

รหัสโครงการ 103106
สัญญาเลขที่ 1/2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE
(Angiotensin-I Converting Enzyme)
จากโปรตีนปลาไนล์ ด้วยปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์

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

นางสาวนรินทร์ เจริญพันธ์
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

กันยายน 2558

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพาผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 1/2558

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 1/2558)

บทคัดย่อ

การเกิดฟลาวลิ่งเป็นปัญหาสำคัญของระบบอัลตราฟิลเตรชัน หลายเทคนิคถูกนำมาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการกรองเพื่อเพิ่มค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทระหว่างการกรองด้วยอัลตราฟิลเตรชัน ระบบ gas-liquid two-phase flow เป็นเทคนิคหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับการเพิ่มค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท งานวิจัยนี้มีการศึกษาผลของขนาดเมมเบรน (molecular weight cut off; MWCO) ความดันขับ (transmembrane pressure; TMP) ความเร็วตามขวาง (cross flow velocity; CFV) และ gas-liquid two-phase flow ต่อการแยกเพปไทด์ที่มีต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน

โปรตีนจากเนื้อปลานิลถูกย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 2.4L และนำไปแยกด้วยเมมเบรนขนาด MWCO 1 5 และ 10 กิโลดาลตัน หลังจากนั้นคัดเลือกเมมเบรนที่มีขนาดเหมาะสมในการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE เพื่อศึกษาผลของความดันขับ ความเร็วตามขวาง และผลของการ gas-liquid two-phase flow ที่ความเค้นเฉือน 0.020 0.026 0.030 และ 0.039 ต่อค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทและกิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) จากผลการทดลอง พบว่า เมมเบรนขนาด MWCO 1 กิโลดาลตัน ให้ค่ากิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงที่สุด เหมาะสมที่จะนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป การเปลี่ยนแปลงค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทแปรผันตรงกับค่าความดันขับและความเร็วตามขวาง โดยที่ความดันขับ 2 บาร์ ความเร็วตามขวาง 2 เมตรต่อวินาที และการเพิ่มความเค้นเฉือนที่ 0.039 ให้ค่ากิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงที่สุด ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ด้วยเมมเบรนที่มี MWCO ขนาด 1 กิโลดาลตัน ที่ความดันขับ 2 บาร์ ความเร็วตามขวาง 2 เมตรต่อวินาที ความเค้นเฉือน 0.039 ซึ่งให้ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทและค่ากิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูง

ระบบปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์ถูกนำมาใช้ในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในการศึกษาครั้งนี้ระบบ cyclic batch enzymatic membrane reactor (CBEMR) ถูกนำมาใช้ในการผลิตเพปไทด์ที่มีต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยเมมเบรนขนาด MWCO 1 กิโลดาลตัน การดำเนินการของระบบมีการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรตีนเอสและแยกเพปไทด์ด้วยอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดต่าง 8 การศึกษาติดตามปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อค่าคอนเวอร์ชัน (conversion) และ ผลผลิตภาพ (productivity) ของระบบ CBEMR และศึกษาผลของ gas-liquid two-phase flow ที่ความเค้นเฉือน 0.020 0.026 0.030 และ 0.039 ต่อค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทและกิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จากผลการทดลอง พบว่า การย่อยสลายโปรตีนบางส่วนด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 2.4L ที่เวลาการย่อย 90 นาที ก่อนนำเข้าสู่ระบบ CBEMR ทำให้ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทลดลงเล็กน้อย การใช้ความดันขับที่ 1.3 บาร์ และความเร็วตามขวาง 1.5 เมตรต่อวินาที ให้ค่าคอนเวอร์ชันและผลผลิตภาพของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์

ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงที่สุด และการประยุกต์ใช้ระบบ gas-liquid two-phase flow สามารถลดการเกิดเมมเบรนฟลาวลิ่งและเพิ่มค่าฟลักซ์ของเพอมีเอททั้งนี้ขึ้นอยู่กับค่าความเค้นเฉือนที่ใช้ จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ค่าความเค้นเฉือนที่ 0.039 ให้ค่าคอนเวอร์ชันและผลผลิตของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงที่สุด คือ ร้อยละ 202 และ 0.9 มิลลิกรัมเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ต่อยูนิตของเอนไซม์ ตามลำดับ จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าระบบ CBEMR มีประสิทธิภาพสูง สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้

Abstract

Membrane fouling is a major problem in ultrafiltration system. Several techniques have been proposed to enhance the permeate flux during ultrafiltration. Among them, two-phase flow is a promising technique for permeate flux enhancement. This work aimed to investigate the effect of molecular weight cut off (MWCO), transmembrane pressure (TMP), cross flow velocity (CFV) and gas-liquid two-phase flow on permeate flux and antioxidant peptides separation during ultrafiltration of tilapia protein hydrolysate.

Tilapia protein was hydrolyzed by Alcalase 2.4L and Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides were separated using 1, 5 and 10 kDa hollow fiber membranes. After that the most suitable membrane for separating ACE inhibitory peptides was used to investigate the effect of TMP and CFV on permeate flux and ACE inhibitory peptides capacity. Finally, the influence of gas sparging, with shear stress number of 0.020, 0.026, 0.030 and 0.039 on permeate flux and ACE inhibitory peptides capacity were studied. This work used Completely Randomized Design (CRD) for experiments. The results showed that the membrane with MWCO of 1 kDa was found to be the most suitable molecular weight for separating ACE inhibitory peptides. The peptides fraction in 1 kDa permeate gave the highest ACE inhibitory peptides capacity. The permeate flux tended to increase with TMP and CFV. Operating at TMP of 2 bar and CFV of 2 m s^{-1} gave highest ACE inhibitory peptides permeation. The addition of shear stress number up to 0.039 led to increase in permeate flux up to 42 %. Moreover, the gas sparging at shear stress number of 0.039 led to a significant increase of ACE inhibitory peptides capacity. In conclusion, the best conditional of ACE inhibitory peptides separation from tilapia protein hydrolysate with 1 kDa membrane was operating at TMP of 2 bar and CFV of 2 m s^{-1} . Shear stress number up to 0.039 gave the best improvement of permeate flux, and ACE inhibitory activity of the permeate was increased.

The use of enzymatic membrane reactor to integrate a reaction vessel with a membrane separation unit is emerging as a beneficial method for producing bioactive peptides. In this study, the cyclic batch enzymatic membrane reactor (CBEMR) 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 temperature (50°C) and pH (8). The investigation was focused on the effect of process parameters on ACE inhibitory peptides conversion and productivity during CBEMR. Furthermore, the influence of gas sparging, with shear stress number of 0.020, 0.026, 0.030 and 0.039 on

permeate flux and ACE inhibitory peptides capacity were studied. This work used CRD for experiments. It was found that proteins have to be pre-hydrolyzed for 90 min with Alcalase 2.4L before introduce to CBEMR to reduce flux decline due to fouling. Operating at TMP of 1.3 bar and CFV of 1.5 m s^{-1} , gave the highest ACE inhibitory conversion and productivity. The use of gas-liquid two-phase flow could reduce membrane fouling and increase the permeate flux, depending on gas injection factor. Moreover, the gas sparging at shear stress number of 0.039 led to a significant increase of ACE inhibitory peptides capacity. The ACE inhibitory activity conversion and productivity were 202 % and 0.9 mg ACE inhibitory peptides/unit of enzyme, respectively. This result indicates that CBEMR was successfully employed to produce bioactive peptides.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อ	iv
สารบัญเรื่อง (Table of Contents)	viii
สารบัญตาราง (List of tables)	ix
สารบัญภาพ (List of illustrations)	x
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)	xii
บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	7
อุปกรณ์และวิธีการ	8
สารเคมีและอุปกรณ์	8
วิธีการ	10
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	22
สรุปและข้อเสนอแนะ	51
สรุป	51
ข้อเสนอแนะ	51
ผลผลิต	52
รายงานการเงิน	53
บรรณานุกรม	54
ประวัตินักวิจัยและคณะ	66

สารบัญตาราง (List of tables)

Table		หน้า
1	Protein transmission (T_p) and ACE inhibitory peptide activity of the retentate and permeate obtained during UF of tilapia protein hydrolysates (TMP = 1.5 bar, CFV = 1 m s ⁻¹ , temperature = 50 °C, VCF = 1.25 and recovery = 20 %)	22
2	Effect of Shear stress number (N'_S) on protein transmission and ACE inhibitory activity of permeate and retentate obtained during UF (MWCO 1 kDa) of tilapia protein hydrolysate in total recycle mode	29
3	Effect of pre-hydrolysis time on the average of T_p and bioactive peptide activities of permeate during CBEMR system ($S_0 = 1\%$ w/v, $E_0 = 20$ unit g ⁻¹ protein, TMP = 1 bar, CFV = 1 m s ⁻¹ , temperature = 50 °C, and initial volume = 550 mL)	38
4	Membrane fouling of UF membrane in CBEMR at CFV of 1 m s ⁻¹ as varying TMP	41
5	Effect of TMP on the average of T_p and ACE inhibitory activities of permeate during CBEMR system ($S_0 = 1\%$ w/v, $E_0 = 20$ unit g ⁻¹ protein, pre-hydrolysis = 90 min, CFV= 1 m s ⁻¹ , temperature = 50 °C, and initial volume = 550 mL)	42
6	Membrane fouling of UF membrane in CBEMR at TMP of 1.3 bar as varying CFV	44
7	Effect of CFV on the average of T_p and ACE inhibitory activities of permeate during CBEMR system ($S_0 = 1\%$ w/v, $E_0 = 20$ unit g ⁻¹ protein, pre-hydrolysis time = 90 min, TMP = 1.3 bar, temperature = 50 °C, and initial volume = 550 mL)	45
8	Membrane fouling of UF membrane in CBEMR at TMP of 1.3 bar and CFV of 1.5 m s ⁻¹ as varying Shear stress number (N'_S)	47
9	Effect of Shear stress number on average of T_p and bioactive activities during CBEMR 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 °C, and initial volume = 550 mL)	49

