความดันสำหรับวัดความดันเข้าและออกจากเมมเบรน ความเร็วตามขวางควบคุมโดยใช้ปั๊มรีดสายยาง ส่วนความดันขับควบคุมโดยใช้รีเทนเททวาล์ว และ เพอมิเอทวาล์ว อุณหภูมิของระบบถูกควบคุมโดยการวนของน้ำผ่านตัวควบคุมอุณหภูมิภายในถังปฏิกรณ์ ปริมาตรของเพอมิเอทวัดในรูปของน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า ควบคุมความเร็วของการกวนด้วยใบพัดชนิดใบกังหันแผ่นแบน (flat blade disc turbine) ค่า Reynolds number (R_e) เท่ากับ 21,228 (McCabe และ Smith, 1976)

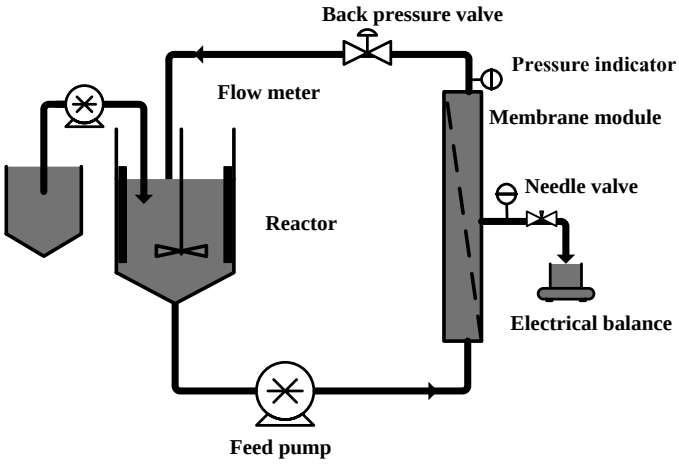

Figure 1 Schematic diagram of CEMR system

การศึกษารูปแบบของการเติมสารตั้งต้นแบ่งการทดลองออกเป็น 4 รูปแบบ ประกอบด้วย รูปแบบ A เป็นการเติมสารตั้งต้นอย่างต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์เท่ากับอัตราการไหลออกของเพอมิเอท รูปแบบ B C และ D เป็นการเติมสารตั้งต้นในถังปฏิกรณ์ให้เท่ากับปริมาตรเริ่มต้น 550 มิลลิลิตร เมื่อปริมาตรในถังปฏิกรณ์ลดลงร้อยละ 5 10 และ 25 ของปริมาตรเริ่มต้น ตามลำดับ โดยใช้ระยะเวลาในการดำเนิน 720 นาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 1 ชั่วโมง ทั้งในเพอมิเอทและรีเทนเทท และให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ วิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ของเพปไทด์จากเนื้อปลานิลในรีเทนเทท และเพอมิเอท ค่าการส่งผ่านโปรตีน (protein transmission (T_p)) คำนวณดังสมการที่ 2

$$\textit{ค่าการส่งผ่านโปรตีน (\%)} = \frac{\text{ความเข้มข้นของโปรตีนในเพอมิเอท}}{\text{ความเข้มข้นของโปตีนในสารละลายเริ่มต้น}} \times 100 \qquad (2)$$

เมื่อ ความเข้มข้นของโปรตีนมีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การวิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ของเพปไทด์จากเนื้อปลานิลดัดแปลงตามวิธีการทดลองของ Cushman และ Cheung (1971) ใช้ N-Hippuryl-His-Leu hydrate (Hip-His-Leu) เป็นสารตั้งต้น การทดลองเริ่มจากการนำตัวอย่างที่ผ่านการกรองด้วยอัลตราฟิลเตรชันมา 50 ไมโครลิตร และสารละลายเอนไซม์ ACE ความเข้มข้น 2.5 มิลลิยูนิต ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมลงในสารละลาย N-Hippuryl-His-Leu hydrate ความเข้มข้น 12.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์-บอเรต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 8.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิยาด้วยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.5 นอร์มัล ปริมาตร 250 ไมโครลิตร สกัดกรดฮิปปูริก (hippuric acid) ออกมาด้วยการเติมเอทิลอาซีเทตลงไปปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 228 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณการยับยั้งเอนไซม์ ACE ของเพปไทด์จากเนื้อปลานิล ตัวอย่างควบคุมทำเหมือนวิธีการข้างต้น แต่จะใช้สารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แทนการใส่ตัวอย่างที่ผ่านการกรองด้วยอัลตราฟิลเตรชัน ใช้แคปโตพริลเป็นสารมาตรฐานที่ช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE มีหน่วยเป็นไมโครกรัมสมมูลของแคปโตพริลต่อมิลลิลิตร หรือคำนวณในรูปร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ ACE ของเพปไทด์จากเนื้อปลานิลดังสมการที่ 3

$$\textit{Inhibition level (\%)} = [(E_c - E_s)/(E_c - E_b] \times 100 \qquad (3)$$

เมื่อ E_c = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 228 นาโนเมตร ของบัฟเฟอร์ก่อนหยุดปฏิกิริยา

E_s = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 228 นาโนเมตร หลังหยุดปฏิกิริยา

E_b = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 228 นาโนเมตร ของตัวอย่างก่อนหยุดปฏิกิริยา

คำนวณค่าคอนเวอร์ชั่น (conversion) หรือการเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบไปเป็นผลผลิตที่สนใจ และค่าผลิตภาพ (productivity) ค่าคอนเวอร์ชั่นหาได้จากการดัดแปลงวิธีการของ Cui และคณะ (2011)

$$Protein\ conversion\ (\%) = \frac{C_p \times V_p}{C_f \times V_f} \times 100 \quad (4)$$

เมื่อ C_f = ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายเริ่มต้น (mg mL^{-1})
C_p = ความเข้มข้นของโปรตีนในเพอมิเอทที่เวลาใดๆ (mg mL^{-1})
V_f = ปริมาตของสารละลายเริ่มต้น (mL)
V_p = ปริมาตของเพอมิเอทที่เวลาใดๆ (mL)

การเปลี่ยนแปลงสารละลายโปรตีนไปเป็นเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE หาได้จากการดัดแปลงวิธีการของ Cui และคณะ (2011) ดังสมการ

$$ACE\ inhibitory\ activity\ conversion\ (\%) = \frac{C_p \times V_p \times A_p}{C_f \times V_f \times A_f} \times 100 \quad (5)$$

เมื่อ A_f = ความสามารถของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ในสารละลายเริ่มต้น (μg captopril g^{-1} protein)
A_p = ความสามารถของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ในเพอมิเอทที่เวลาใดๆ (μg captopril g^{-1} protein)

ปริมาณผลิตภาพของโปรตีนที่ผ่านการย่อยต่อยูนิตของเอนไซม์คำนวณในหน่วย ยูนิตต่อกรัมโปรตีน หรือ ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (unit g^{-1} protein or unit mL^{-1} of protein) หาได้จากการดัดแปลงวิธีการของ Cui และคณะ (2011) ดังสมการ

$$Productivity\ of\ protein = \frac{Protein\ conversion_t \times S_{0,t} \times F_t \times t}{Enzyme\ concentration \times Substrate\ volume_t} \quad (6)$$

เมื่อ $protein\ conversion_t$ = ค่าโปรตีนคอนเวอร์ชั่นที่เวลาใดๆ
$enzyme\ concentration$ = ความเข้มข้นของเอนไซม์ (unit mL^{-1} of protein)
$substrate\ volume_t$ = ปริมาตรของสารละลายในถังปฏิกรณ์ที่เวลาใดๆ (mL)
$S_{0,t}$ = ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดในถังปฏิกรณ์ที่เวลาใดๆ (mg mL^{-1})
F_t = อัตราการไหลของเพอมิเอทที่เวลาการย่อยใดๆ (mL min^{-1})

t = เวลาในการย่อยสะสม (min)

ปริมาณผลิตภาพของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ด้วยระบบ CBCMR หาได้จากการดัดแปลงวิธีการของ Cui และคณะ (2011) ดังสมการ

$$\textit{Bioactive productivity} = \frac{Bioactive\ activity\ conversion_t \times S_{0,t} \times F_t \times t}{Enzyme\ concentration \times\ Substrate\ \ volume_t} \quad (7)$$

1.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อประสิทธิภาพของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยระบบ CEMR

สารตั้งต้นความเข้มข้นร้อยละ 1 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 2.4 L ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 10 15 และ 20 ยูนิตต่อกรัมของโปรตีนปลานิล ด้วยอุณหภูมิในการย่อย 50 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 8 ในถังปฏิกรณ์ นาน 180 นาที ระดับการย่อยของตัวอย่างวัดจากปริมาณพันธะเพปไทด์ที่ถูกตัด โดยใช้วิธีออร์โท-พาทาลิก อัลดีไฮด์ (OPA) ดัดแปลงจากวิธีการของ Wanasundara *et al*. (2002) วิธีการวิเคราะห์เริ่มจากการเตรียมออร์โท-พาทาลิก อัลดีไฮด์ รีเอเจนต์ (เตรียมก่อนใช้ทุกครั้ง) เตรียม ออร์โท-พาทาลิก อัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ (ละลายในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 (โดยปริมาตรต่อปริมาตร) และ แอล-ไดไธโอไธรทอล ความเข้มข้น 5.7 มิลลิโมลาร์ ละลายในโซเดียม เตตราบอเรต เดคาไฮเดรท ความเข้มข้นร้อยละ 2 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (0.4 มิลลิลิตร) ผสมในออร์โท-พาทาลิก อัลดีไฮด์ รีเอเจนต์ 3 มิลลิลิตร นำไปบ่มเป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ จำนวนของกรดอะมิโนอิสระที่ได้จากการย่อยคำนวณในรูปของ serine-NH_2 โดยใช้ L-serine เป็นสารละลายมาตรฐาน กรดอะมิโนเริ่มต้นทั้งหมดในเนื้อปลานิลคำนวนจากการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 6 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คำนวณร้อยละการย่อยด้วยสมการที่ 8

$$DH\ (\%) = \frac{[NH_2]_{Tx} - [NH_2]_{T_0}}{[NH_2]_{Total} - [NH_2]_{T_0}} \times 100 \quad (8)$$

เมื่อ $[NH_2]_{T0}$ = จำนวนของ α-NH_2 ที่เวลาในการย่อย 0 นาที

$[NH_2]_{Tx}$ = จำนวนของ α-NH_2 ในส่วนใสหลังจากการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 2.4 L เป็นเวลา x นาที

$[NH_2]_{Total}$ = จำนวนของ α-NH_2 จากการย่อยด้วยกรด

คัดเลือกระดับการย่อยและระยะเวลาในการย่อยที่เหมาะสมเพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ โดยใช้รูปแบบการเติมสารตั้งต้นที่คัดเลือกได้จากข้อ 1.1 ในระบบ CEMR ภายใต้สภาวะที่กำหนดคือ ความเข้มข้นของสารตั้งต้นร้อยละ 1 ความดันขับ 1.3 บาร์ ความเร็วตามขวาง 1.5 เมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปริมาตรเริ่มต้นในถังปฏิกรณ์ 550 มิลลิลิตร สุ่มเก็บตัวอย่างทุกๆ 1 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ถูกสุ่มเก็บมาจะถูกให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์

1.3 ศึกษาผลของ gas-liquid two-phase flow ต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยระบบ CEMR

สารละลายโปรตีนจากเนื้อปลานิล ถูกย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 2.4L ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8.0 โดยคัดเลือกระดับการย่อย ระยะเวลาในการย่อย และความเข้มข้มของเอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อมูลในข้อ 1.1 และ 1.2 ควบคุมความเข้มข้นของสารตั้งต้นร้อยละ 1 ความดันขับ 1.3 บาร์ ความเร็วตามขวาง 1.5 เมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปริมาตรเริ่มต้นในถังปฏิกรณ์ 550 มิลลิลิตร ใช้เวลาในการกรอง 720 นาที ก๊าซไนโตรเจนถูกฉีดเข้าไปในทางเข้าของท่อรูปตัว Y อัตราการไหลของก๊าซถูกควบคุมด้วยเกจวัดอัตราการไหลของก๊าซ และเกจวัดความดัน อัตราส่วนการไหลระหว่างของเหลวและก๊าซคำนวณจากสมการที่ 9 ค่าแฟคเตอร์ของการฉีดก๊าซมีค่าเท่ากับ 0 0.25 0.35 และ 0.5 หรือมีค่า N_S' เท่ากับ 0.019 0.026 0.030 และ 0.039 ตามลำดับ โดยการแปรเปลี่ยนระดับการไหลของก๊าซจากการไหลแบบฟองก๊าซถึงระดับการไหลแบบกระสุน สุ่มเก็บตัวอย่างเพอมิเอทและรีเทนเทททุกๆ 30 นาที และให้ความร้อน 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ วัดกิจกรรมของเอนไซม์ ค่าฟลักซ์ของเพอมิเอท ความต้านทานฟาวลิ่งค่าการส่งผ่านโปรตีน และฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ตามวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

อัตราส่วนการไหลระหว่างของเหลวและก๊าซคำนวณจากค่าแฟคเตอร์ของการฉีดก๊าซ gas injection factor (ε) หาได้จากสมการที่ 9

$$\varepsilon = \frac{U_g}{(U_g + U_l)} \tag{9}$$

เมื่อ U_g = ความเร็วในการไหลของก๊าซ (m s^{-1})