สารบัญภาพ (List of illustrations)

Figure		หน้า
1	Schematic diagram of UF system	12
2	Schematic diagram of CBEMR system	18
3	Effect of CFV and TMP on permeate flux during UF of tilapia protein hydrolysate using 1 kDa membrane in total recycle mode	24
4	Effect of TMP and CFV on protein transmission of permeate obtained during UF of tilapia protein hydrolysate using 1 kDa membrane in total recycle mode	26
5	Effect of TMP and CFV on ACE inhibitory activity of permeate obtained during UF of tilapia protein hydrolysate using 1 kDa membrane in total recycle mode	26
6	Effect of shear stress number (N'_S) on permeate flux during UF (MWCO 1 kDa) of tilapia protein hydrolysate in total recycle mode (TMP = 2 bar, CFV = 2 m s ⁻¹ and temperature = 50 °C)	28
7	The profile of normalized resistance (R/R_m) tilapia protein hydrolysate in total recycle mode at CFV of 2 m s ⁻¹ and TMP of 2 bar as varying shear stress number (N'_S)	30
8	Permeate flux and % recovery during UF (MWCO 1kDa) of tilapia protein hydrolysate in batch mode (TMP = 2 bar, CFV = 2 m s ⁻¹ , temperature = 50 °C, $N'_S = 0.039$)	31
9	Protein transmission (T_p) of permeate and retentate obtained during UF (MWCO 1kDa) of tilapia protein hydrolysate in batch mode (TMP = 2 bar, CFV = 2 m s ⁻¹ , temperature = 50 °C and $N'_S = 0.039$)	32
10	ACE activity of permeate and retentate obtained during UF (MWCO 1 kDa) of tilapia protein hydrolysate in batch mode (TMP = 2 bar, CFV = 2 m s ⁻¹ , temperature = 50 °C and $N'_S = 0.039$)	32
11	Effect of pre-hydrolysis time on degree of hydrolysis (DH) and viscosity at pH 8.0 and 50 °C ($S_0 = 1$ % w/v and $E_0 = 20$ unit g ⁻¹ protein) (● and ○; degree of hydrolysis and viscosity, respectively)	33

สารบัญภาพ (List of illustrations) ต่อ

Figure		หน้า
12	Effect of pre-hydrolysis time on permeate flux and % recovery during CBEMR system ($S_0 = 1\%$ w/v and $E_0 = 20$ unit g^{-1} protein, TMP = 1 bar, CFV = 1 $m\ s^{-1}$, temperature = 50 $^{\circ}C$, and initial volume = 550 mL) (●, ◆, ▲, ■, × and ✱; permeate flux of pre-hydrolysis time = 0, 60, 90, 120, 150 and 180 min and ○, ◇, △, □, + and −; % recovery of pre-hydrolysis time = 0, 60, 90, 120, 150 and 180 min, respectively)	34
13	The profile of normalized resistance (R/Rm) tilapia protein hydrolysate in CBEMR at CFV of 1 $m\ s^{-1}$ and TMP of 1 bar as varying pre-hydrolysis time	35
14	Effect of pre-hydrolysis time on enzyme activity during CBEMR system ($S_0 = 1\%$ w/v and $E_0 = 20$ unit g^{-1} protein, TMP = 1 bar, CFV = 1 $m\ s^{-1}$, temperature = 50 $^{\circ}C$, and initial volume = 550 mL) (●, ◆, ▲, ■, ✱ and ×; enzyme activity of pre-hydrolysis time = 0, 60, 90, 120, 150 and 180 min, respectively)	37
15	Effect of TMP on permeate flux and % recovery during CBEMR system ($S_0 = 1\%$ w/v and $E_0 = 20$ unit g^{-1} protein, pre-hydrolysis time = 90 min, CFV = 1 $m\ s^{-1}$, temperature = 50 $^{\circ}C$, and initial volume = 550 mL) (●, ◆, ▲ and ■; permeate flux of TMP = 0.5, 1, 1.3, and 1.6 bar and ○, ◇, △ and □; % recovery of TMP = 0.5, 1, 1.3, and 1.6 bar, respectively)	40
16	Effect of TMP on enzyme activity during CBEMR system ($S_0 = 1\%$ w/v and $E_0 = 20$ unit g^{-1} protein, pre-hydrolysis time = 90 min, CFV = 1 $m\ s^{-1}$, temperature = 50 $^{\circ}C$, and initial volume = 550 mL) (●, ◆, ▲ and ■; enzyme activity of TMP = 0.5, 1.0, 1.3 and 1.6 bar, respectively)	41
17	Effect of CFV on permeate flux and % recovery during CBEMR system ($S_0 = 1\%$ w/v, $E_0 = 20$ unit g^{-1} protein, pre-hydrolysis time = 90 min, TMP = 1.3 bar, temperature = 50 $^{\circ}C$, and initial volume = 550 mL) (▲, ◆, and ●; permeate flux of CFV = 1.0, 1.5, and 2.0 $m\ s^{-1}$ and △, ◇, and ○; % recovery of CFV = 1.0, 1.5, and 2.0 $m\ s^{-1}$, respectively)	43

สารบัญภาพ (List of illustrations) ต่อ

Figure		หน้า
18	Effect of CFV on enzyme activity during CBEMR system ($S_0 = 1\%$ w/v, $E_0 = 20$ unit g^{-1} protein, pre-hydrolysis time = 90 min, TMP = 1.3 bar, temperature = $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, and initial volume = 550 mL) (●, ◆, and ▲; enzyme activity of CFV = 1.0, 1.5, and 2.0 m s^{-1} , respectively)	45
19	Effect of gas-liquid two-phase flow on permeate flux and % recovery during CBEMR 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 = $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, and initial volume = 550 mL) (●, ◆, ▲ and ■; permeate flux of $N'_S = 0.019, 0.026, 0.030$ and 0.039 and ○, ◇, △ and □; % recovery of $N'_S = 0.019, 0.026, 0.030$ and 0.039 , respectively)	47
20	Effect of gas-liquid two-phase flow on enzyme activity during CBEMR 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 = $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, and initial volume = 550 mL) (●, ▲, ■ and ◆; enzyme activity of $N'_S = 0.019, 0.026, 0.030$ and 0.039 , respectively)	48
21	Effect of gas-liquid two-phase flow on protein conversion and productivity of protein during CBEMR 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 = $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, and initial volume = 550 mL) (○, ◇, △ and □; conversion of $N'_S = 0.019, 0.026, 0.030$ and 0.039 and ●, ◆, ▲ and ■; productivity of $N'_S = 0.019, 0.026, 0.030$ and 0.039 , respectively)	49
22	Effect of gas-liquid two-phase flow on ACE inhibitory capacity conversion and productivity of ACE inhibitory peptides during CBEMR 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 = $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, and initial volume = 550 mL) (○, ◇, △ and □; conversion of $N'_S = 0.019, 0.026, 0.030$ and 0.039 and ●, ◆, ▲ and ■; productivity of $N'_S = 0.019, 0.026, 0.030$ and 0.039 , respectively)	50

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

A_f	ความสามารถของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ในสารละลายเริ่มต้น (μg captopril g^{-1} protein)
Angiotensin Converting enzyme	ACE
A_p	ความสามารถของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ในพอลิเมอร์ที่เวลาใดๆ (μg captopril g^{-1} protein)
C_f	ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายเริ่มต้น (mg mL^{-1})
Concentration polarization	คอนเซนเตรชันโพลาไรเซชัน
Conversion	ค่าคอนเวอร์ชัน
C_p	ความเข้มข้นของโปรตีนในพอลิเมอร์ที่เวลาใดๆ (mg mL^{-1})
Crossflow velocity (CFV)	ความเร็วตามขวาง (m s^{-1})
Degree of hydrolysis (DH)	ระดับการย่อย
Enzyme concentration	ความเข้มข้นของเอนไซม์ (unit mL^{-1} of protein)
Fouling	ฟาวลิง
F_t	อัตราการไหลของพอลิเมอร์ที่เวลาการย่อยใดๆ (mL min^{-1})
Gas-liquid two-phase flow	การไหลแบบ 2 สถานะของก๊าซของเหลว
Molecular weight cut-off	ขนาด MWCO
Permeate	พอลิเมอร์
Permeate flux (J)	ฟลักซ์ของพอลิเมอร์ (m s^{-1})
Productivity	ผลิตภาพ
Protein conversion _t	ค่าโปรตีนคอนเวอร์ชันที่เวลาใดๆ
Protein transmission (T_p)	ค่าการส่งผ่านโปรตีน
Recovery	ค่ารีคัฟเวอรี
Retentate	รีเทนเตท
R_{if}	ความต้านทานฟาวลิงแบบผันกลับไม่ได้ (irreversible fouling) (m^{-1})
R_{if-ex}	ความต้านทานฟาวลิงภายนอกแบบผันกลับไม่ได้ (external irreversible fouling) (m^{-1})
R_{if-ex}	ความต้านทานฟาวลิงภายนอกแบบผันกลับไม่ได้ (external irreversible fouling) (m^{-1})

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations) ต่อ

R_m	ความต้านทานของเมมเบรน (m^{-1})
R_{rf}	ความต้านทานฟาวลิงแบบผันกลับได้ (reversible fouling) (m^{-1})
R_t	ความต้านทานรวม (m^{-1})
$S_{0,t}$	ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดในถังปฏิกรณ์ที่เวลาใดๆ ($mg\ mL^{-1}$)
Substrate volume _t	ปริมาตรของสารละลายในถังปฏิกรณ์ที่เวลาใดๆ (mL)
t	เวลาในการย่อยสลาย (min)
Transmembrane pressure (TMP)	ความดันขับ (Pa)
U_g	ความเร็วในการไหลของก๊าซ ($m\ s^{-1}$)
U_l	ความเร็วในการไหลของของเหลว ($m\ s^{-1}$)
Ultrafiltration (UF)	อัลตราฟิลเตรชัน
V_f	ปริมาตรของสารละลายเริ่มต้น (mL)
Volume concentration factor (VCR)	ค่าเฟคเตอร์ความเข้มข้นเชิงปริมาตร
V_p	ปริมาตรของเพอมีเอทที่เวลาใดๆ (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	ความหนืดของเพอมีเอท (Pa.s)

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

ข้าพเจ้า ดร. นรินทร์ เจริญพันธ์ ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัย จากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา โครงการวิจัยเรื่อง การผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE (Angiotensin-I Converting Enzyme) จากโปรตีนปลาไนล ด้วยปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์

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

รหัสโครงการ 103106 เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 2558A10802005 สัญญาเลขที่ 1/2558 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น 440,000 บาท (สี่แสนสี่หมื่นบาท)

ระยะเวลาดำเนินงาน 1 ปี (ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2557 ถึงวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2558)

บทคัดย่อ

การเกิดฟลาวลิ่งเป็นปัญหาสำคัญของระบบอัลตราฟิลเตรชัน หลายเทคนิคถูกนำมาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการกรองเพื่อเพิ่มค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทระหว่างการกรองด้วยอัลตราฟิลเตรชัน ระบบ gas-liquid two-phase flow เป็นเทคนิคหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับการเพิ่มค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท งานวิจัยนี้มีการศึกษาผลของขนาดเมมเบรน (molecular weight cut off; MWCO) ความดันขั้ว (transmembrane pressure; TMP) ความเร็วตามขวาง (cross flow velocity; CFV) และ gas-liquid two-phase flow ต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลาไนลด้วยกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน

โปรตีนจากเนื้อปลาไนลถูกย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 2.4L และนำไปแยกด้วยเมมเบรนขนาด MWCO 1 5 และ 10 กิโลดาลตัน หลังจากนั้นคัดเลือกเมมเบรนที่มีขนาดเหมาะสมในการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE เพื่อศึกษาผลของความดันขั้ว ความเร็วตามขวาง และผลของการ gas-liquid two-phase flow ที่ความเค้นเฉือน 0.020 0.026 0.030 และ 0.039 ต่อค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท และกิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) จากผลการทดลอง พบว่า เมมเบรนขนาด MWCO 1 กิโลดาลตัน ให้ค่ากิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงที่สุด เหมาะสมที่จะนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป การเปลี่ยนแปลงค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทแปรผันตรงกับค่าความดันขั้วและความเร็วตามขวาง โดยที่ความดันขั้ว 2 บาร์ ความเร็วตามขวาง 2 เมตรต่อวินาที และการเพิ่มความเค้นเฉือนที่ 0.039 ให้ค่ากิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงที่สุด ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ด้วยเมมเบรนที่มี MWCO ขนาด 1 กิโลดาลตัน

ที่ความดันขับ 2 บาร์ ความเร็วตามขวาง 2 เมตรต่อวินาที ความเข้มข้น 0.039 ซึ่งให้ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท และ ค่ากิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูง

ระบบปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์ถูกนำมาใช้ในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ในการศึกษานี้ระบบ cyclic batch enzymatic membrane reactor (CBEMR) ถูกนำมาใช้ในการผลิตเพปไทด์ที่มีต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยเมมเบรนขนาด MWCO 1 กิโลดาลตัน การดำเนินการของระบบมีการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรตีนเอสและแยกเพปไทด์ด้วยอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดต่าง 8 การศึกษาติดตามปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อค่าคอนเวอร์ชัน (conversion) และ ผลิตภาพ (productivity) ของระบบ CBEMR และศึกษาผลของ gas-liquid two-phase flow ที่ความเข้มข้น 0.020 0.026 0.030 และ 0.039 ต่อค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทและกิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จากผลการทดลอง พบว่า การย่อยสลายโปรตีนบางส่วนด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 2.4L ที่เวลาการย่อย 90 นาที ก่อนนำเข้าสู่ระบบ CBEMR ทำให้ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทลดลงเล็กน้อย การใช้ความดันขับที่ 1.3 บาร์ และความเร็วตามขวาง 1.5 เมตรต่อวินาที ให้ค่าคอนเวอร์ชันและผลิตภาพของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงที่สุด และการประยุกต์ใช้ระบบ gas-liquid two-phase flow สามารถลดการเกิดเมมเบรนฟลาวลิ่งและเพิ่มค่าฟลักซ์ของเพอมีเอททั้งนี้ขึ้นอยู่กับค่าความเข้มข้นที่ใช้ จากการศึกษานี้พบว่า ค่าความเข้มข้นที่ 0.039 ให้ค่าคอนเวอร์ชันและผลิตภาพของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงที่สุด คือ ร้อยละ 202 และ 0.9 มิลลิกรัมเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ต่อยูนิตของเอนไซม์ ตามลำดับ จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าระบบ CBEMR มีประสิทธิภาพสูง สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้

ผลผลิต (output)

นำเสนอผลงานต่อที่ประชุมวิชาการ

1. 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.
2. 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.

ข้อเสนอแนะ

1. การพัฒนาระบบการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเนื้อปลานิลด้วยปฏิกรณ์เมมเบรน เอนไซม์สู่กระบวนการผลิตอย่างต่อเนื่อง continuous enzymatic membrane reactor (CEMR) ในระดับอุตสาหกรรม
2. การศึกษากระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเนื้อปลานิลในรูปแบบแคปซูล หรือพัฒนาเป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ และติดตามการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเคมีและกายภาพของผลิตภัณฑ์
3. การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากวัสดุเศษเหลือ (by-product) ของอุตสาหกรรมแปรรูปปลานิล

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

สารยับยั้งเอนจิโอเทนซิน คอนเวอร์ติงเอนไซม์ (Angiotensin Converting enzyme Inhibitor, ACE inhibitor) ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเปลี่ยน angiotensin I เป็น angiotensin II ซึ่งมีผลทำให้หลอดเลือดหดตัว และกระตุ้นการหลั่งของแอลโดสเตอโรน (aldosterone) ที่ทำหน้าที่ในการเพิ่มการดูดน้ำและเกลือแร่กลับสู่ร่างกาย ดังนั้น ACE inhibitor จะมีผลโดยรวมในการช่วยลดความดันโลหิตในร่างกาย ปัจจุบันเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพผู้บริโภค ACE inhibitor สามารถผลิตได้จากวัตถุดิบที่หลากหลาย อาทิ ปลาทูน่าครีบลีเอ็ง (Jung *et al.*, 2006) ปลาพอลลอค (Je *et al.*, 2004) ปลาเฉา (Chen *et al.*, 2012) และ ปลานิล (Charoenphun *et al.*, 2013b) เป็นต้น ปัจจุบันปลานิล (*Oreochromis niloticus*) มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย และอุตสาหกรรมการแปรรูปปลานิลเพื่อการส่งออกมีการขยายตัวอย่างต่อเนื่อง (Department of Fisheries Thailand, 2014) ดังนั้นการพัฒนากระบวนการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE จากโปรตีนปลานิลให้มีประสิทธิภาพสูง ทั้งในเชิงคุณภาพ และปริมาณจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากการศึกษาการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE แบบดั้งเดิม มีวิธีการที่ซับซ้อนหลายขั้นตอน ตั้งแต่การสกัดโปรตีน การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) และการแยกเพปไทด์ ปัญหาหลักๆ ที่พบคือ เอนไซม์ซึ่งมีราคาค่อนข้างสูงไม่คุ้มค่ากับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากเอนไซม์ถูกนำมาใช้ย่อยโปรตีนเพียงครั้งเดียวและถูกทำลาย นอกจากนี้แต่ละขั้นตอนของการผลิตใช้เวลาค่อนข้างนานและซับซ้อน ส่งผลให้คุณสมบัติทางชีวภาพของเพปไทด์ลดลงได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวความคิดในการปรับปรุง และพัฒนากระบวนการผลิตให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น คือการใช้ระบบการผลิตแบบปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์ (Enzymatic membrane reactor) ที่มีการผลิตอย่างต่อเนื่อง และใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ได้อย่างคุ้มค่า สามารถเพิ่มปริมาณผลผลิต และได้เพปไทด์ที่มีสมบัติตามต้องการ องค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยจะเป็นประโยชน์ต่อการผลิตทางการค้า และประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของ Molecular weight cut-off (MWCO) ต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้องอกด้วยกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน
2. เพื่อศึกษาผลของความดันขั้ว (Transmembrane pressure, TMP) และความเร็วตามขวาง (Crossflow velocity, CFV) ที่เหมาะสมในการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้องอกด้วยกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน
3. เพื่อศึกษาผลของการไหลแบบ 2 สถานะ (two-phase flow) ของก๊าซของเหลว (gas-liquid) หรือ gas-liquid two-phase flow ต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้องอกด้วยกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน
4. เพื่อศึกษาผลของเวลาที่เหมาะสมในการย่อย (pre-hydrolysis) สารละลายโปรตีนจากเนื้องอกก่อนการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ด้วยระบบปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์หมุนเวียนแบบกะ (cyclic batch enzymatic membrane reactor, CBEMR)
5. เพื่อศึกษาผลของความดันขั้ว และความเร็วตามขวาง ที่เหมาะสมในการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้องอกด้วยระบบ CBCMR
6. เพื่อศึกษาผลของ gas-liquid two-phase flow ต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้องอกด้วยระบบ CBCMR