U_l = ความเร็วในการไหลของของเหลว (m s^{-1})

วิเคราะห์ฟลักซ์ของเพอมิเอท การส่งผ่านของโปรตีน และวิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ของเพปไทด์จากเนื้อปลานิลดัดแปลงตามวิธีการที่ได้กล่าวมาข้างต้น แปรเปลี่ยนระดับการไหลของก๊าซจากการไหลแบบฟองก๊าซถึงระดับการไหลแบบกระสุนตามความเร็วที่เพิ่มขึ้น เป็นเวลา 150

นาที ตามวิธีการทดลองของ Laorko และคณะ (2011) หาค่าฟลักซ์ของเพอมิเอท การส่งผ่านโปรตีน และเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE โดยทั่วไปการเพิ่มความเร็วตามขวาง และการเพิ่มความเร็วของก๊าซส่งทำให้ความเค้นเฉือน (shear stress) ที่ผิวหน้าของเมมเบรนเพิ่มขึ้น ค่า shear stress number (N_s) ที่ผนังเมมเบรนถูกนำมาเทียบกับความดันขับ (Chiu และ James, 2006) ค่า shear stress number ของการไหลเพียงเฟสเดียว (single-phase flow) คำนวณจากสมการที่ 10

$$N_S = \frac{\rho_{liquid} u^2_{liquid}}{TMP} \tag{10}$$

การไหลแบบ gas-liquid two-phase flow ประยุกต์สมการเพื่อคำนวณหาค่า shear stress number (N_S') ได้ดังสมการที่ 11

$$N_S' = \frac{\rho_{mixture} u^2_{mixture}}{TMP} \tag{11}$$

เมื่อ ρ_{liquid} = ความหนาแน่นของของเหลว (kg m^{-3})

$\rho_{mixture}$ = ความหนาแน่นของของผสม (kg m^{-3})

u_{liquid} = ความเร็วของของเหลว (m s^{-1})

$u_{mixture}$ = ความเร็วของของผสม (m s^{-1})

TMP = ความดันขับ (Pa)

ความเร็วของของผสมคำนวณจากสมการที่ 12

$$u_{mixture} = u_{liquid} + u_{gas} \tag{12}$$

ความหนาแน่นของของผสมคำนวณจากสมการที่ 13

$$\rho_{mixture} = \frac{\rho_{gas} u_{gas} + \rho_{liquid} u_{liquid}}{u_{mixture}} \tag{13}$$

ในการศึกษาครั้งนี้ค่าแฟคเตอร์ของการฉีดก๊าซมีค่าเท่ากับ 0 0.25 0.35 และ 0.50 หรือมีค่า N_S' เท่ากับ 0.020 0.026 0.030 และ 0.039 ตามลำดับ การศึกษาผลของ gas-liquid two-phase flow ต่อความต้านทานการเกิดฟลาวลิ่งดำเนินการโดยดัดแปลงวิธีการทดลองของ Razavi และคณะ (2004) โดยค่าฟลักซ์ของเพอมิเอทและค่าการกักกันของเมมเบรนเป็นค่าที่แสดงสมรรถนะในกระบวนการเมมเบรน สามารถอธิบายด้วยกฎของ Darcy โดยที่ค่าฟลักซ์จะแสดงถึงปริมาตรของเพอมิเอทที่ผ่านเมม

เบรนต่อหน่วยพื้นที่ต่อเวลา (Krishna *et al*., 2003) และสามารถเขียนในรูปของแรงดันขับ และความต้านทานการไหลได้ดังนี้

$$J = \frac{TMP}{\mu R_t} \tag{14}$$

เมื่อ J = ฟลักซ์ของเพอมิเอท (m s^{-1})
TMP = ความแตกต่างของความดัน (Pa)
μ = ความหนืดของเพอมิเอท (Pa.s)
R_t = ความต้านทานรวม (m^{-1})

ความต้านทานรวมคำนวณจากสมการที่ 15

$$R_t = R_m + R_{rf} + R_{if} \tag{15}$$

$$R_{if} = R_{if\text{-}in} + R_{if\text{-}ex} \tag{16}$$

เมื่อ R_m = ความต้านทานของเมมเบรน (m^{-1})
R_{rf} = ความต้านทานฟาวลิ่งแบบผันกลับได้ (reversible fouling) (m^{-1})
R_{if} = ความต้านทานฟาวลิ่งแบบผันกลับไม่ได้ (irreversible fouling) (m^{-1})
$R_{if\text{-}in}$ = ความต้านทานฟาวลิ่งภายในแบบผันกลับไม่ได้ (internal irreversible fouling) (m^{-1})
$R_{if\text{-}ex}$ = ความต้านทานฟาวลิ่งภายนอกแบบผันกลับไม่ได้ (external irreversible fouling) (m^{-1})

ความต้านทานที่เกิดขึ้นมีผลต่อฟลักซ์ของเพอมิเอทของกระบวนการเมมเบรน ในสภาวะปกติความต้าน R_m คำนวณโดยตรงจากค่าฟลักซ์ของน้ำก่อนใช้งาน ค่า R_{rf} หาได้จากฟลักซ์ของน้ำผ่านเมมเบรนหลังใช้งาน และค่า R_{if} หาได้จากค่าฟลักซ์หลังจากล้างด้วยน้ำสะอาด ที่ซึ่งเมมเบรนจะถูกทำความสะอาดด้วยสารเคมีต่างๆ R_t คือความต้านทานรวม คำนวณโดยใช้สมการที่ (15) และ (16) ค่า R_{rf} หาจากฟลักซ์ของน้ำ หลังจากกระบวนการกรองตัวอย่างเสร็จสิ้นผิวหน้าของเมมเบรนจะถูกชะล้างด้วยน้ำสะอาด ในขณะที่วาล์วของเพอมิเอทจะถูกปิดในขั้นตอนการทำความสะอาดเมมเบรนน้ำสะอาดจะไหลผ่านเมมเบรนด้วยความเร็วตามขวาง 1.5 เมตรต่อวินาที และความดันขับ 0.5 บาร์ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากการล้างครั้งแรกเสร็จสิ้นวาล์วของเพอมิเอทจะถูกเปิด และทำการวัดค่าฟลักซ์เพื่อประมาณความต้านทานการเกิดฟลาวลิ่ง จากนั้นปิดวาล์วเพอมิเอทอีกครั้งล้างเมมเบรนด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 นอร์มัล อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความดันขับ 0.5 บาร์ และความเร็วตามขวาง 1.5 เมตรต่อวินาที เป็นเวลา 40 นาที เพื่อกำจัดฟาวลิ่งภายนอกแบบผันกลับไม่ได้ หลังจากนั้นล้างสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ออกด้วยน้ำสะอาด และวัดค่าฟลักซ์เพื่อประมาณความ

ต้านทานของเมมเบรน ในขั้นตอนต่อมาหาค่า $R_{if\text{-}in}$ โดยล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 50 พีพีเอ็ม อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความดันขับ 0.5 บาร์ ความเร็วตามขวาง 1.5 เมตรต่อวินาที เป็นเวลา 40 นาที ค่าความต้านทานถูกนำมาคำนวณโดยใช้สมการที่ (15) และ (16) หลังจากนั้นทำความสะอาดเมมเบรนด้วยน้ำสะอาด ตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 นอร์มัล อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง และใช้น้ำสะอาดล้างซ้ำจนมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7

จากนั้นคัดเลือกสภาวะที่ดีที่สุดจากการศึกษาผลของ gas-liquid two-phase flow ด้วยกระบวนการอัลตราฟิลเตรชันภายใต้ total recycle mode มาศึกษาผลของ gas-liquid two-phase flow ด้วยกระบวนการอัลตราฟิลเตรชันแบบกะ (batch mode) เป็นเวลา 360 นาที คำนวณค่า recovery ดังสมการที่ 17

$$Recovery\ (\%) = \frac{\text{ปริมาตรของเพอมิเอท}}{\text{ปริมาตรเริ่มต้น}} \times 100 \qquad (17)$$

2. การศึกษาผลของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ที่ผลิตได้ใน CEMR ต่อระบบจำลองทางเดินอาหารของมนุษย์ (Gastrointestinal tract, GI-tract)

ตัวอย่างเพปไทด์ที่ผลิตได้ถูกนำมาทดสอบในระบบจำลองทางเดินอาหารของมนุษย์ โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Hwang (2010) ตัวอย่างที่นำมาใช้ทดสอบมีทั้งหมด 3 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ตัวอย่างโปรตีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสเป็นเวลา 120 นาทีแต่ไม่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรน ตัวอย่างเพปไทด์ส่วนของรีเทนเททส่วนที่ผ่านระบบ CEMR และตัวอย่างเพปไทด์ในเพอมิเอทส่วนที่ผ่านระบบ CEMR ตัวอย่างความเข้มข้นร้อยละ 1 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ละลายในบัฟเฟอร์ (โพแทสเซียมคลอไรด์-ไฮโดรคลอริก) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 2 ผสมกับเอนไซม์เพปซินปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมงในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิน้ำเดือด 15 นาที เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 2 นอร์มัล เพื่อปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 7 วัดค่าความเป็นกรดด่างด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) แบ่งสารละลายที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 g เป็นเวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนที่เป็นของเหลวใสไปตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สารละลายที่ปรับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 ส่วนที่เหลือปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปเติมเอนไซม์แพนครีเอตินความเข้มข้นร้อยละ 2 (โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิน้ำเดือด 15 นาที เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง

หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 g เป็นเวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนที่เป็นของเหลวใสไปตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE

การวิเคราะห์ทางสถิติทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และหากสิ่งทดลองมีความแตกต่าง ทำการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple's Range Test (DMRT) (Duncan, 1995) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยระบบ CEMR

1.1 การศึกษารูปแบบที่เหมาะสมของการเติมสารตั้งต้นต่อประสิทธิภาพของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยระบบ CEMR

ระบบ CEMR เป็นระบบที่มีการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์อย่างเต็มประสิทธิภาพและคุ้มค่า เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลถูกผลิตอย่างต่อเนื่องในระบบ CEMR ดังนั้นการควบคุมอัตราการป้อนสารตั้งต้นเข้าไปในระบบและอัตราการไหลออกจากระบบ CEMR ของผลิตภัณฑ์เป็นสิ่งจำเป็นต่อสมรรถนะของระบบ ซึ่งส่งผลต่อค่าคอนเวอร์ชั่นและปริมาณผลผลิต (Alam *et al*., 2011) Figure 2 แสดงผลของการเติมสารตั้งต้นแบบต่างๆ ต่อค่าฟลักซ์ของเพอมิเอทในระบบ CEMR โดยใช้สารละลายโปรตีนจากเนื้อปลานิลความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ 1 และอัตราการกรองเริ่มต้นที่ปริมาตรสูงสุด พบว่า การเติมสารตั้งต้นรูปแบบ A คือมีการเติมสารตั้งต้นอย่างต่อเนื่องในอัตราเท่ากับการไหลออกของเพอมิเอทมีประสิทธิภาพดีที่สุด คือให้ค่าเพอมิเอทฟลักซ์คงที่ มากกว่ารูปแบบ B C และ D ตามลำดับ อธิบายจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้นและเอนไซม์ในระดับที่เหมาะสมทำให้ได้ค่าเพอมิเอทฟลักซ์สูง และเกิดเมมเบรนฟาวลิ่งลดลง อย่างไรก็ตามการเพิ่มสารตั้งต้นมากถึงร้อยละ 25 ของปริมาตรเริ่มต้น ส่งผลให้ค่าฟลักซ์ของเพอมิเอทลดลงเมื่อเวลาการกรองนานขึ้น เนื่องจากการสะสมของปริมาณโปรตีนในระบบ สอดคล้องกับการรายงานผลของ Kim และคณะ (1993) ศึกษารูปแบบการเติมสารตั้งต้นในการผลิตไซโคลเดกตริน (cyclodextrin) จากสตาร์ชข้าวโพดในระบบปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์ พบว่าการเติมสารตั้งต้นอย่างต่อเนื่องในระดับที่สมดุลกับการไหลออกของเพอมิเอทส่งผลดีต่อประสิทธิภาพในการกรอง

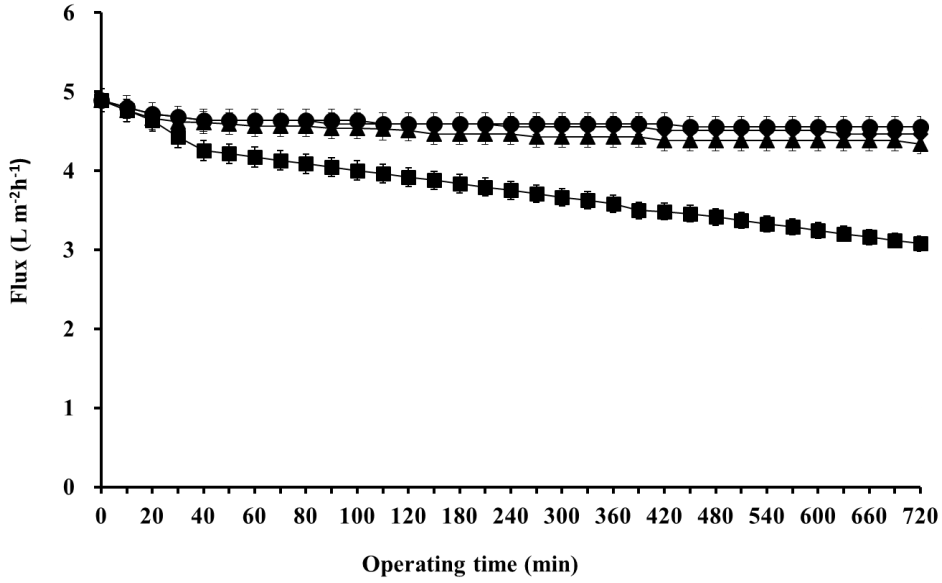

Figure 2 Effect of substrate feeding pattern on permeate flux during CEMR system (S_0 = 1 % w/v, E_0 = 20 unit g^{-1}protein, pre-hydrolysis time = 90 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL) (●,◆,▲ and ■; permeate flux of pattern A, B, C and D, respectively)