ขอบเขตของโครงการวิจัย

โดยการทดลองเริ่มจากการกรองแยกเพื่อคัดขนาดโมเลกุลที่เหมาะสมในการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง ACE จากเนื้องอก ด้วยกระบวนการอัลตราฟิลเตรชันโดยใช้เมมเบรนที่มี MWCO 3 ขนาด คือ 1 กิโลดาลตัน 5 กิโลดาลตัน และ 10 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการกรองประกอบด้วย ความดันขั้ว ความเร็วตามขวาง และ การใช้ gas-liquid two-phase flow ในการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้องอกด้วยกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน จากนั้นพัฒนากระบวนการผลิตสู่ระบบ CBCMR โดยศึกษาผลของเวลาที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนจากเนื้องอกต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ด้วยระบบ CBCMR และศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ประกอบด้วย ความดันขั้ว ความเร็วตามขวาง และ การใช้ gas-liquid two-phase flow ในการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้องอกด้วยระบบ CBCMR ซึ่งองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางเพื่อพัฒนาต่อยอดในการผลิตระดับอุตสาหกรรมได้

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สามารถผลิตได้จากโปรตีนปลาไหล (Charoenphun *et al.*, 2013b) ดังนั้นการเลือกใช้กระบวนการผลิตที่เหมาะสม ทำให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ ลดต้นทุนการผลิตลงได้ การประยุกต์ใช้ปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์ในการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE เป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ สามารถลดระยะเวลาการผลิตลง และลดค่าใช้จ่ายเนื่องจากมีการหมุนเวียนเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่อย่างเต็มประสิทธิภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการผลิตแบบดั้งเดิม ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ศึกษาปัจจัยที่เป็นตัวกำหนดประสิทธิภาพของปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์ในการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE มีหลายปัจจัย เช่น MWCO ความดันขับ ความเร็วตามขวาง เป็นต้น รวมถึงการประยุกต์ใช้ gas-liquid two-phase flow ในการลดการเกิดฟาวลิงและเพิ่มค่าฟลักซ์ในการกรองด้วยอัลตราฟิลเตรชัน โดยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัย ทำให้สามารถควบคุมกระบวนการผลิตได้อย่างเหมาะสม

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

กรมประมงรายงานข้อมูลการส่งออกปลาไหลของไทยปี 2557 พบว่า มีการส่งออก 15,496 ตัน และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Fisheries economics division, 2015) การผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลาไหลเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับอุตสาหกรรมการแปรรูปปลาไหล

ระบบเรนิน แองจิโอเทนซิน (renin angiotensin system) เป็นระบบที่มีบทบาทในการควบคุมสมดุลของเหลวในร่างกาย และมีส่วนในการควบคุมระดับความดันโลหิตของร่างกาย ตัวยับยั้งแองจิโอเทนซิน-คอนเวอร์ติงเอนไซม์ มีผลยับยั้งการทำงานของระบบนี้ ซึ่งออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเปลี่ยน angiotensin I เป็น angiotensin II ส่งผลให้หลอดเลือดหดตัวในระบบจำลองร่างกายของสัตว์และคนไข้ (Wu *et al.*, 2015) และกระตุ้นการหลั่งของแอลโดสเตอโรนที่ทำหน้าที่ในการเพิ่มการดูดน้ำและเกลือแร่กลับสู่ร่างกาย ปัจจุบันมีรายงานการยับยั้ง ACE ของเพปไทด์ที่แยกได้จากการใช้เอนไซม์ไฮโดรไลซ์โปรตีนสกัดจากแหล่งอาหารหลายชนิด เช่น ถั่วเหลือง (Chiang *et al.*, 1999) ไข่ขาว (Chiang *et al.*, 2008) เลือดหมู (Wei and Chiang, 2009) ปลาไหล (Raghavan and Kristinsson, 2009) ข้าวโพด (Huang *et al.*, 2011) แมงกระพรุน (Kim *et al.*, 2011) ข้าวสาลี (Qu *et al.*, 2013) ข้าว (Chen *et al.*, 2013) ถั่ว (Jakubczyk *et al.*, 2013) ปลาตะเพียนทะเล (Akagunduz *et al.*, 2014) ปลาหมึก (Balti *et al.*, 2015) ปลาตุ๊กแก (Wu *et al.*, 2015) และปลากระเบน (Lassoued *et al.*, 2015)

Raghavan และ Kristinsson (2009) รายงานการศึกษา เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลาไหล โดยการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดคือ ไคโอตินเอฟ และ ฟลาโวไซม์ และแยกเพปไทด์ด้วยกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน ที่มี MWCO ขนาด 10 และ 30 กิโลดาลตัน พบว่า เพปไทด์ที่

มีขนาดเล็กกว่า 10 กิโลดาลตัน มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงที่สุด Charoenphun *et al.* (2013a) ศึกษาการย่อยโปรตีนจากเนื้อปลานิลด้วยเอนไซม์ 4 ชนิดคือ อัลคาเลส 2.4L ฟลาโวไซม์ 1000L ปาเปน โปรตีเอส GN เอนไซม์ผสมระหว่างอัลคาเลส 2.4L และ ปาเปน พบว่าเพปไทด์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 2.4L ให้ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงที่สุดเมื่อเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่น Charoenphun *et al.* (2013b) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาจุลศาสตร์ของเอนไซม์ต่างๆ ต่อการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิล พบว่า อัตราการผลิตอยู่ที่ 2.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อนาที แสดงให้เห็นว่าเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE น่าจะเป็นเพปไทด์สายสั้น

กระบวนการแบบดั้งเดิมของการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง ACE แบ่งออกได้ 3 ขั้นตอนใหญ่ๆ คือ กระบวนการสกัด การย่อยด้วยเอนไซม์หรือสารเคมี และการแยกเพปไทด์ ในขั้นตอนของการแยกวิธีการที่ถูกนำมาใช้ในการแยกเพปไทด์คือ เทคนิคเจลฟิลเตรชัน (gel filtration technologies) (Kim *et al.*, 2011) และ ลิกวิดโครมาโทกราฟี (liquid chromatography) (Lau *et al.*, 2013) อย่างไรก็ตามวิธีการเหล่านี้ไม่เหมาะกับการผลิตในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ เนื่องจากใช้เวลานาน การลงทุนสูง และปริมาณผลผลิตต่ำ (Ward and Swiatek, 2009) เทคโนโลยีเมมเบรน (membrane technology) จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่น่าสนใจ เหมาะสำหรับการแยกเพปไทด์ที่โมเลกุลขนาดเล็กออกจากโมเลกุลขนาดใหญ่ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมได้ (Korhonen and Pihlanto, 2006) กระบวนการเมมเบรนเป็นกระบวนการที่ใช้ความดันเป็นแรงขับ (pressure driven) เพื่อแยกองค์ประกอบในของเหลวโดยผ่านแผ่นเมมเบรนเป็น 2 ส่วน คือ รีเทนเทท (retentate) เป็นส่วนที่ถูกกักกันด้วยเมมเบรน และส่วนที่ผ่านเมมเบรน หรือที่เรียกว่า เพอมีเอท (permeate) กระบวนการเมมเบรนระดับอัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration, UF) เป็นกระบวนการแยกโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น คอลลอยด์ จุลินทรีย์ น้ำตาล โปรตีนและสารอื่นๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 300-500,000 ดาลตัน (Dalton, Da) ออกจากน้ำหรือสารโมเลกุลอื่นๆ โดยใช้ความดันขับในการส่งผ่านสารผ่านเมมเบรน อัลตราฟิลเตรชันเข้ามามีบทบาทสำคัญในกระบวนการทำให้เข้มข้น การทำให้บริสุทธิ์ และการแยกสารทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเทคโนโลยีชีวภาพ (Foh *et al.*, 2010)

ปัจจุบันอัลตราฟิลเตรชันถือเป็นเทคโนโลยีที่ดีที่สุดเทคโนโลยีหนึ่งที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง ACE จากแหล่งโปรตีนหลายชนิด อาทิ มันฝรั่ง (Pihlanto *et al.*, 2008) ปลานิล (Raghavan and Kristinsson, 2009) เมล็ดฝ้าย (Gao *et al.*, 2010) สาหร่าย (Ko *et al.*, 2012) และ กากเบียร์ (Connolly *et al.*, 2015) อัลตราฟิลเตรชันถูกนำมาใช้ในกระบวนการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง ACE โดยทั่วไปทั้งในกระบวนการแยก การทำให้บริสุทธิ์ และการทำให้เข้มข้น ตัวอย่างเช่น Picot และคณะ (2010) รายงานผลของการกรองเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง ACE จากโปรตีนปลาด้วยอัลตราฟิลเตรชัน พบว่า เพปไทด์ที่ผ่านการกรองด้วยอัลตราฟิลเตรชันให้ฤทธิ์ยับยั้ง ACE ดีกว่าเพปไทด์ที่ไม่ผ่านการกรองด้วยอัลตราฟิลเตรชัน นอกจากนี้การใช้สภาวะของการกรองที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการแยกเพปไทด์ได้ดีขึ้น