ค่าฟลักซ์ของเพอมิเอทเกิดการเปลี่ยนแปลงที่เวลาในการกรองต่างๆ อธิบายได้จากผลของการเกิดเมมเบรนฟลาวลิ่ง (Table 1) พบว่า เมื่อใช้รูปแบบ A B C และ D ค่าความต้านทานรวม ค่าความต้านทานฟาวลิ่งผันกลับได้ ค่าความต้านทานฟาวลิ่งภายนอกแบบผันกลับไม่ได้ และค่าความต้านทานฟาวลิ่งภายในแบบผันกลับไม่ได้ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) การเติมสารตั้งต้นรูปแบบ A ให้ค่าความต้านทานฟาวลิ่งผันกลับได้ ค่าความต้านทานฟาวลิ่งภายนอกแบบผันกลับไม่ได้ และค่าความต้านทานฟาวลิ่งภายในแบบผันกลับไม่ได้ต่ำกว่ารูปแบบ B C และ D ตามลำดับ จากผลการทดลองที่ได้ชี้ให้เห็นว่าการเติมสารตั้งต้นอย่างต่อเนื่องเท่ากับการไหลออกของเพอมิเอทให้ค่าเมมเบรนฟลาวลิ่งในระดับต่ำ เนื่องจากการทำงานที่มีประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการย่อยสารตั้งต้นอย่างสมดุล ช่วยลดอนุภาคของโปรตีนขนาดใหญ่ลง ซึ่งโปรตีนอนุภาคขนาดใหญ่เป็นสาเหตุทำให้เกิดเมมเบรนฟลาวลิ่งได้ นอกจากนี้ยังส่งผลให้อัตราการย่อยโปรตีนเป็นเพปไทด์ขนาดเล็กเกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่อง ความต้านทานรวมเพิ่มขึ้นเมื่อใช้รูปแบบ B C และ D ตามลำดับ ชี้ให้เห็นถึงแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของเมมเบรนฟลาวลิ่งในระบบ

Table 1 Membrane fouling of UF membrane in CEMR at TMP of 1.3 bar and CFV of 1.5 m s^{-1}as varying substrate feeding pattern

Substrate feeding pattern	R_t/R_m	R_{rf}/R_m	R_{if}/R_m	$R_{if\text{-}ex}/R_m$	$R_{if\text{-}in}/R_m$
A	1.3	1.0	0.2	0.12	0.10
B	1.3	1.0	0.3	0.14	0.16
C	1.6	1.0	0.6	0.35	0.22
D	2.0	1.2	0.8	0.46	0.38

การติดตามผลของรูปแบบการเติมสารตั้งต้นต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในระบบ พบว่า การเติมสารตั้งต้นรูปแบบ A ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงสูงกว่ารูปแบบ B C และ D ในระบบ CEMR (Figure 3) Paolucci-Jeanjean และคณะ (2000a) อธิบายการลดลงของกิจกรรมเอนไซม์อาจเกิดขึ้นจากหลายสาเหตุ เช่น แรงเฉือน อุณหภูมิ และการดูดซับของเมมเบรน Lyagin และคณะ (2012) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ในระบบปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์ พบว่า การลดลงของกิจกรรมเอนไซม์เกิดขึ้นเนื่องจากความเสียหายและการถูกดูดซับของเอนไซม์เมื่อผ่านระบบ ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ในส่วนของเพอมิเอท โดยทำการยืนยันผลการทดสอบจากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งในส่วนของเพอมิเอทและรีเทนเทท

Table 2 แสดงผลของรูปแบบการเติมสารตั้งต้นในระบบ CEMR ต่อค่าเฉลี่ยการส่งผ่านโปรตีนและกิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE พบว่า รูปแบบการเติมสารตั้งต้นส่งผลต่อค่าการส่งผ่านโปรตีนและกิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยรูปแบบ A B และ C ให้ค่าการส่งผ่านโปรตีนสูงกว่ารูปแบบ D อาจเกิดจากรูปแบบ D มีอัตราการเติมสารตั้งต้นไม่สมดุลกับการไหลออกไปของผลิตภัณฑ์ในระบบ CEMR ทั้งนี้ยังส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ลงลง สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของเมมเบรนฟลาวลิ่ง รูปแบบ A จะให้ค่ากิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงที่สุดสอดคล้องกับค่าเพอมิเอทฟลักซ์และค่าการส่งผ่านโปรตีน อาจเนื่องจากความสมดุลของการทำปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้นและเอนไซม์อยู่ในระดับที่เหมาะสม ดังนั้นรูปแบบ A จึงถูกคัดเลือกเพื่อใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

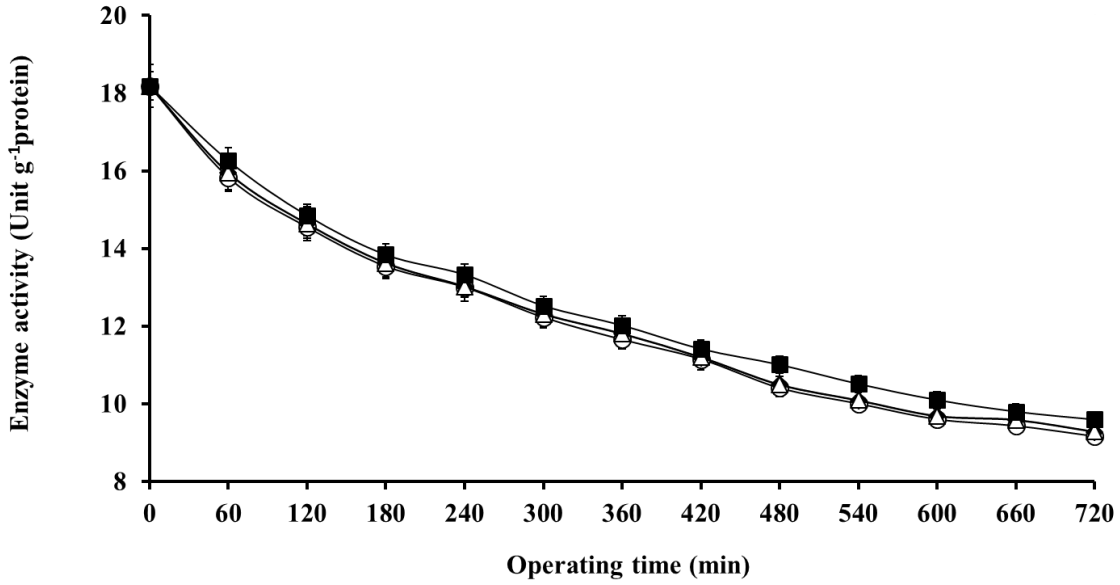

Figure 3 Effect of substrate feeding pattern on enzyme activity during CEMR system (S_0 = 1 % w/v, E_0 = 20 unit g^{-1}protein, pre-hydrolysis time = 90 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL) (○, ◆, △ and ■; permeate flux of pattern A, B, C and D, respectively)

Table 2 Effect of substrate feeding pattern on average of T_p and bioactive activities during CEMR system (S_0 = 1 % w/v, E_0 = 20 unit g^{-1}protein, pre-hydrolysis time = 90 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL)

T_p and bioactive activities	Substrate feeding pattern			
	A	B	C	D
T_p (%)	85.35±0.01^c	83.45±0.02^b	81.67±0.03^b	78.12±0.04^a
ACE assay*	93.34±0.03^d	91.11±0.04^c	90.05±0.03^b	88.76±0.03^a

a, b, c and d mean with same row sharing same letter were not significantly (P<0.05) different.
* Unit for ACE assay is µg captopril g^{-1} protein

โดยทั่วไปแล้วระบบ CEMR ไม่เพียงแต่จะเป็นระบบที่มีการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ได้อย่างคุ้มค่า ยังเป็นระบบที่สามารถคัดแยกผลิตภัณฑ์เป้าหมายที่ต้องการอย่างมีประสิทธิภาพ การเติมสารตั้งต้นรูปแบบ A ให้ค่าคอนเวอร์ชั่น หรือการเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบไปเป็นผลผลิตที่สนใจ และ ค่าผลิตภาพที่สูงกว่ารูปแบบ B C และ D (Figure 4 และ 5) ผลการทดลองที่สังเกตได้ พบว่า ค่าคอนเวอร์ชั่น และ

ค่าผลิตภาพของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE เมื่อมีการเติมสารตั้งต้นรูปแบบ A B C และ D มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อเวลาระยะเวลาการดำเนินการในระบบ CEMR เพิ่มขึ้น ในทางปฏิบัติการค่าคอนเวอร์ชันคือการเปลี่ยนวัตถุดิบเริ่มต้นซึ่งเป็นโปรตีนสายยาวเป็นเพปไทด์สาย ดังนั้นค่าคอนเวอร์ชั่นสูงของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูง หมายถึง การผลิตเพปไทด์สายสั้นที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูง ในส่วนของค่าผลิตภาพคำนวณในรูปของปริมาณเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ที่ผลิตได้ต่อยูนิตของเอนไซม์ ค่าผลิตภาพจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับกิจกรรมของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า การเติมสารตั้งต้นรูปแบบ D ให้ค่าคอนเวอร์ชันและค่าผลิตภาพต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการเติมสารตั้งต้นรูปแบบอื่นในระบบ CEMR

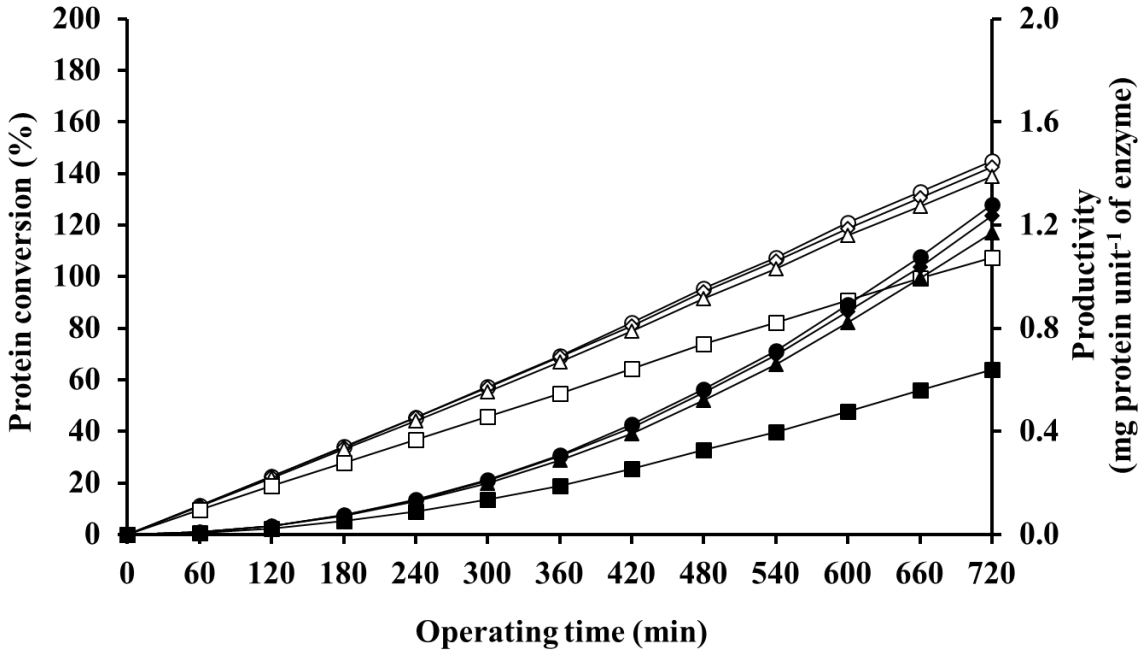

Figure 4 Effect of substrate feeding pattern on protein conversion and productivity of protein during CEMR system (S_0 = 1 % w/v, E_0 = 20 unit g^{-1}protein, pre-hydrolysis time = 90 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL) (○,◇, △ and □; conversion of pattern A, B, C and D and ●, ◆, ▲ and ■; productivity of pattern A, B, C and D, respectively)

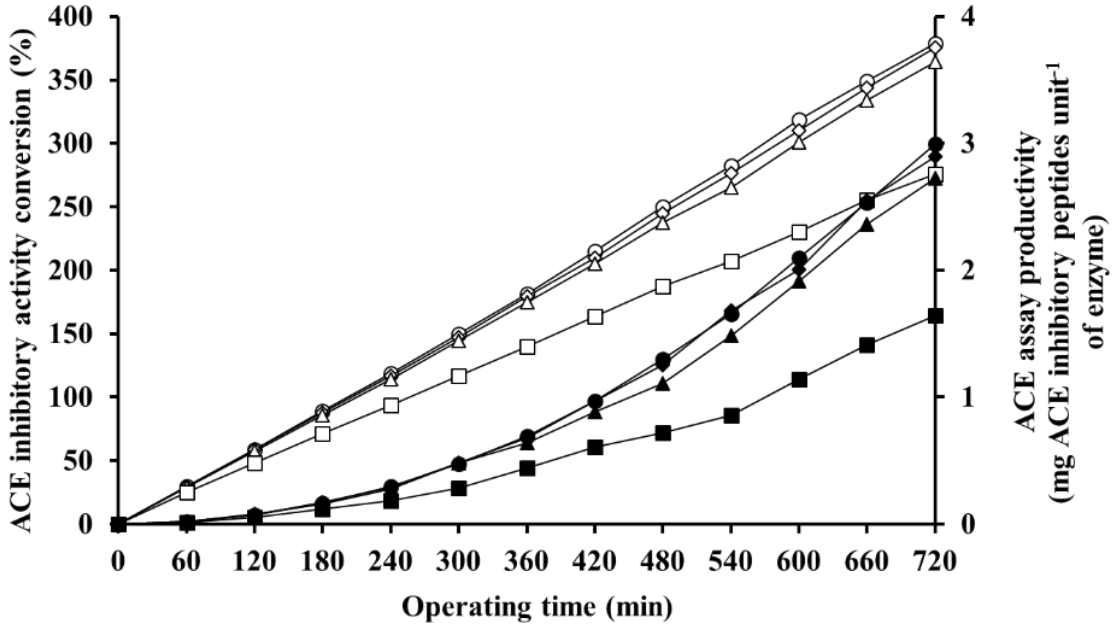

Figure 5 Effect of substrate feeding pattern on ACE inhibitory capacity conversion and productivity of ACE peptides during CEMR system (S_0 = 1 % w/v, E_0 = 20 unit g^{-1}protein, pre-hydrolysis time = 90 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL) (○,◇, △ and □; conversion of pattern A, B, C and D and ●, ◆, ▲ and ■; productivity of pattern A, B, C and D, respectively)

1.2 การศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อประสิทธิภาพของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยระบบ CEMR

ความเข้มข้นของเอนไซม์มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพของระบบ CEMR รวมถึง ระดับการย่อย ค่าคอนเวอร์ชั่น ค่าผลิตภาพ เพอมิเอทฟลักซ์ และ เมมเบรนฟลาวลิ่ง ที่ส่งผลต่อค่าใช้จ่ายในการผลิต (Paolucci-Jeanjea *et al*., 2000b) ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อระดับการย่อยแสดงใน Figure 6 พบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการย่อยส่งผลต่อระดับการย่อย ซึ่งระดับการย่อยเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 60 นาทีแรก ร้อยละการย่อยประมาณ 35 ให้ค่ากิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูง (Charoenphun *et al*., 2013) ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาการย่อยที่ 10 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน (150 นาที) 15 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน (120 นาที) และ 20 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน (90 นาที) ถูกเลือกมาใช้สำหรับการศึกษาในระบบ CEMR เนื่องจากให้ค่าระดับการย่อยประมาณร้อยละ 35

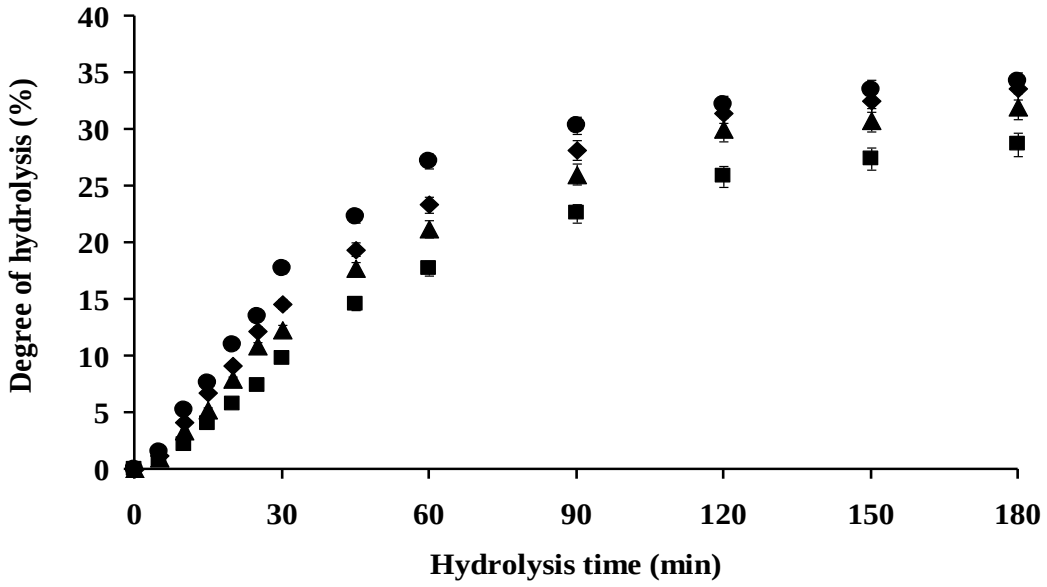

Figure 6 Effect of enzyme concentration on degree of hydrolysis (S_0 = 1 % w/v, temperature = 50 ^{0}C and ■, ▲, ◆, and ●; E = 5, 10, 15, and 20 unit g^{-1}protein, respectively)

ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อค่าฟลักซ์ของเพอมิเอทที่ผ่านระบบ CEMR โดยใช้รูปแบบการเติมสารตั้งต้นรูปแบบ A (Figure 7) พบว่า ที่ความเข้มข้น 20 ยูนิตต่อกรัมโปรตีนค่อยๆ ลดลงในช่วง 60 นาที แรก โดยค่าฟลักซ์ของเพอมิเอทเฉลี่ย 4.61 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง เป็นเวลา 720 นาที ค่าฟลักซ์ของเพอมิเอทเฉลี่ยที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 15 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน เท่ากับ 4.60 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 20 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน ค่าฟลักซ์ของเพอมิเอทที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 15 และ 20 ยูนิตต่อกรัมโปรตีนมีค่าสูง แสดงให้เห็นถึงปริมาณที่เหมาะสมต่อการทำงานของสารตั้งต้นและเอนไซม์ในระบบ การเปลี่ยนแปลงของค่าฟลักซ์เพอมิเอทเมื่อระยะเวลาในการดำเนินการในระบบ 720 นาที ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ระดับต่างๆ กัน ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเมมเบรนฟลาวลิ่ง (Table 3) โดยค่าความต้านทานรวม ค่าความต้านทานฟาวลิ่งผันกลับได้ ค่าความต้านทานฟาวลิ่งภายนอกแบบผันกลับไม่ได้ และค่าความต้านทานฟาวลิ่งภายในแบบผันกลับไม่ได้ ของเมมเบรนลดลงแปรผกผันกับการเพิ่มของความเข้มข้นของเอนไซม์ ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 10 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน มีแน้วโน้มการเมมเบรนเกิดฟลาวลิ่งสูงที่สุด แนวโน้มของการเกิดฟลาวลิ่ง ค่าความต้านทานฟาวลิ่งผันกลับได้ของเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 15 และ 20 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

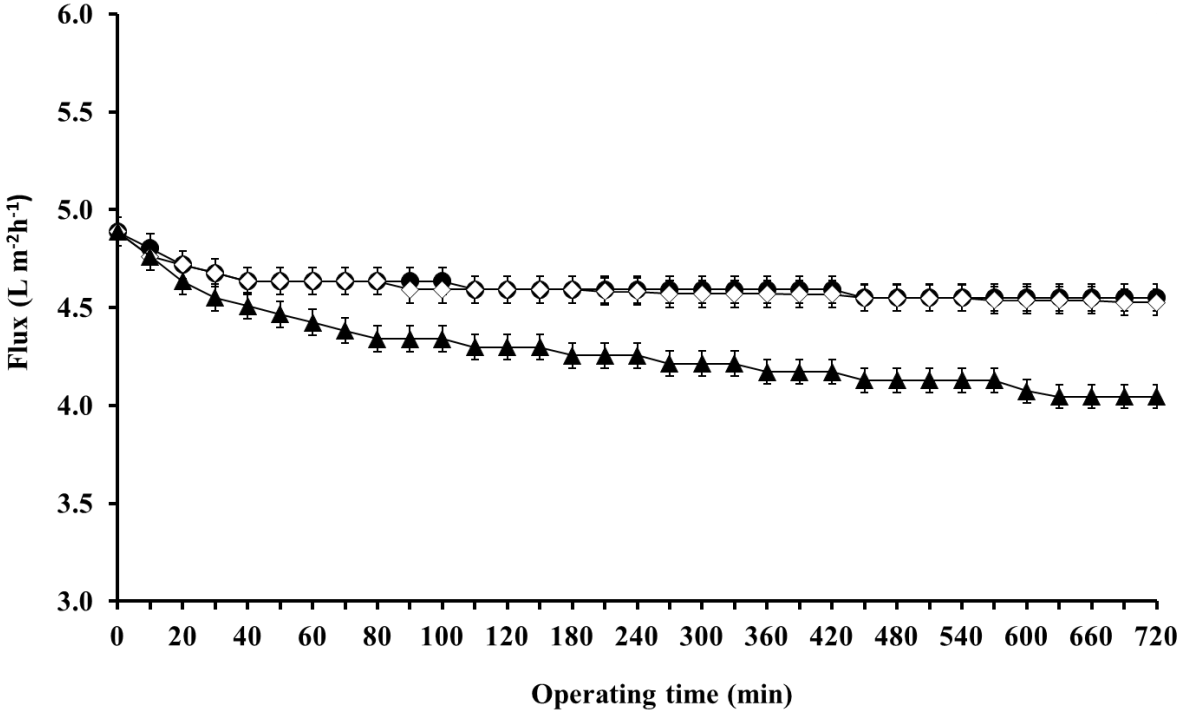

Figure 7 Effect of enzyme concentration on permeate flux during CEMR system using substrate feeding pattern A (S_0 = 1 % w/v, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL) (▲,◇, and ●; permeate flux of *E* (pre-hydrolysis time) = 10 unit g^{-1}protein (150 min), 15 unit g^{-1}protein (120 min), and 20 unit g^{-1}protein (90 min), respectively)

Table 3 Membrane fouling of UF membrane in CEMR at TMP of 1.3 bar and CFV of 1.5 m s^{-1}as varying enzyme concentration

Enzyme concentration (unit g^{-1}protein)	R_t/R_m	R_{rf}/R_m	R_{if}/R_m	$R_{if\text{-}ex}/R_m$	$R_{if\text{-}in}/R_m$
10	1.6	1.1	0.30	0.31	0.16
15	1.5	1.0	0.24	0.15	0.14
20	1.3	1.0	0.22	0.12	0.10

ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในระบบ CEMR (Figure 8) ความเข้มข้นของเอนไซม์และการย่อยสารละลายโปรตีนก่อนเติมในระบบ CEMR ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาการย่อยที่ 10 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน (150 นาที) 15 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน (120 นาที) และ 20 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน (90 นาที) ที่ระดับการย่อยประมาณร้อยละ 35 การใช้เอนไซม์ความเข้มข้นสูง ใช้เวลาใน

การย่อยน้อยกว่าเนื่องจากโอกาสที่เอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้ดีกว่า จากผลการทดลองพบว่าเมื่อระยะเวลาดำเนินการในระบบ CEMR นานขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์มีแนวโน้มลดลง Mannheim และ Cheryan (1990) อธิบายถึงสาเหตุการลดลงของกิจกรรมเอนไซม์ในระบบปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์ เกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย อาทิ อุณหภูมิที่สูงเกินไป การถูกดูดซับเมื่อกรองผ่านเมมเบรน แรงเฉือน ตัวยับยั้งเอนไซม์ที่อาจเกิดขึ้นในระบบ เป็นต้น

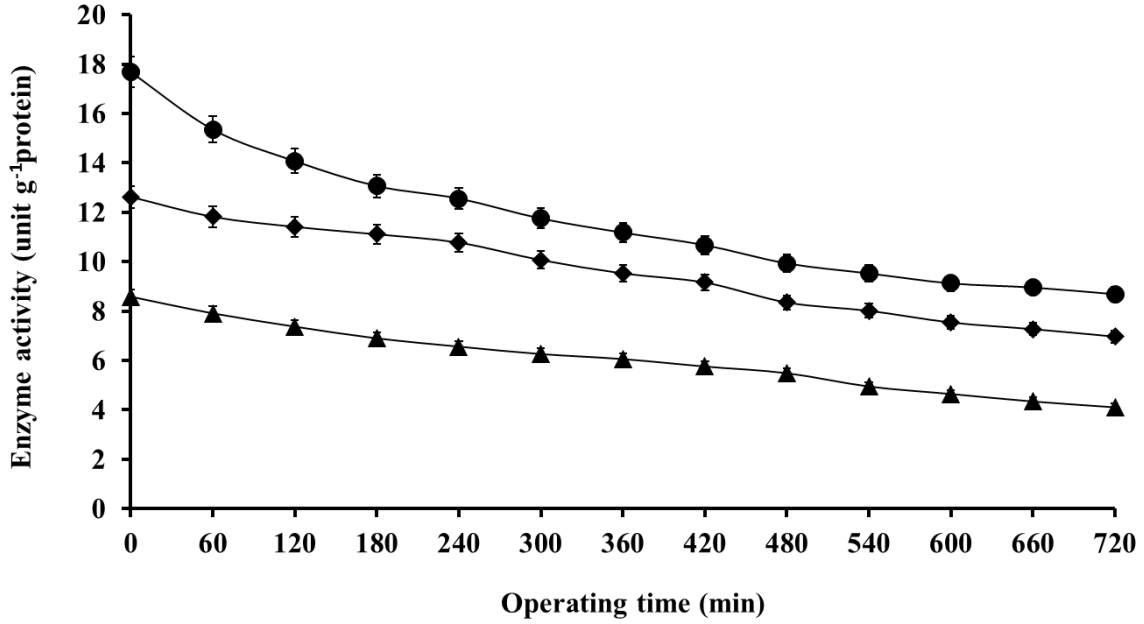

Figure 8 Effect of enzyme concentration on enzyme activity during CEMR system using substrate feeding pattern A (S_0 = 1 % w/v, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL) (▲, ◆, and ●; enzyme activity at E_0 (pre-hydrolysis time) = 10 unit g^{-1}protein (150 min), 15 unit g^{1}protein (120 min), and 20 unit g^{-1}protein (90 min), respectively)