Cheryan and Deeslie (1983) ศึกษากระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแบบดั้งเดิม พบว่ามีปัญหาหลายอย่าง เช่น ลงทุนสูงเนื่องจากเอนไซม์ที่นำมาใช้เป็นการผลิตแบบใช้ครั้งเดียว หลังจากสิ้นสุดกระบวนการย่อยต้องหยุดการทำงานของเอนไซม์ไม่สามารถหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ได้อีก ซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์อย่างไม่คุ้มค่า การผลิตแบบดั้งเดิมยังได้ผลผลิตในระดับต่ำ และผลผลิตที่ได้มีขนาดโมเลกุลหลากหลายยากต่อการควบคุมคุณภาพของผลผลิต นับได้ว่าวิธีการผลิตแบบดั้งเดิมเป็นวิธีที่มีต้นทุนสูงแต่ผลผลิตต่ำ และใช้เวลานาน ดังนั้นเพื่อแก้ไขปัญหาเหล่านี้จึงมีการประยุกต์ใช้ระบบ cyclic batch enzymatic membrane reactor (CBEMR) ซึ่งเป็นระบบที่ประกอบด้วย การย่อยสารตั้งต้นด้วยเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์และกรองตัวอย่างผ่านเมมเบรน โดยเอนไซม์จะถูกหมุนเวียนกลับมาย่อยสารตั้งต้นใหม่หมุนเวียนจนสิ้นสุดการกรอง วิธีนี้มีข้อได้เปรียบคือรวดเร็วใช้เอนไซม์ได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ ได้ผลผลิตสูง และควบคุมขนาดโมเลกุลของสารที่ผ่านการกรองได้ดีกว่าวิธีการแบบดั้งเดิม ซึ่งนับได้ว่าเป็นวิธีการผลิตที่น่าสนใจสำหรับการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ระบบ CBEMR ถูกนำมาใช้ในการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากเวย์โปรตีน (Prieto *et al.*, 2007 และ Prieto *et al.*, 2010)

โดยทั่วไปการประเมินสมรรถนะของกระบวนการอัลตราฟิลเตรชันและระบบ CBCMR มักใช้ค่าฟลักซ์ (flux) และค่าการกักกัน (retention หรือ rejection) ของสารเป็นตัวบ่งชี้ (Rios *et al.*, 2004) โดยสมรรถนะของอัลตราฟิลเตรชันขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย อาทิ คุณสมบัติของสารป้อนหรือสารที่ต้องการแยก (เช่น ขนาดโมเลกุลของสาร ความเป็นกรดต่าง ขนาดประจุของอนุภาคหรือตัวถูกละลาย) สภาพการดำเนินงานของกระบวนการ เช่น ระดับของแรงขับเคลื่อน ความเร็วตามขวาง (Chabeaud *et al.*, 2009) และคุณสมบัติด้านต่างๆ ของเมมเบรน เช่น ขนาดรูพรุน ประจุ (Baker, 2000) แต่ข้อจำกัดของกระบวนการอัลตราฟิลเตรชันและระบบ CBCMR คือการลดลงของฟลักซ์เนื่องจากการเกิดคอนเซนเตรชันโพลาไรเซชัน (concentration polarization) และฟาวลิง (fouling) ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวส่งผลต่อประสิทธิภาพของกระบวนการกรองด้วยเมมเบรน (Yang *et al.*, 2006) คอนเซนเตรชันโพลาไรเซชันเป็นปรากฏการณ์ที่ความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่ผิวหน้าเมมเบรนสูงกว่าในส่วนกลางของสารละลายทั้งหมด ทำให้ความต้านทานการไหลของเพอมีเอทเพิ่มขึ้น ปรากฏการณ์ดังกล่าวสามารถกำจัดออกหรือลดด้วยการปรับเปลี่ยนสภาวะการดำเนินงานของกระบวนการกรอง ส่วนฟาวลิงที่ไม่สามารถผันกลับได้จะเป็นการเกิดทั้งภายในและภายนอกรูพรุน โดยทั่วไปสามารถกำจัดด้วยการใช้สารเคมีเท่านั้น ความรุนแรงของฟาวลิง และกลไกหรือตำแหน่งในการเกิดฟาวลิงขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น สภาวะในการดำเนินการของกระบวนการ คุณสมบัติของสารป้อนและเมมเบรน ในส่วนของการดำเนินการของระบบกรอง มีผลสำคัญต่อระบบการกรองเป็นอย่างยิ่งเนื่องจากการควบคุมสภาวะการกรองที่เหมาะสม จะลดหรือป้องกันการเกิดฟาวลิงได้

Paolucci-Jeanjean และคณะ (2000) ศึกษาการย่อยตัวอย่างก่อนนำเข้าสู่ระบบ CBEMR พบว่าวิธีนี้ลดการเกิดฟาวลิงได้ โดยทั่วไปสภาวะในการกรอง เช่น ความดันขับ และ ความเร็วตามขวาง เป็นปัจจัยสำคัญของการกรองระบบ CBEMR Belafi-Bako และคณะ (2006) ศึกษาผลของความดันขับต่อค่าฟลักซ์ในกระบวนการย่อยเซลลูโลสในระบบปฏิบัติการเมมเบรนเอนไซม์ พบว่า เมื่อเพิ่มความดันขับ 2

บาร์ ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทจะเพิ่มขึ้น แต่ถ้าเพิ่มความดันขับสูงถึง 5 บาร์ ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Padmasiri และคณะ (2007) เกี่ยวกับผลของความเร็วดำรงต่อประสิทธิภาพการกรองในระบบปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์ พบว่า การเพิ่มความเร็วดำรงส่งผลให้ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทเพิ่มขึ้น ดังนั้นการใช้สภาวะที่เหมาะสมในการกรองจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ และเพิ่มปริมาณผลผลิตในกระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยระบบ CBCMR

ปัจจุบันมีการนำหลายๆ เทคนิคมาประยุกต์ใช้ร่วมกับการกรองด้วยอัลตราฟิลเตรชันเพื่อเพิ่มค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท (permeate flux) หรือลดการเกิดฟาวลิง เช่น การกรองแบบกระแสน้ำหมุนวน (vortex flow filtration) (Agarwal, 1997) การปรับค่าความเป็นกรดต่าง (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 เป็นวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจที่ถูกนำมาใช้เพื่อช่วยลดการเกิดฟาวลิงของเมมเบรน โดยอนุภาคของฟองอากาศและการไหลของของเหลวจะช่วยพาโมเลกุลของสารที่ต้องการกรองผ่านรูพรุนของเมมเบรน และการถ่ายเทมวลของสารเข้าไปขัดขวางการสะสมของอนุภาคซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดฟาวลิง ทั้งฟาวลิงแบบผันกลับได้และฟาวลิงแบบผันกลับไม่ได้ (Li *et al.*, 2008; Youravong *et al.*, 2010; Laorko *et al.*, 2011) ขนาดของอนุภาคมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดฟาวลิงในระบบอัลตราฟิลเตรชัน โดยทั่วไปสารที่ถูกกรองด้วยอัลตราฟิลเตรชันจะมีขนาดอนุภาคระหว่าง 10 นาโนเมตร ถึง 10 ไมโครเมตร การกระจายตัวของอนุภาคถูกควบคุมด้วย 2 ปัจจัย คือ เอนทัลปีอุณหพลศาสตร์ (thermodynamic entropy) ควบคุมการไหลของอนุภาคขนาดเล็ก และ ความเค้นของพลศาสตร์ของการไหล (hydrodynamic stress) ควบคุมการไหลของอนุภาคขนาดใหญ่ (Kim and Liu, 2008) Lee และคณะ (1993) รายงานการประยุกต์ใช้ gas-liquid two-phase flow ในระบบอัลตราฟิลเตรชันแบบการไหลของสารจากข้างในไหลไปข้างนอก (inside-out) เพื่อแยกอนุภาคของแบคทีเรีย พบว่า gas-liquid two-phase flow สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการกรองได้ และต่อมามีรายงานของนักวิจัยหลายท่านเกี่ยวกับการใช้ gas-liquid two-phase flow ในการแยกอนุภาคของสารในอาหารเหลว ซึ่งส่วนใหญ่มีอนุภาคขนาดใหญ่ เช่น นมไขมันต่ำ (0.1 ไมโครเมตร) (Bonin *et al.*, 2004) ม้ามปลาทูน่า (2.2-10 ไมโครเมตร) (Li *et al.*, 2008) ยีสต์ (0.7-18 ไมโครเมตร) (Hwang and Hsu, 2009) ไวรัสตับประด (1-70 ไมโครเมตร) (Youravong *et al.*, 2010) และ น้ำสับประด (58 ไมโครเมตร) (Laorko *et al.*, 2011) การประยุกต์ใช้ gas-liquid two-phase flow ในระบบอัลตราฟิลเตรชัน เพื่อเพิ่มค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทในการแยกอนุภาคขนาดเล็ก เช่น เพปไทด์ ยังไม่มีรายงานในปัจจุบัน

ในส่วนผลกระทบของ gas-liquid two-phase flow ต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์หลังการกรองมีทั้งที่เป็นผลในเชิงลบ และผลในเชิงบวก เช่น gas-liquid two-phase flow ให้ผลในเชิงลบต่อการกรองโปรตีนและการส่งผ่านโปรตีน นอกจากนี้ยังส่งผลต่อความสามารถในการแยกโปรตีนของกระบวนการภายใต้สภาวะวิกฤติและสภาวะฟลักซ์วิกฤติ (Li *et al.*, 2008) Youravong และคณะ (2010) รายงาน

การใช้ gas-liquid two-phase flow ในการการกรองไวน์สับปะรด พบว่า gas-liquid two-phase flow สามารถเพิ่มค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทได้ถึงร้อยละ 138 แต่อย่างไรก็ตามการใช้ก๊าซร่วมในการกรองเป็นสาเหตุให้ความเข้มข้นของปริมาณแอลกอฮอล์ในไวน์ลดลง อาจเนื่องจากการระเหยของแอลกอฮอล์ระหว่างกระบวนการกรอง การประยุกต์ใช้ gas-liquid two-phase flow ในการกรองน้ำสับปะรด ส่งผลต่อการลดลงของปริมาณกรดแอสคอร์บิกและปริมาณวิตามินซีในน้ำสับปะรด (Laorko *et al.*, 2011) อย่างไรก็ตามการใช้ gas-liquid two-phase flow ร่วมกับการใช้ความเร็วตามขวางระดับต่ำในการกรองส่งผลให้ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทเพิ่มขึ้น โดยที่คุณสมบัติทางพิษเคมีของน้ำสับปะรดยังคงอยู่ แต่ในบางผลิตภัณฑ์การใช้ gas-liquid two-phase flow ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ เช่น นมไขมันต่ำ (Bonin *et al.*, 2004) และ ยีสต์ (Hwang and Hsu, 2009) Bonin และคณะ (2004) รายงานการใช้ gas-liquid two-phase flow ในการกรองนมไขมันต่ำ พบว่าปริมาณแอลฟาแลคตัลบูมินและเบตาแลคโตโกลบูลินเพิ่มขึ้น ดังนั้นการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากปลาชนิดต่างๆ ระบบ CBEMR ร่วมกับการใช้ gas-liquid two-phase flow จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