ผลของความเข้มข้นเอนไซม์ต่อค่าเฉลี่ยของการส่งผ่านโปรตีนและกิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ในระบบ CEMR (Table 4) ที่ความเข้มข้น 15 และ 20 ยูนิตต่อกรัมโปรตีนของการส่งผ่านโปรตีน ค่าการส่งผ่านโปรตีนและกิจกรรมเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ในระบบ CEMR ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) การสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์มีแนวโน้มลดลงสูงกว่าที่ความเข้มข้น 10 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน ขณะที่ค่าฟลักซ์ของเพอมิเอทมีแนวโน้มลดลงสอดคล้องกับการรายงานของ Paolucci-Jeanjean *et al.*, (2000b)

Table 4 Effect of enzyme concentration on average of T_p and bioactive activities during CEMR system using substrate feeding pattern A (S_0 = 1 % w/v, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, time = 720 min, initial volume = 550 mL)

T_p and bioactive activities	Enzyme concentration (unit g^{-1}protein)		
	10 (120 min*)	15 (90 min*)	20 (60 min*)
T_p (%)	81.45±0.02^c	85.20±0.02^c	85.35±0.02^c
ACE assay*	88.38±0.03^d	93.00±0.03^d	93.34±0.03^d

a, b and c mean with same row sharing same letter were not significantly (P<0.05) different

* is pre-hydrolysis time

** Unit for ACE assay is μg captopril g^{-1} protein

ค่าคอนเวอร์ชั่นและค่าผลิตภาพของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ที่ 15 และ 20 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน ในระบบ CEMR ให้ค่าไม่แตกต่างกัน (Figure 9 และ 10) Deeslie และ Cheryan (1981) รายงานผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ในกระบวนการผลิตโปรตีนถั่วเหลืองในระบบปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์ ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ำคือ ปริมาณ 0.011 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณผลิตผลที่ได้มีปริมาณน้อยกว่าที่ความเข้มข้นของเอนไซม์สูง (0.012 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 10 เท่า สอดคล้องกับการรายงานของ Olano-Martin และคณะ (2001) ที่ศึกษาเกี่ยวกับผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อการผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ในระบบ CEMR Paolucci-Jeanjean และคณะ (2000b) ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อค่าคอนเวอร์ชั่นในระบบ CEMR โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ในช่วง 1.2-5.5 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อกิโลกรัม พบว่า ค่าคอนเวอร์ชั่นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ในระบบมีปริมาณเพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 2 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อกิโลกรัม มีค่าคอนเวอร์ชั่นร้อยละ 61

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 10 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน ให้ค่าคอนเวอร์ชั่นและค่าผลิตภาพต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับที่ความเข้มข้น 15 และ 20 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน สอดคล้องกับผลการเปลี่ยนแปลงค่าฟลักซ์ของเพอมิเอท การส่งผ่านโปรตีน และการเกิดเมมเบรนฟลาวลิ่ง ดังนั้นที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 15 ยูนิตต่อกรัมโปรตีนถูกคัดเลือกเพื่อทำการศึกษาผลของ gas-liquid two-phase flow ต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยระบบ CEMR ในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากว่าเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม ให้ประสิทธิภาพการผลิตดี ไม่แตกต่างกับที่ความเข้มข้น 20 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน

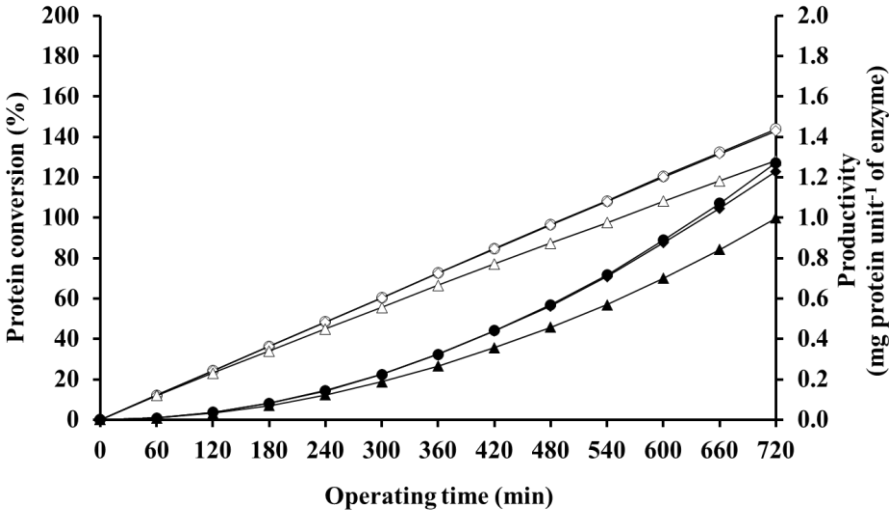

Figure 9 Effect of enzyme concentration on protein conversion and productivity of protein during CEMR system using substrate feeding pattern A (S_0 = 1 % w/v, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL) (△, ◇, and ○; conversion and ▲, ◆, and ●; productivity at E_0 (pre-hydrolysis time) = 10 unit g^{-1}protein (150 min), 15 unit g^{-1}protein (120 min), and 20 unit g^{-1}protein (90 min), respectively)

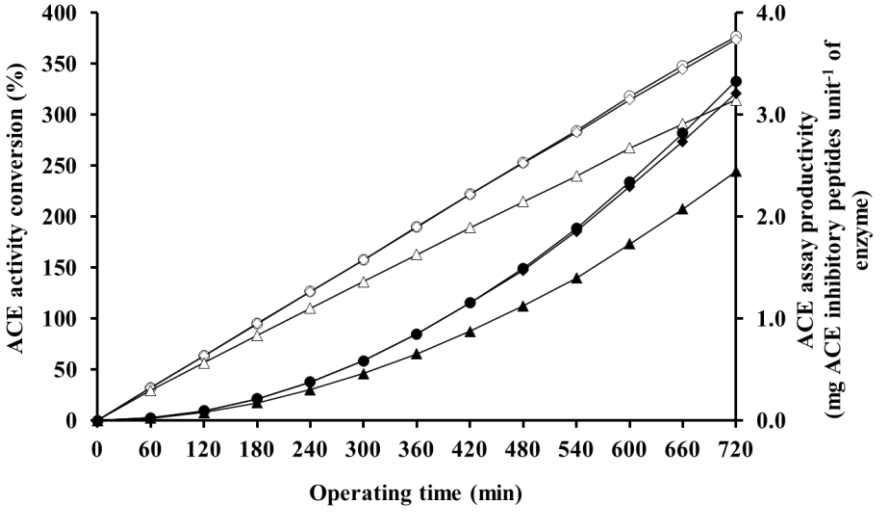

Figure 10 Effect of enzyme concentration on ACE inhibitory conversion and productivity of ACE inhibitory peptides during CEMR system using substrate feeding pattern A (S_0 = 1 % w/v, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.3 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL) (△, ◇, and ○; conversion and ▲, ◆, and ●; productivity at E_0 (pre-hydrolysis time) = 10 unit g^{-1}protein (150 min), 15 unit g^{-1}protein (120 min), and 20 unit g^{-1}protein (90 min), respectively)

1.3 ศึกษาผลของ gas-liquid two-phase flow ต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยระบบ CEMR

การประยุกต์ใช้ gas-liquid two-phase flow ในระบบ CEMR เป็นเทคนิคหนึ่งที่น่าสนใจ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกรองได้ การใช้ระบบแก๊สจะส่งผลกระทบความเสียหายของเมมเบรนน้อย และช่วยส่งเสริมให้การแยกง่ายขึ้น (Li *et al.*, 2008) Figure 11 แสดงผลของ gas-liquid two-phase flow ต่อค่าฟลักซ์ของเพอมิเอทในระบบ CEMR พบว่า ที่ค่า gas injection factor เท่า 0.5 ค่าฟลักซ์ของเพอมิเอทค่อยๆ ลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง 30 นาทีแรกของการกรอง จากนั้นค่าฟลักซ์ของเพอมิเอทเริ่มคงที่ในเวลาดำเนินการ 720 นาที มีค่าฟลักซ์ของเพอมิเอทเฉลี่ยเท่ากับ 4.87 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาการใช้ gas-liquid two-phase flow ในการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยระบบ CEMR ส่วนใหญ่จะประยุกต์ใช้ gas-liquid two-phase flow ในระบบบำบัดน้ำเสีย Nogue (2005) รายงานการใช้ gas-liquid two-phase flow ช่วยลดการเกิดฟลาวลิ่งได้เป็นอย่างดีในกระบวนการกรองโปรตีนนม และไลโซไซม์

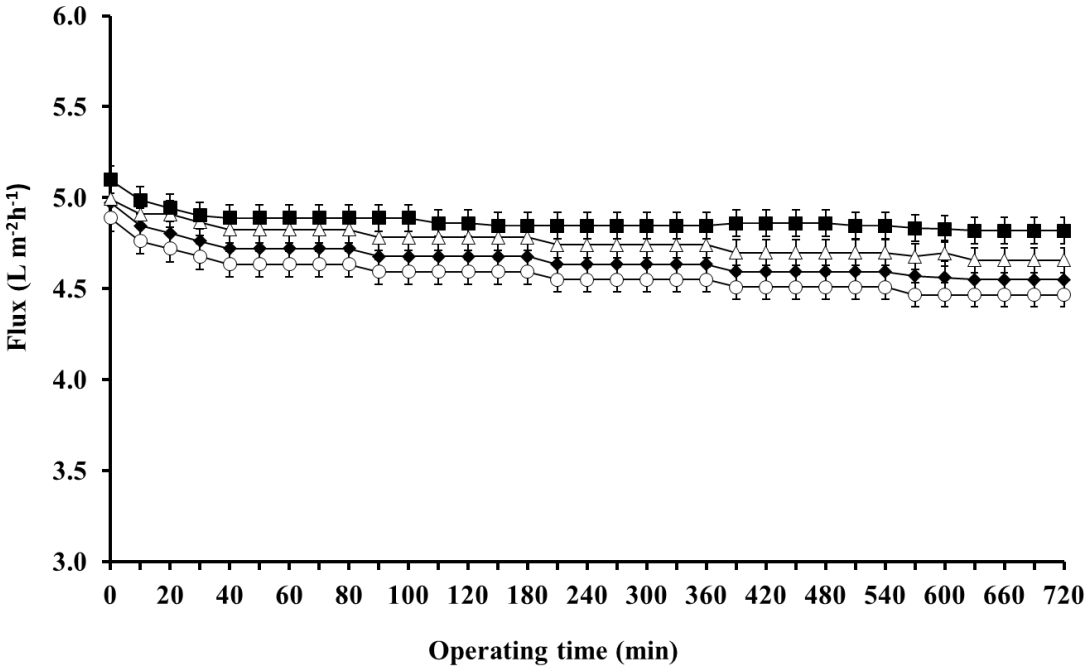

Figure 11 Effect of gas-liquid two-phase flow on permeate flux during CEMR system using substrate feeding pattern A (E_0 = 15 unit g^{-1}protein, S_0 = 1 % w/v, pre-hydrolysis time = 120 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL) (○, ◆, △ and ■; permeate flux of ε = 0, 0.25, 0.35 and 0.5, respectively)

การเปลี่ยนแปลงค่าฟลักซ์ของเพอมิเอทเมื่อเวลาในการดำเนินการเพิ่มขึ้นสามารถอธิบายจากการเกิดเมมเบรนฟลาวลิ่ง (Table 5) จากผลการทดลองพบว่า ค่าความต้านทานรวม ค่าความต้านทาน

ฟาวลิ่งผันกลับได้ ค่าความต้านทานฟาวลิ่งภายนอกแบบผันกลับไม่ได้ และค่าความต้านทานฟาวลิ่งภายในแบบผันกลับไม่ได้ ของเมมเบรนลดลงแปรผกผันกับการเพิ่มของค่า gas injection factor โดยทั่วไป ค่าความต้านทานฟาวลิ่งผันกลับได้สามารถกำจัดได้ง่ายด้วยแรงเฉือน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสารละลายที่มีอนุภาคขนาดเล็ก เช่น เพปไทด์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก (ขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน) ค่าความต้านทานฟาวลิ่งภายนอกแบบผันกลับได้ และค่าความต้านทานฟาวลิ่งภายในแบบผันกลับได้ จะลดลงเมื่อค่า gas injection factor เพิ่มขึ้น การกรองสารละลายที่มีอนุภาคขนาดใหญ่และขนาดเล็กผสมกันด้วยอัลตราฟิลเตรชัน การเกิดคอนเซนเทรชัน โพลาไรเซชันของโมเลกุลขนาดใหญ่ จะถูกกำจัดออกด้วยแรงเฉือนด้วยแรงที่ผิวหน้าเมมเบรน จากการพาของฟองอากาศส่งผลให้เมมเบรนฟลาวลิ่งลดลง (Cui *et al*., 2003) ในการศึกษาครั้งนี้การประยุกต์ใช้ gas-liquid two-phase flow ทำให้เกิดแรงเฉือนในระบบส่งเสริมการเคลื่อนที่ของเพปไทด์ที่มีอนุภาคขนาดเล็ก เกิดฟลาวลิ่งลดลงเมื่อเพิ่มค่า gas injection factor

Table 5 Membrane fouling of UF membrane in CEMR at TMP of 1.3 bar and CFV of 1.5 m s^{-1}as varying gas injection factor

Injection factor (ε)	R_t/R_m	R_{rf}/R_m	R_{if}/R_m	$R_{if\text{-}ex}/R_m$	$R_{if\text{-}in}/R_m$
0	1.3	1.05	0.30	0.16	0.14
0.25	1.2	1.01	0.16	0.16	0.00
0.35	1.0	0.93	0.10	0.10	0.00
0.50	0.9	0.87	0.05	0.05	0.00

จากการศึกษาผลของการประยุกต์ใช้ gas-liquid two-phase flow ในระบบ CEMR ต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ (Figure 12) พบว่า การใช้แก๊สที่มีค่า gas injection factor เท่ากับ 0.5 ส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงมากที่สุดเมื่อเทียบกับระบบที่ไม่มีการเติมแก๊ส ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยระบบ CBEMR การลดลงของกิจกรรมเอนไซม์ในระบบอาจเกิดจากผลของฟองที่เกิดขึ้นเมื่อมีการเติมก๊าซส่งผลให้โครงสร้างของเอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลง (Clarkson *et al*., 1999) Table 6 แสดงผลของการประยุกต์ใช้ gas-liquid two-phase flow ในระบบ CEMR ต่อค่าเฉลี่ยการส่งผ่านโปรตีนและกิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE พบว่า ค่า gas injection factor แปรผันตรงกับค่าการส่งผ่านโปรตีนและกิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ที่ค่า gas injection factor เท่ากับ 0.5 ให้ค่าการส่งผ่านโปรตีนและกิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงที่สุด ชี้ให้เห็นว่าการประยุกต์ใช้ระบบ gas-liquid two-phase flow สามารถปรับปรุงระบบ CEMR ให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นได้

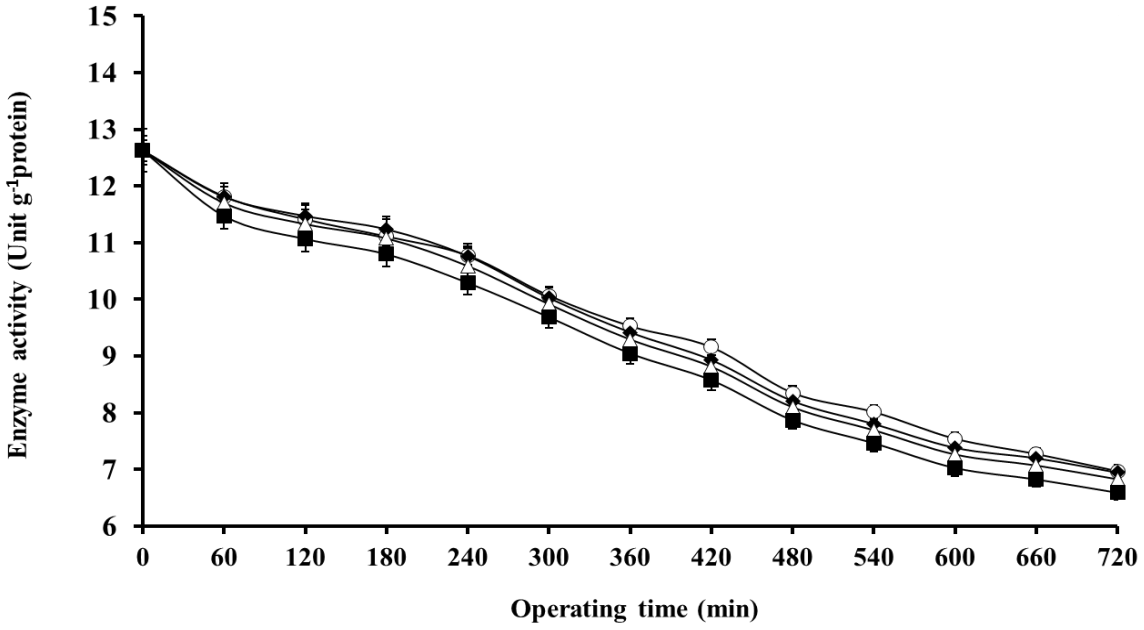

Figure 12 Effect of gas-liquid two-phase flow on enzyme activity during CEMR system using substrate feeding pattern A (E_0 = 15 unit g^{-1}protein, S_0 = 1 % w/v, pre-hydrolysis time = 120 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL) (○, ◆, △ and ■; permeate flux of ε = 0, 0.25, 0.35 and 0.5, respectively)

Table 6 Effect of gas-liquid two-phase flow on average of T_p and bioactive activities during CEMR system using substrate feeding pattern A (S_0 = 1 % w/v, E_0 = 15 unit.g^{-1}protein, pre-hydrolysis time = 120 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL)

T_p and bioactive activities	Gas injection factor (ε)			
	0	0.25	0.35	0.5
T_p (%)	85.20±0.05a	86.33±0.03b	87.60±0.04c	88.00±0.05c
ACE assay*	93.00±0.04a	93.76±0.05a	95.01±0.05b	95.45±0.05b

a, b, c and d mean with same row sharing same letter were not significantly (P<0.05) different.
*Unit for ACE assay is μg captopril g^{-1} protein

ผลของการประยุกต์ใช้ gas-liquid two-phase flow ในระบบ CEMR ต่อการเปลี่ยนแปลงค่าคอนเวอร์ชั่นและผลิตภาพของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE (Figure 13 และ 14) พบว่า ที่ค่า gas injection factor เท่ากับ 0.5 ให้ค่าคอนเวอร์ชั่นและผลิตภาพมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 404 และ 3.6 มิลลิกรัมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ต่อยูนิตของเอนไซม์ และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น

อย่างต่อเนื่องเมื่อเวลาในการดำเนินการเพิ่มขึ้น ค่าการส่งผ่านโปรตีนของระบบที่ใช้ค่า gas injection factor เท่ากับ 0.35 และ 0.5 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังนั้นค่า gas injection factor เท่ากับ 0.35 จึงถูกคัดเลือกเพื่อใช้ในการศึกษาขั้นตอนถัดไป เมื่อเปรียบเทียบกับระบบ CBEMR พบว่า ระบบ CEMR มีประสิทธิภาพสูงกว่าเนื่องจากเป็นระบบที่ทำงานอย่างต่อเนื่อง สารตั้งต้นถูกเติมไปในระบบสมดุลกับการไหลออกของเพอมิเอท เอนไซม์และสารตั้งต้นทำปฏิกิริยากันในภาวะที่สมดุล และการใช้ gas-liquid two-phase flow ช่วยส่งเสริมการทำงานให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

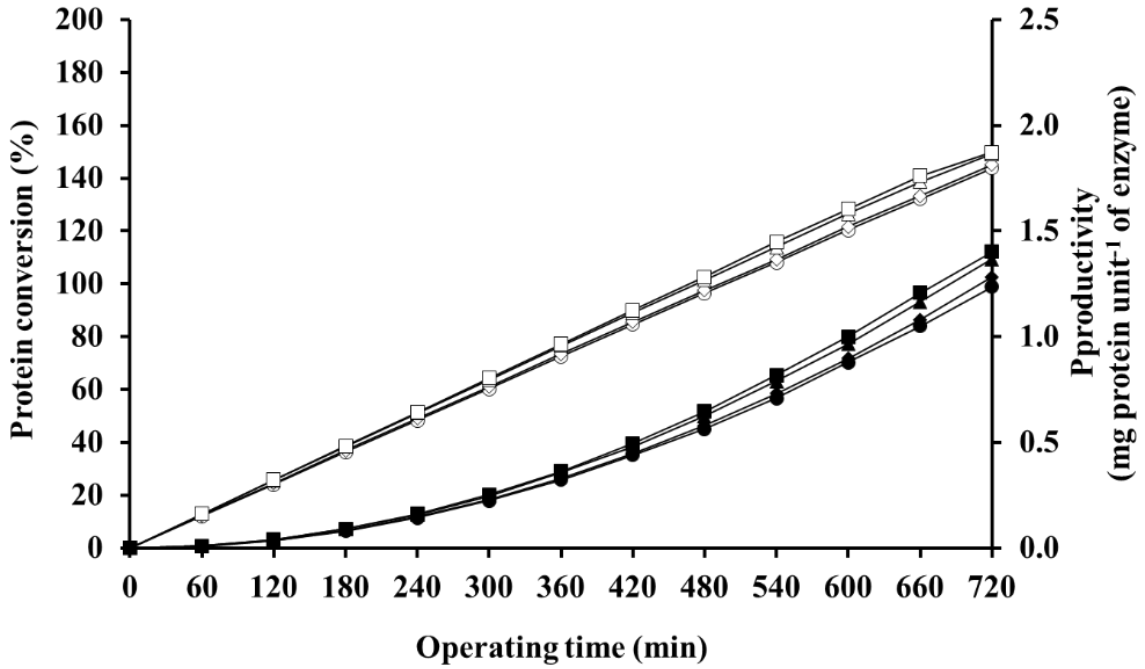

Figure 13 Effect of gas-liquid two-phase flow on protein conversion and productivity of protein during CEMR system using substrate feeding pattern A (E_0 = 15 unit g^{-1}protein, S_0 = 1 % w/v, pre-hydrolysis time = 120 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL) (○, ◇, △ and □; conversion of ε = 0, 0.25, 0.35 and 0.5 and ●, ◆, ▲ and ■; productivity of ε = 0, 0.25, 0.35 and 0.5, respectively)

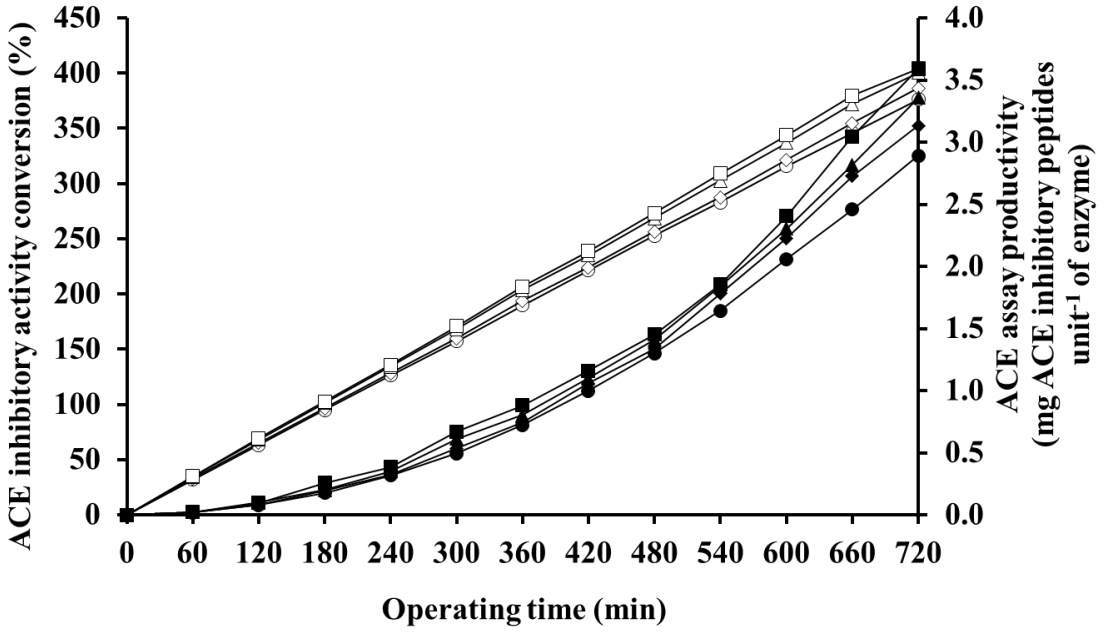

Figure 14 Effect of gas-liquid two-phase flow on ACE inhibitory capacity conversion and productivity of ACE inhibitory peptides during CEMR system using substrate feeding pattern A (E_0 = 15 unit g^{-1}protein, S_0 = 1 % w/v, pre-hydrolysis time = 120 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL) (○, ◇, △ and □; conversion of ε = 0, 0.25, 0.35 and 0.5 and ●, ◆, ▲ and ■; productivity of ε = 0, 0.25, 0.35 and 0.5, respectively)

2. การศึกษาผลของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ที่ผลิตได้ใน CEMR ต่อระบบ GI-tract

การติดตามผลของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ที่ผลิตได้ใน CEMR ต่อการย่อยในระบบจำลองทางเดินอาหาร โดยเปรียบเทียบระหว่าง เพปไทด์ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส เพปไทด์ส่วนของเพอมิเอทที่และรีเทนเททได้จากระบบ CEMR พบว่า เพปไทด์ที่ได้จากการย่อยสารละลายโปรตีนจากเนื้อปลานิลที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 15 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน เป็นเวลา 120 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยไม่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรน (pre-hydrolysate) (Figure 15) เพปไทด์จากส่วนของรีเทนเทท (Figure 16) และ ส่วนของเพอมิเอท (Figure 17) ที่ผ่านระบบ CEMR ภายใต้สภาะการกรองที่สารละลายโปรตีนจากเนื้อปลานิลมีความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาณเอนไซม์ 15 ยูนิตต่อกรัมโปรตีนเวลาในการย่อยเริ่มต้น 120 นาที ความดันขับ 1.3 บาร์ ความเร็วตามขวาง 1.5 เมตรต่อวินาที อุณหภูมิในการดำเนินการของระบบ 50 องศาเซลเซียส และปริมาตรเริ่มต้นในถังปฏิกรณ์ 550 มิลลิลิตร

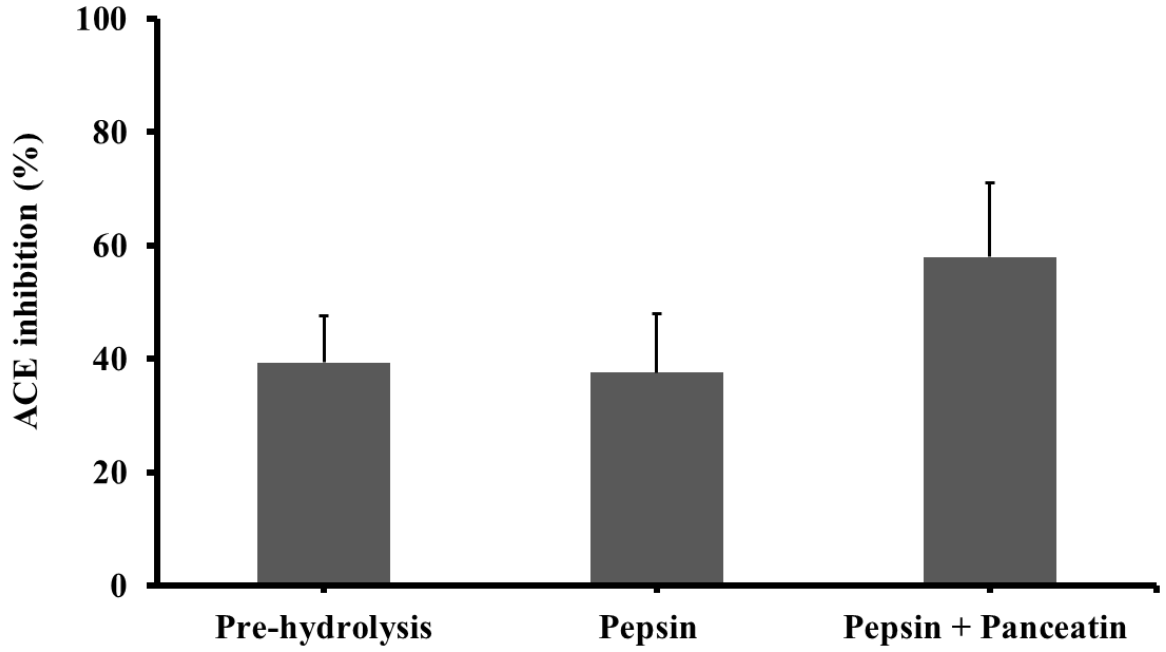

Figure 15 Effect of simulated gastrointestinal digestion on the ACE inhibitory activity of peptides in pre-hydrolysis (E_0 = 15 unit g^{-1}protein, S_0 = 1 % w/v, pre-hydrolysis time = 120 min, temperature = 50 ^{0}C, and initial volume = 550 mL). Pre-hudrolysis: The peptide solutions were incubated in buffer solutions (HCl and potassium chloride buffer). Pepsin: The peptide solutions were incubated with pepsin (20 ug/ml) solution for 4 hrs at 37°C. Pensin + panceatin: The peptide solutions were successively digested with pepsin for 4 hrs. They were further incubated in pancreatin solution for another 4 hrs at 37°C. The ACE inhibitory activity are expressed as mean ± standard deviation (n = 3).

เมื่อนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ในเปปซิน ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโปรตีน เป็นการจำลองการย่อยในกระเพาะอาหาร สร้างจากเซลล์ในกระเพาะอาหาร ส่วนแพนครีเอติน เป็นเอนไซม์ย่อยอาหารรวมหลายชนิด โดยประกอบไปด้วยเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรต เอนไซม์ย่อยไขมัน และเอนไซม์ย่อยโปรตีน พบว่า เพบไทด์จากส่วนของเพอมิเอทให้ค่าการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงที่สุด เมื่อพิจารณาการย่อยของเอนไซม์ในเพปไทด์ส่วนต่างๆ เริ่มจากส่วนของเพปไทด์ที่ไม่ผ่านการกรองแต่มีการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส พบว่า เมื่อนำไปย่อยด้วยเพปซินปริมาณการยับยั้งเอนไซม์ ACE มีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย และเมื่อย่อยต่อด้วยเอนไซม์แพนครีเอตินพบว่ากิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ ACE มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นที่ร้อยละ 58 ในส่วนของรีเทนเททมีแนวโน้มลดลงเมื่อผ่านการย่อยด้วยเพปซินและแพนครีเอตินโดยลดลงจากเดิมกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ ACE อยู่ที่ร้อยละ 75 และลดลงเหลือร้อยละ 66 และเพปไทด์ในส่วนของ

เพอมิเอทค่ากิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเดิมร้อยละ 88 เมื่อย่อยด้วยเพปซินมีค่าลดลงเหลือร้อยละ 70 และเมื่อย่อยต่อด้วยแพนครีเอตินมีค่าเท่ากับร้อยละ 93 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับเพปไทด์ใน pre-hudrolysis อาจเกิดจากในส่วนนี้มีเพปไทด์หลายขนาดรวมอยู่ ดังนั้นทำให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ ACE มีค่าต่ำกว่าส่วนของเพอมิเอท ซึ่งเพปไดท์ส่วนใหญ่เป็นเพปไทด์สายสั้นมีขนาดน้อยกว่า 1000 กิโลดาลตัน

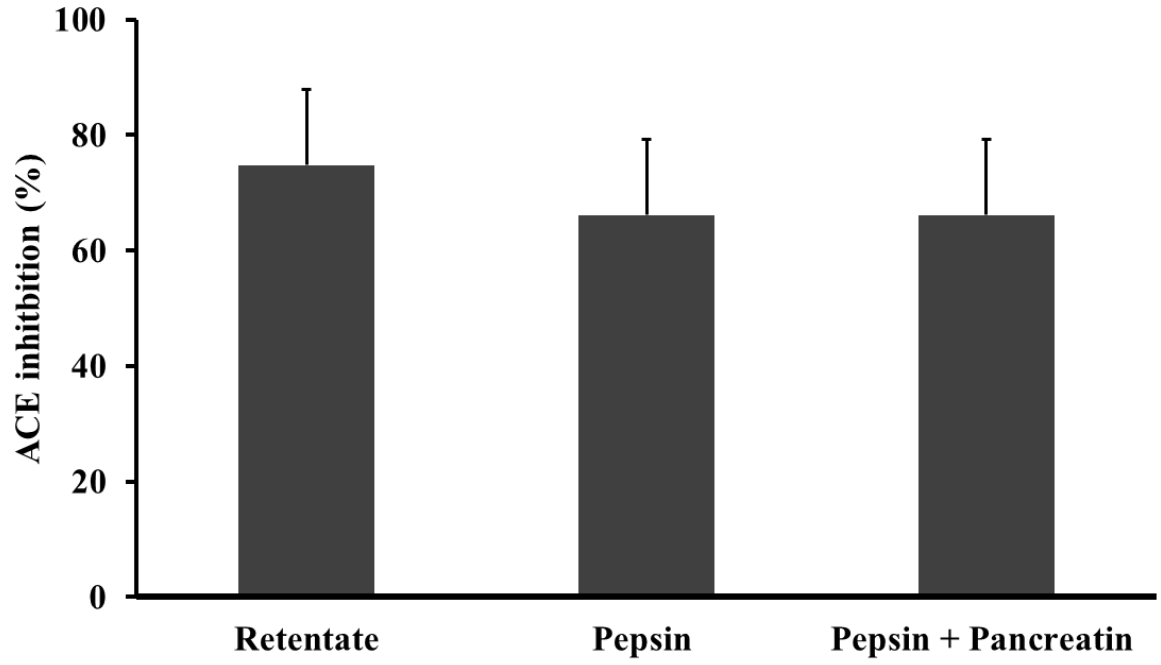

Figure 16 Effect of simulated gastrointestinal digestion on the ACE inhibitory activity of peptides in retentate (E_0 = 15 unit g^{-1}protein, S_0 = 1 % w/v, pre-hydrolysis time = 120 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, initial volume = 550 mL, and ε = 0.35). Retentate: The peptide solutions were incubated in buffer solutions (HCl and potassium chloride buffer). Pepsin: The peptide solutions were incubated with pepsin (20 ug/ml) solution for 4 hrs at 37°C. Pensin + panceatin: The peptide solutions were successively digested with pepsin for 4 hrs. They were further incubated in pancreatin solution for another 4 hrs at 37°C. The ACE inhibitory activity are expressed as mean ± standard deviation (n = 3).

เพปไทด์สายสั้นที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 2-20 หน่วย ถูกดูดซับที่ลำไส้ และมีเพปไทด์บางกลุ่มจะต่อต้านการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอสในระบบย่อยอาหารของร่างกาย (Sato *et al.*, 2016) เมื่อ

กลุ่มเพปไทด์ที่มีกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ ACE เข้าสู่ระบบย่อยอาหาร การติดตามความคงตัวของเพปไทด์และการออกฤทธิ์จึงเป็นสิ่งจำเป็น Lau และคณะ (2013) รายงานเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ ACE เมื่อผ่านการย่อยในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์จะมีการเปลี่ยนแปลงหลังจากการย่อยโดยเพปไทด์บางกลุ่มมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ในกระเพาะอาหาร และบางกลุ่มมีแนวโน้มลดลงเนื่องจากมีความต้านทานต่อระบบการย่อย เช่น เพปไทด์กลุ่ม VYPGG (Sato *et al*., 2016)

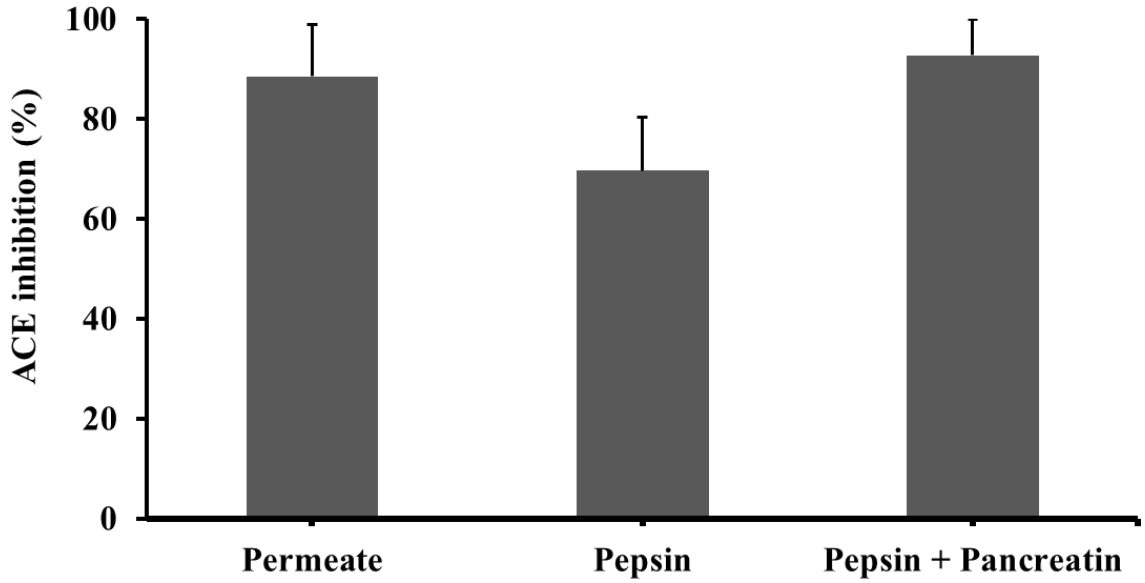

Figure 17 Effect of simulated gastrointestinal digestion on the ACE inhibitory activity of peptides in permeate (E_0 = 15 unit g^{-1}protein, S_0 = 1 % w/v, pre-hydrolysis time = 120 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1}, temperature = 50 ^{0}C, initial volume = 550 mL, and ε = 0.35). Permeate: The peptide solutions were incubated in buffer solutions (HCl and potassium chloride buffer). Pepsin: The peptide solutions were incubated with pepsin (20 ug/ml) solution for 4 hrs at 37°C. Pensin + panceatin: The peptide solutions were successively digested with pepsin for 4 hrs. They were further incubated in pancreatin solution for another 4 hrs at 37°C. The ACE inhibitory activity are expressed as mean ± standard deviation (n = 3).