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

อุปกรณ์และวิธีการ

สารเคมีและอุปกรณ์

1. วัสดุดิบ

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

2. สารเคมี

- 2.1 N-Hippuryl-His-Leu hydrate (Sigma Chemical Co., สหรัฐอเมริกา)
- 2.2 กรดไทโรคลอโรอะซีติก (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 โซเดียม เตตราโบเรต เดคาไฮเดรต
- 2.9 โซเดียมคลอไรด์ (RCI Labscan, ไทย)
- 2.10 โซเดียมคาร์บอเนต (Univar, ออสเตรเลีย)
- 2.11 โซเดียมโอดีเดซิลซัลเฟต (RCI Labscan, ไทย)
- 2.12 โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (RCI Labscan, ไทย)
- 2.13 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (RCI Labscan, ไทย)
- 2.14 โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Loba, อินเดีย)
- 2.15 ดีแอล-ไดไฮโอไทรทอล (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 ฟอลินซีโอแคลตูรีเอเจน (Loba, อินเดีย)
- 2.21 โมโนโซเดียมฟอสเฟต (RCI Labscan, ไทย)

- 2.22 ออร์โท-พาทาลิก อัลดีไฮด์ (Sigma Chemical Co., สหรัฐอเมริกา)
- 2.23 เอทานอล (RCI Labscan, ไทย)
- 2.24 เอทิลอะซีเตต (RCI Labscan, ไทย)
- 2.25 เอนไซม์อัลคาเลส 2.4L จาก *Bacillus licheniformis* (Novozyme, เดนมาร์ก)
- 2.26 แองจิโอเทนซิน-คอนเวอร์ติงเอนไซม์ จาก rabbit lung (Sigma Chemical Co., สหรัฐอเมริกา)
- 2.27 แอล-ซีรีน (Sigma Chemical Co., สหรัฐอเมริกา)

3. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.1 เกจวัดความดัน (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 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (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 ชุดถังปฏิกรณ์ (B.E.Marubishi (Thailand) Co., Ltd., ไทย)
- 3.10 บั๊มรีดสายยาง (Masterflex, สหรัฐอเมริกา)
- 3.11 โพลีซิลโฟนเมมเบรน (Healthcare Bio-Science (Thailand) Ltd, ไทย)
- 3.12 มาตรฐานวัดความหนืดแบบไหลผ่านช่องแคบ (Schott instruments, เยอรมนี)
- 3.13 สายยางซิลิโคน (Masterflex, สหรัฐอเมริกา)
- 3.14 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Mettler, เยอรมนี)

วิธีการ

1. การเพิ่มประสิทธิภาพการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลาไหล ด้วยกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน

การเตรียมสารละลายโปรตีนจากเนื้อปลาไหล

การเตรียมตัวอย่างสารละลายโปรตีนจากเนื้อปลาไหลใช้วิธีการปรับสภาพด้วยอัลคาไลน์ (alkaline treatment) โดยดัดแปลงวิธีการของ Raghavan และ Kristinsson (2008) นำปลานิลสดขนาดกลาง (350-500 กรัมต่อตัว) แล่เอาแต่ส่วนที่เป็นเนื้อแยกก้างและหนังปลาออก บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ ได้เนื้อปลาบดละเอียดที่มีโปรตีนเริ่มต้นอยู่ในช่วงร้อยละ 17 ถึง 25 จากนั้นชั่งให้ได้อัตราส่วนผสมระหว่างเนื้อปลาบดละเอียดต่อน้ำในอัตราส่วนของเนื้อปลาบดละเอียด 1 ส่วนต่อน้ำ 7 ส่วน ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 11 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ และกวนผสมในถังผสมเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และปรับค่าความเป็นกรดต่างของผสมเท่ากับ 8 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และฟอสเฟตบัฟเฟอร์กวนผสมในถังผสมเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง กรองสารละลายผสมทั้งหมดด้วยผ้าขาวบาง เก็บตัวอย่างสารละลายผสมที่ผ่านการกรองไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนให้ด้วยวิธี Kjeldahl (AOAC, 1999) โดยจะได้สารละลายที่มีโปรตีนความเข้มข้นประมาณร้อยละ 2 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสโดยใช้สารละลายโปรตีนจากเนื้อปลาไหลเป็นสารตั้งต้น ดัดแปลงวิธีการของ Wang และ Hesseltine (1965) เอนไซม์โปรตีเอสที่ใช้ในการทดลองคือ เอนไซม์อัลคาเลส 2.4L จาก *Bacillus licheniformis* ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพในกาย่อยโปรตีนในเนื้อปลาไหลให้ได้เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูง (Charoenphun *et al.*, 2013b) เริ่มจากการนำเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที ก่อนผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมสารละลายโปรตีนจากปลาเนื้อนิลที่มีความเข้มข้นของโปรตีนร้อยละ 1 ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมกรดกรดไทรคลอโรอะซีติกความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 30 นาที และกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 นำสารละลายที่ผ่านการกรองแล้ว 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมฟอสฟอรัสโอแคลตอรีเอเจนความเข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นา

โนเมตร โดยใช้กำลังเป็นแบลงค์ กราฟมาตรฐานใช้สารละลายไทโรซีนเป็นสารมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสคำนวณตามสมการที่ (1)

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส}^* = \frac{[\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร } X \text{ ปริมาตรทั้งหมด } X \text{ จำนวนเท่าความเจือจาง}]}{[\text{ค่าความเข้มข้นของสมการ } X \text{ เวลา}]} \quad (1)$$

*กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส มีหน่วยเป็นยูนิตต่อกรัมของโปรตีนปลาไหล

การย่อยสารละลายเนื้อปลาก่อนเข้าระบบอัลตราฟิลเตรชัน

นำสารละลายโปรตีนปลาไหลที่เตรียมได้ ซึ่งมีความเข้มข้นของโปรตีนเป็นร้อยละ 2 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 2.4L (กิจกรรม 20 ยูนิตต่อกรัมของโปรตีนปลาไหล) ด้วยอุณหภูมิในการย่อย 50 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 8 ในถังปฏิกรณ์ นาน 120 นาที หยุดกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที สารละลายที่ได้มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกับสีขาวขุ่นนำไปวัดความหนืดด้วยมาตรวัดความหนืดแบบไหลผ่านช่องแคบได้ค่าเท่ากับ 0.0007 ปาสคาลต่อวินาที และวัดน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้าได้ค่าเท่ากับ 1050 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการทดลองของ Lowry และคณะ (1951) ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรผสมกับอัลคาไลน์-คอปเปอร์ รีเอเจนต์ (โซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 2 ละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ผสมกับโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตความเข้มข้นร้อยละ 1 และสารละลายคอปเปอร์ (II) ซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ในอัตราส่วน 100 ต่อ 1 ต่อ 1) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 10 นาที ผสมให้เข้ากัน และเติมสารละลายฟอลินซีโอแคลตูรีเอเจน (ฟอลินซีโอแคลตู 1 ส่วน ต่อ น้ำกลั่น 1 ส่วน) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร น้ำกลั่นเป็นแบลงค์ และใช้สารละลายโบวายซีรัมอัลบูมินเป็นสารมาตรฐาน

ระบบอัลตราฟิลเตรชัน

ระบบอัลตราฟิลเตรชันที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ออกแบบโดยดัดแปลงตามวิธีการของ Laorko และคณะ (2011) ลักษณะการจัดวางระบบดังแสดงใน Figure 1 ประกอบด้วยตัวกรองคือโพลีซัลโฟนเมมเบรน เกจวัดความดันสำหรับวัดความดันเข้าและออกจากเมมเบรน ความเร็วตามขวางควบคุมโดยใช้ปั๊มรีดสายยาง ความดันขับควบคุมโดยใช้รีเทนเททวาล์ว และ เพอมิเอทวาล์ว อุณหภูมิของสารละลายควบคุมโดยการหมุนวนของน้ำร้อนผ่านตัวควบคุมภายในถังปฏิกรณ์ ปริมาตรของเพอมิเอทวาล์วในรูปของน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า

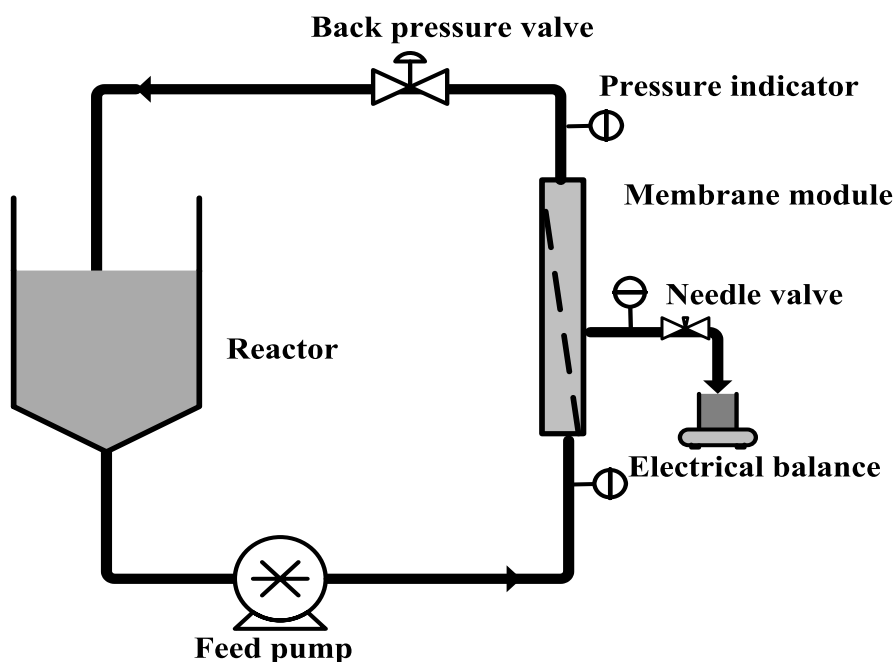


Figure 1 Schematic diagram of UF system

1.1 การศึกษาผลของ MWCO ต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลาไหลด้วยกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน

คัดเลือกขนาดโมเลกุลที่เหมาะสมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลาไหลที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 2.4L ตามขั้นตอนที่กล่าวไว้ข้างต้น ทำการแยกเพปไทด์ด้วยระบบอัลตราฟิลเตรชันโดยใช้เมมเบรนที่มีขนาด MWCO เท่ากับ 15 และ 10 กิโลดาลตัน โดยกำหนดหนดสถานะในการกรองด้วยความดันขับ 1.5 บาร์ ความเร็วตามขวาง 1.0 เมตรต่อวินาที และ ค่าเฟคเตอร์ความเข้มข้นเชิงปริมาตร (volume concentration factor, VCR) เท่ากับ 1.25 วิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ของเพปไทด์จากเนื้อปลาไหลในรีเทนเทท และเพอมีเอท ค่าการส่งผ่านโปรตีน (protein transmission (T_p)) คำนวณดังสมการที่ 2

$$\text{ค่าการส่งผ่านโปรตีน (\%)} = \frac{\text{ความเข้มข้นของโปรตีนในเพอมีเอท}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายเริ่มต้น}} \times 100 \quad (2)$$

เมื่อ ความเข้มข้นของโปรตีนมีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การวิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ของเพปไทด์จากเนื้อปลาไหลดัดแปลงตามวิธีการทดลองของ Cushman และ Cheung (1971) ใช้ N-Hippuryl-His-Leu hydrate (Hip-His-Leu) เป็นสารตั้งต้น การทดลองเริ่มจากการนำตัวอย่างที่ผ่านการกรองด้วยอัลตราฟิลเตรชันมา 50 ไมโครลิตร และ

สารละลายเอนไซม์ ACE ความเข้มข้น 2.5 มิลลิยูนิต ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมนลงในสารละลาย N-Hippuryl-His-Leu hydrate ความเข้มข้น 12.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์-บอเรต บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 8.3 นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.5 นอร์มัล ปริมาตร 250 ไมโครลิตร สกัดกรดฮิปปูริก (hippuric acid) ออกมาด้วยการเติมเอทิลอะซีเตตลงไปปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 228 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณการยับยั้งเอนไซม์ ACE ของเพปไทด์จากเนื้อปลานิล ตัวอย่างควบคุมทำเหมือนวิธีการข้างต้น แต่จะใช้สารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แทนการใส่ตัวอย่างที่ผ่านการกรองด้วยอัลตราฟิลเตรชัน ใช้แคปโทพริลเป็นสารมาตรฐานในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE มีหน่วยเป็นไมโครกรัมสมมูลของแคปโทพริลต่อมิลลิลิตร หรือคำนวณในรูปร้อยละการยับยั้งเอนไซม์ ACE ของเพปไทด์จากเนื้อปลานิลดังสมการที่ 3

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

เมื่อ	E_c	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 228 นาโนเมตร ของบัฟเฟอร์ก่อนหยุดปฏิกิริยา
	E_s	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 228 นาโนเมตร หลังหยุดปฏิกิริยา
	E_b	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 228 นาโนเมตร ของตัวอย่างก่อนหยุดปฏิกิริยา

1.2 การศึกษาผลของความดันขับและความเร็วตามขวางต่อค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท และการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองในข้อ 1.1 มาศึกษาผลของความดันขับและความเร็วตามขวางเพื่อแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ด้วยอัลตราฟิลเตรชัน โดยการวนรีเทนเททกลับไปในถึงปฏิกรณ์หมุนเวียน (total recycle mode) ทำการแปรเปลี่ยนความดันขับในช่วง 0.5 ถึง 2.5 บาร์ และความเร็วตามขวางในช่วง 0.5 ถึง 1.5 เมตรต่อวินาที ตามลำดับ กำหนดให้ความดันขับเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 บาร์ จากนั้นค่อยๆ เพิ่มความดันขับทุกๆ 30 นาที วิเคราะห์ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท การส่งผ่านของโปรตีน และวิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ของเพปไทด์จากเนื้อปลานิลตามวิธีการที่ได้กล่าวมาข้างต้น

1.3 การศึกษาผลของ gas-liquid two-phase flow ต่อค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท และการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลาไหลด้วยกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองในข้อที่ 1.2 มาศึกษาผลของ gas-liquid two-phase flow ด้วยอัลตราฟิลเตรชันภายใต้ total recycle mode ก๊าซไนโตรเจนถูกอัดฉีดเข้าไปในทางเข้าของท่อรูปตัว Y อัตราการมีเกจควบคุมอัตราการไหลของก๊าซ และเกจวัดความดัน โดยให้ความเร็วตามขวางคงที่และแปรเปลี่ยนความเร็วของก๊าซ อัตราส่วนการไหลระหว่างของเหลวและก๊าซคำนวณจากค่าแฟคเตอร์ของการฉีดก๊าซ gas injection factor (\mathcal{E}) หาได้จากสมการที่ 4

$$\mathcal{E} = \frac{U_g}{(U_g + U_l)} \quad (4)$$

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

วิเคราะห์ฟลักซ์ของเพอมีเอท การส่งผ่านของโปรตีน และวิเคราะห์ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ของเพปไทด์จากเนื้อปลาไหลตัดแปลงตามวิธีการที่ได้กล่าวมาข้างต้น แปรเปลี่ยนระดับการไหลของก๊าซจากการไหลแบบฟองก๊าซถึงระดับการไหลแบบกระสุนตามความเร็วที่เพิ่มขึ้น เป็นเวลา 150 นาที ตามวิธีการทดลองของ Laorko และคณะ (2011) หาค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท 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 5

$$N_s = \frac{\rho_{liquid} u^2_{liquid}}{TMP} \quad (5)$$

การไหลแบบ gas-liquid two-phase flow ประยุกต์สมการเพื่อคำนวณหาค่า shear stress number (N'_s) ได้ดังสมการที่ 6

$$N'_s = \frac{\rho_{mixture} u^2_{mixture}}{TMP} \quad (6)$$

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 7

$$u_{mixture} = u_{liquid} + u_{gas} \quad (7)$$

ความหนาแน่นของของผสมคำนวณจากสมการที่ 8

$$\rho_{mixture} = \frac{\rho_{gas}u_{gas} + \rho_{liquid}u_{liquid}}{u_{mixture}} \quad (8)$$

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) โดยค่าฟลักซ์ของเฟอมีเอทและค่าการกักกันของเมมเบรนเป็นค่าที่แสดงสมรรถนะในกระบวนการเมมเบรน สามารถอธิบายด้วยกฎของ Darcy โดยที่ค่าฟลักซ์จะแสดงถึงปริมาณของเฟอมีเอทที่ผ่านเมมเบรนต่อหน่วยพื้นที่ต่อเวลา (Krishna *et al.*, 2003) และสามารถเขียนในรูปของแรงดันขับ และความต้านทานการไหลได้ดังนี้

$$J = \frac{TMP}{\mu R_t} \quad (9)$$

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

ความต้านทานรวมคำนวณจากสมการที่ 10

$$R_t = R_m + R_{if} + R_{if} \quad (10)$$

$$R_{if} = R_{if-in} + R_{if-ex} \quad (11)$$

เมื่อ	R_m	= ความต้านทานของเมมเบรน (m^{-1})
	R_{rf}	= ความต้านทานฟาวลิงแบบผันกลับได้ (reversible fouling) (m^{-1})
	R_{if}	= ความต้านทานฟาวลิงแบบผันกลับไม่ได้ (irreversible fouling) (m^{-1})
	R_{if-in}	= ความต้านทานฟาวลิงภายในแบบผันกลับไม่ได้ (internal irreversible fouling) (m^{-1})
	R_{if-ex}	= ความต้านทานฟาวลิงภายนอกแบบผันกลับไม่ได้ (external irreversible fouling) (m^{-1})