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ของโปรตีนจากเนื้อปลานิลด้วยเมมเบรนระบบ CEMR ผลของการเติมสารตั้งต้นรูปแบบ A เป็นระบบที่มีการเติมสารตั้งต้นอย่างต่อเนื่องในอัตราที่เท่ากับการไหลออกของเพอมิเอทมีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ ให้ค่าฟลักซ์ของเพอมิเอทคงที่ และมีการเกิดเมมเบรนฟลาวลิ่งต่ำที่สุด

2. ผลการศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ พบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมภายใต้สภาวะการดำเนินการที่กำหนดเท่ากับ 15 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน เนื่องจากให้ค่าฟลักซ์ของเพอมิเอทสูง การเกิดเมมเบรนฟลาวลิ่งต่ำ และค่ากิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงไม่แตกต่างจากที่ 20 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน

3. การพัฒนากระบวนการผลิตโดยการประยุกต์ใช้ระบบ CEMR พบว่า ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 15 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน เวลาที่เหมาะสมในการย่อยสารละลายโปรตีนจากเนื้อปลานิลก่อนการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE คือ 120 นาที และความดันขับและความเร็วตามขวางที่เหมาะสม คือ 1.3 บาร์ และ 1.5 เมตรต่อวินาที ตามลำดับ การใช้ gas-liquid two-phase flow ในการกรอง gas injection factor เท่ากับ 0.35 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับการกรองด้วย gas injection factor ที่ 0.5 ให้ค่าคอนเวอร์ชั่นและผลิตภาพของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูง คือ ร้อยละ 400 และ 3.4 มิลลิกรัมเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ต่อยูนิตของเอนไซม์ ตามลำดับ

4. การติดตามการผลของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ที่ผลิตได้ใน CEMR ต่อระบบจำลองการย่อยในร่างกายมนุษย์ เพปไทด์ในส่วนของเพอมิเอทให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงที่สุดเมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แพนครีเอตินให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ ACE ร้อยละ 93 ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่าเพปไทด์ในส่วนของรีเทนเทท และเพปไทด์ที่ผ่านการย่อยแต่ไม่ได้กรองผ่านเมมเบรน

ข้อเสนอแนะ

1. การพัฒนาระบบการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเนื้อปลานิลด้วยปฏิกรณ์เมมเบรน เอนไซม์สู่กระบวนการผลิตอย่างต่อเนื่อง continuous enzymatic membrane reactor (CEMR) ในระดับอุตสาหกรรม

2. การศึกษากระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเนื้อปลานิลในรูปแคปซูล หรือพัฒนาเป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ และติดตามการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเคมีและกายภาพของผลิตภัณฑ์

3. การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากวัสดุเศษเหลือ (by-product) ของอุตสาหกรรมแปรรูปปลานิล

ผลผลิต

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในระดับนานาชาติ

Charoenphun, N. and Youravong, W. 2016. Influence of gas–liquid two-phase flow on angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides separation by ultra-filtration. Journal of the Science of Food and Agriculture. XX: XXXX-XXXX.

นำเสนอผลงานต่อที่ประชุมวิชาการ

1. Charoenphun, N. and Youravong, W. 2016. Production of Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from tilapia protein using continuous enzymatic membrane reactor. The Global Conference on Life Science & Biological Engineering (GLSBE 2016), during 29-31 March, Kyoto Research Park, Kyoto, Japan.

2. Charoenphun, N. and Youravong, W. 2015. Production of Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from tilapia protein using cyclic bath enzymatic membrane reactor. International Symposium on Phytochemicals in Medicine and Food (ISPMF 2015), during 26-29 June, Shanghai Normal University, shanghai, China.

3. Charoenphun, N. and Youravong, W. 2015. Influence of gas-liquid two-phase flow on Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides separation by ultrafiltration. The 17th Food Innovation Asia Conference (FIAC 2015) during 18-19 June, Bitec, Bangna, Bangkok, Thailand.

บรรณานุกรม

A.O.A.C. 1999. Official Methods of Analysis of Association of Official Agricultural Chemists, 16th edn. Washington, D.C.

Agarwal, G.R. 1997. Analysis of proteins transmission in vortex flow ultrafilter for mass transfer coefficient. J. Membr. Sci. 136 : 141-151.

Alam, M.N.H.Z., Pinelo, M., Arnous, A., Gunnar, J., Meyer, A.S. and Gernaey, K.V. 2011. A miniature membrane reactor for evaluation of process design options on the enzymatic degradation of pectin. Ind. Eng. Chem. Res. 50 : 11252–11258.

Charcosset, C. 2012. Membrane Processes in Biotechnology and Pharmaceutics. Elseiver, UK.

Charoenphun, N. 2013. Production of bioactive peptide from tilapia muscle protein using membrane bioreactor. PhD Thesis. Prince of Songkla University. Thailand.

Charoenphun, N. 2015. Production of angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from tilapia protein using enzymatic membrane reactor. Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 1/2558).

Charoenphun, N., Youravong, W. and Cheirsilp, B. 2013. Determination of reaction kinetics of hydrolysis of tilapia (*Oreochromis niloticus*) muscle protein for manipulating production of bioactive peptides with antioxidant activity, angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity and Ca- binding properties. Int. J. Food Sci. Tech. 48 : 419-428.

Chiang, W.D., Tsou, M.J., Tsai, Z.Y. and Tsai, T.C. 2016. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from soy protein hydrolysate and produced by using membrane reactor. Food Chem. 98 : 725-732.

Chiang, W.D., Tsou, M.J., Weng, C.H. and Tsai, T.C. 2008. Production of angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from egg white protein hydrolysates using a membrane reactor. J. Food Drug Anal. 16 : 54-60.

Chiu, T.Y. and James, A.E. 2006. Critical flux enhancement in gas assisted microfiltration. J. Membr. Sci. 281 : 274–280.

Clarkson, J.R., Cui, Z.F. and Darton, R.C. 1999. Protein denaturation in foam. II. Surface activity and conformational change. J. Colloids Interf. Sci. 215 : 333–338.

Cui, J., Kong, X., Hua, Y., Zhou, H. and Liu, Q. 2011. Continuous hydrolysis of modified wheat gluten in an enzymatic membrane reactor. J. Sci. Food Agric. 91 : 2799–2805.

Cui, Z.F., Chang, S. and Fane, A.G. 2003. Review: the use of gas bubbling to enhance membrane processes. J. Membr. Sci. 221 : 1–35.

Cushman, D. W. and Cheung, H. S. 1971. Spectrophotometric assay and properties of angiotensin I-converting enzyme of rabbit lung. Bio. Chem. Phar. 20 : 1637–1648.

Deeslie, W.D. and Cheryan, M. 1981. Continuous enzymatic modification of proteins in an ultrafiltration reactor. J. Food Sci. 46 : 1035-1042.

Duncan, D.B. 1995. Multiple range and multiple F tests. Biometrics. 11 : 1–42.

Field, R.W., Wu, D. and Howell, J.A. 1995. Critical flux for microfiltration fouling. J. Membr. Sci. 100 : 259-272.

Grzeoekowiak-Przywecka, A. and Slominska, L. 2005. Continuous potato starch hydrolysis process in a membrane reactor with tubular and hollow-fiber membranes. Desalination. 184 : 105–112.

Huang, W.H., Sun, J.,He, H., Dong, H.W. and Li, J.T. 2010. Impact of processing on stability of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides obtained from tuna cooking juice. Food Res. Inter. 43 : 902–906

Huang, W.H., Sun, J.,He, H., Dong, H.W. and Li, J.T. 2011. Antihypertensive effect of corn peptides, produced by a continuous production in enzymatic membrane reactor, in spontaneously hypertensive rats. Food Chem. 128 : 968–973.

Kennedy, M., Kim, S.M., Mutenyo, I., Broens, L. and Schippers, J. 1998. Intermittent crossflushing of hollow fiber ultrafiltration systems. Desalination. 118 : 175-188.

Kim, H.G., Park, C., Yang, J., Lee, B., Kim, S.S. and Kim, S. 2007. Optimization of backflushing conditions for ceramic ultrafiltration membrane of disperse dye solutions. Desalination. 202 : 150–155.

Kim, T.J., Lee, Y.D. and Kim, H.S. 1993. Enzymatic production of cyclodextrins from milled corn starch in an ultrafiltration membrane bioreactor. Biotechnol. Bioeng. 41 : 88-94.

Krishna, K.N.S., Yea, M.K. and Cheryan, M. 2003. Soy protein concentrates by ultrafiltration. J. Food eng. Physican. prop. 68 : 2278-2283.

Laorko, A., Li, Z.Y., Tongchitpakdee, S. and Youravong, W. 2011. Effect of gas sparging on flux enhancement and phytochemical properties of clarified pineapple juice by microfiltration. Sep. and Purif. Tech. 80 : 445-451.

Lau, C.C., Abdullah, N. and Shuib, A.S. 2013. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from an edible mushroom, Pleurotus cystidiosus O.K. Miller identified by LC-MS/MS. BMC Complem. Altern. M. J. 13 : 313.

Lee, C.K., Chang, W.G. and Ju, Y.H. 1993. Air slugs entrapped crossflow filtration of bacterial suspensions. Biotech. Bioeng. 41 : 525-530.

Lee, S.G. and Kim, H.S. 1993. Optimal operating policy of the ultrafiltration membrane bioreactor for enzymatic hydrolysis of cellulose. Biotechnol. Bioengin. 42 : 737–746.

Li, Z.Y., H-Kittikun, A. and Youravong, W. 2008. Separation of protease from yellowfin tuna spleen extract by ultrafiltration: effect of hydrodynamics and gas sparging on flux

enhancement and selectivity. J. Membr. Sci. 311 : 104–111.

Lyagin, E., Drews, A., Bhattacharya, S., Ansorge-Schumacher, M.B. and Kraume M. 2010. Continuous screening system for inhibited enzyme catalysis: a membrane reactor approach. Biotechnol. J. 5 : 813-21.

Lyagin, E., Drewsb, A., Bhattacharya, S. and Kraume, M. 2012. Membrane reactor system for parallel continuous screening and characterisation of biocatalysts. Chem. Eng. Trans. 27 : 319-324.

Mannheim, A. and Cheryan, M. 1990. Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane reactor. Food Sci. 55 : 381-385.

McCabe, W.L. and Smith, J.C. 1976. Unit Operation of Chemical Engineering. 3rd edition. McGraw-Hill International Book Co. Auckland.

Nogue, M.G.I. 2005. Inorganic and polymeric microsieves strategies to reduce fouling. PhD Thesis, University of Twente, The Netherlands.

Olano-Martin, E., Mountzouris, K.C., Gibson, G.R. and Rastall, R.A. 2001. Continuous production of pectic oligosaccharides in an enzyme membrane reactor. J. Food Sci. 66 : 966-971.

Paolucci-Jeanjean, D., Belleville, M.P., Rios, G.M. and Zakhia, N. 2000a. Kinetics of continuous starch hydrolysis in a membrane reactor. Biochem. Eng. J. 6 : 233–238.

Paolucci-Jeanjeana, D., Bellevillea, M.P., Riosa, G.M. and Zakhia, N. 2000b. The effect of enzyme concentration and space time on the performance of a continuous recycle membrane reactor for one-step starch hydrolysis. Biochem. Eng. J. 5 : 17-22.

Perea, A. and Ugalde, U. 1996. Continuous hydrolysis of whey proteins in a membrane recycle reactor. Enzyme Microb. Technol. 18 : 29-34.

Prieto, C.A., Guadix, A., Gonza´lez-Tello, P. and Guadix, E.M. 2007. A cyclic batch membrane reactor for the hydrolysis of whey protein. J. Food Eng. 78 : 257–265.

Raghavan, S. and Kristinsson, H.G. 2008. Antioxidative efficacy of alkali-treated tilapia protein hydrolusates: a comparative study of five enzymes. J. Agric. Food Chem. 56 : 1434-1441.

Razavi, M.A., Mortazavi, A. and Mousavi, M. 2004. Application of neural networks for crossflow milk ultrafiltration simulation. Int. Dairy J. 14 : 69–80.

Sato, Y., Toyoda, T., Shimizu-Ibuka, A., Tamura, T., Kobayashi-Hattori, K., Nakamura, T., Arai, S., and Mura, K. 2012. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides found in a thermolysin-treated elastin with antihypertensive activity. Biosci. Biotech. Bioch. 76 : 1329-1333.

Wanasundara, P.K., Ross, A.R., Amarowicz, R., Ambrose, S.J., Pegg, R.B. and Shand, P.J. 2002. Peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity from defibrinated, hydrolyzed bovine plasma. J. Agri. Food Chem. 50 : 6981–6988.

Wang, H.L. and Hesseltince, W. 1965. Studies on the extracellular proteolytic enzymes of *Rhizopus oligosporus*. Can. J. Microbiol. 11 : 727-732.

Waungana, A., Singh, H. and Bennet, R.J. 1998. Rennet coagulation properties of skim milk concentrated by ultrafiltration: Effects of heat treatment and pH adjustment. Food Res. Int. 31 : 645–651.

Wei, J.T. and Chiang, B.H. 2009. Bioactive peptide production by hydrolysis of porcine blood proteins in a continuous enzymatic membrane reactor. J. Sci. Food Agric. 89 : 372-378.

Youravong, W., Li, Z. and Laorko, A. 2010. Influence of gas sparging on clarification of pineapple wine by microfiltration. J. Food Eng. 96 : 427–432.