ความต้านทานที่เกิดขึ้นมีผลต่อฟลักซ์ของเพอมีเอทของกระบวนการเมมเบรน ในสภาวะปกติ ความต้าน R_m คำนวณโดยตรงจากค่าฟลักซ์ของน้ำก่อนใช้งาน ค่า R_{rf} หาได้จากฟลักซ์ของน้ำผ่านเมมเบรนหลังใช้งาน และค่า R_{if} หาได้จากค่าฟลักซ์หลังจากล้างด้วยน้ำสะอาด ที่ซึ่งเมมเบรนจะถูกทำความสะอาดด้วยสารเคมีต่างๆ R_f คือความต้านทานรวม คำนวณโดยใช้สมการที่ (10) และ (11) ค่า R_{rf} หาจากฟลักซ์ของน้ำ หลังจากกระบวนการกรองตัวอย่างเสร็จสิ้นผิวหน้าของเมมเบรนจะถูกชะล้างด้วยน้ำสะอาด ในขณะที่วาล์วของเพอมีเอทจะถูกปิดในขั้นตอนการทำความสะอาดเมมเบรนน้ำสะอาดจะไหลผ่านเมมเบรนด้วยความเร็วตามขวาง 1.5 เมตรต่อวินาที และความดันขั้ว 0.5 บาร์ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากการล้างครั้งแรกเสร็จสิ้นวาล์วของเพอมีเอทจะถูกเปิด และทำการวัดค่าฟลักซ์เพื่อประมาณความต้านทานการเกิดฟลาวลิ่ง จากนั้นปิดวาล์วเพอมีเอทอีกครั้งล้างเมมเบรนด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 นอร์มัล อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความดันขั้ว 0.5 บาร์ และความเร็วตามขวาง 1.5 เมตรต่อวินาที เป็นเวลา 40 นาที เพื่อกำจัดฟาวลิงภายนอกแบบผันกลับไม่ได้ หลังจากนั้นล้างสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ออกด้วยน้ำสะอาด และวัดค่าฟลักซ์เพื่อประมาณความต้านทานของเมมเบรน ในขั้นตอนต่อมาหาค่า R_{if-in} โดยล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 50 พีพีเอ็ม อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความดันขั้ว 0.5 บาร์ ความเร็วตามขวาง 1.5 เมตรต่อวินาที เป็นเวลา 40 นาที ค่าความต้านทานถูกนำมาคำนวณโดยใช้สมการที่ (10) และ (11) หลังจากนั้นทำความสะอาดเมมเบรนด้วยน้ำสะอาด ตามด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 นอร์มัล อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง และใช้น้ำสะอาดล้างซ้ำจนมีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 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 12

$$Recovery (\%) = \frac{\text{ปริมาตรของเพอมีเอท}}{\text{ปริมาตรเริ่มต้น}} \times 100 \quad (12)$$

2. การผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลาไหลด้วยระบบ CBEMR

2.1 การศึกษาผลของเวลาในการย่อย (pre-hydrolysis) โปรตีนจากเนื้อปลาไหลต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ด้วยระบบ CBEMR

การเตรียมตัวอย่างสารละลายโปรตีนจากเนื้อปลาไหลใช้วิธีการปรับสภาพด้วยอัลคาไลน์ (alkaline treatment) โดยดัดแปลงวิธีการของ Raghavan และ Kristinsson (2008) นำปลานิลสดขนาดกลาง (350-500 กรัมต่อตัว) แล่เอาแต่ส่วนที่เป็นเนื้อแยกก้างและหนังปลาออก บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ ได้เนื้อปลาบดละเอียดที่มีโปรตีนเริ่มต้นอยู่ในช่วงร้อยละ 17 ถึง 25 จากนั้นซึ่งให้ได้อัตราส่วนผสมระหว่างเนื้อปลาบดละเอียดต่อน้ำในอัตราส่วนของเนื้อปลาบดละเอียด 1 ส่วนต่อน้ำ 14 ส่วน ปรับค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 11 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ และกวนผสมในถังผสมเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และปรับค่าความเป็นกรดต่างของของผสมเท่ากับ 8 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และฟอสเฟตบัฟเฟอร์กวนผสมในถังผสมเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง กรองสารละลายผสมทั้งหมดด้วยผ้าขาวบาง เก็บตัวอย่างสารละลายผสมที่ผ่านการกรองไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนให้ด้วยวิธี Kjeldahl (AOAC, 1999) โดยจะได้สารละลายที่มีโปรตีนความเข้มข้นประมาณร้อยละ 1 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) สารละลายที่ได้มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันสีขาวขุ่นนำไปวัดความหนืดด้วยมาตรวัดความหนืดแบบไหลผ่านช่องแคบได้ค่าเท่ากับ 0.0019 ปาสคาลต่อวินาที และวัดน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้าได้ค่าเท่ากับ 1366 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร

นำสารละลายโปรตีนจากเนื้อปลาไหลที่เตรียมได้ปริมาตร 1300 มิลลิลิตร ใส่ในถังปฏิกรณ์ควบคุมค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสตลอดการทดลอง เติมเอนไซม์อัลคาเลส 2.4L (อัตราส่วนเอนไซม์ต่อสารละลายโปรตีนเท่ากับ 20 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน) โดยใช้เมมเบรนขนาดที่ถูกคัดเลือกตามขั้นตอนในข้อที่ 1 สภาวะที่ใช้ในการกรองของเมมเบรนคือความดันขับ 0.5 บาร์ ความเร็วตามขวาง 0.8 เมตรต่อวินาที ลักษณะการจัดวางระบบดังแสดงใน Figure 2 ประกอบด้วยตัวกรองคือโพลีซัลโฟนเมมเบรน เก็บวัดความดันสำหรับวัดความดันเข้าและออกจากเมมเบรน ความเร็วตามขวางควบคุมโดยใช้ปั๊มรีดสายยาง ส่วนความดันขับควบคุมโดยใช้รีเทนเททวาล์ว และเพอมีเอทวาล์ว อุณหภูมิของระบบถูกควบคุมโดยการวนของน้ำผ่านตัวควบคุมอุณหภูมิภายในถังปฏิกรณ์ ปริมาตรของเพอมีเอทวาล์วในรูปของน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า ควบคุมความเร็วของการกวนด้วยใบพัดชนิดใบกังหันแผ่นแบน (flat blade disc turbine) ค่า Reynolds number (R_e) เท่ากับ 21,228 (McCabe และ Smith, 1976)

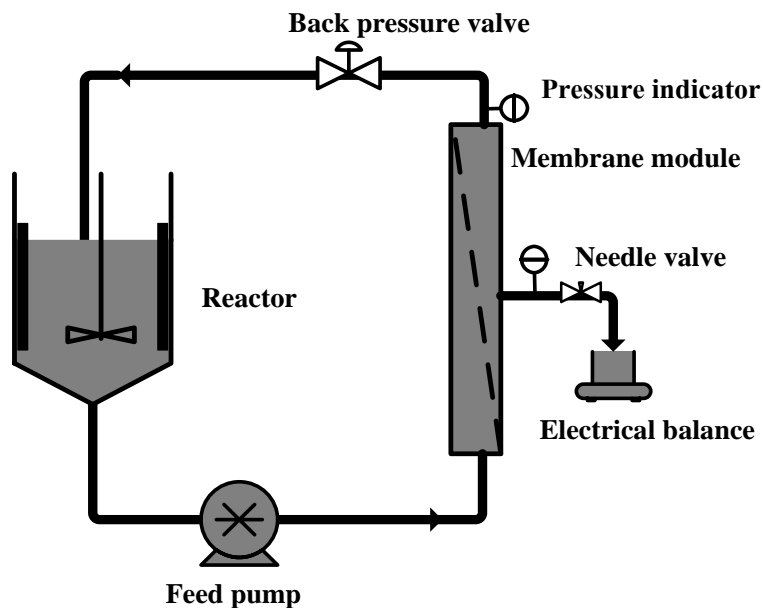


Figure 2 Schematic diagram of CBEMR system

การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสารละลายโปรตีนเบื้องต้น ก่อนนำเข้าสู่ระบบ CBEMR โดยการทดลองย่อยโปรตีนที่เวลา 0 30 60 90 และ 120 นาที ในถังปฏิกรณ์ก่อนทำการแยกเปปไทด์ด้วยอัลตราฟิลเตรชันเป็นเวลา 360 นาที สุ่มเก็บตัวอย่างเพอมีเอทและรีเทนเทททุก ๆ 30 นาที และให้ความร้อน 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ วัดความหนืด กิจกรรมของเอนไซม์ ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท ความต้านทานฟาวลิง ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ค่าการส่งผ่านโปรตีน ตามวิธีการที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น และวิเคราะห์หาระดับการย่อย (degree of hydrolysis) ของโปรตีน เป็นการวัดร้อยละของการตัดพันธะเปปไทด์ของโปรตีนจากการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส ประเมินจากปริมาณกรดอะมิโนที่ได้หลังการย่อยด้วยเอนไซม์ ด้วยวิธีออร์โท-พาทาลิก อัลดีไฮด์ (o-phthalic aldehyde (OPA)) โดยดัดแปลงวิธีของ Wanasundara และคณะ (2002) สารละลายออร์โท-พาทาลิกอัลดีไฮด์รีเอเจนต์ (OPA reagent) ถูกเตรียมก่อนใช้งานทุกครั้ง เตรียมจากออร์โท-พาทาลิก อัลดีไฮด์ความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์ (ละลายในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95) และดีแอล-ไดไซโอไธเรออล (DL-dithiothreitol) ความเข้มข้น 5.7 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายโซเดียมเตตระโบเรต เดคาไฮเดรตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ปริมาณร้อยละ 2 (สัดส่วนโดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ตัวอย่างสารละลายโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอสปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายออร์โท-พาทาลิกอัลดีไฮด์รีเอเจนต์ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร จำนวนกรดอะมิโนอิสระที่ได้จากกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส ถูกคำนวณในรูปของ serine-NH₂ โดยใช้แอล-ซีรีน (L-serine) เป็นสารมาตรฐาน จำนวนกรดอะมิโนเริ่มต้นทั้งหมดในโปรตีนจากเนื้อปลานิลหาได้จากการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 โมลาร์ อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ร้อยละของระดับการย่อยคำนวณได้จากสมการที่ 13

$$DH (\%) = \frac{[NH_2]_{T_x} - [NH_2]_{T_0}}{[NH_2]_{Total} - [NH_2]_{T_0}} \times 100 \quad (13)$$

เมื่อ $[NH_2]_{T_0}$ = จำนวนของ α -NH₂ groups ที่เวลาในการย่อยด้วย 0 นาที
 $[NH_2]_{T_x}$ = จำนวนของ α -NH₂ groups ในส่วนที่อยู่เหนือตะกอนหลังจากการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส เมื่อเวลาผ่านไป x นาที ในแต่ละการทดลอง
 $[NH_2]_{Total}$ = จำนวนของ α -NH₂ groups ในโปรตีนจากเนื้อปลานิลเมื่อถูกการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก

2.2 ศึกษาผลของความดันขั้วต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยระบบ CBCMR

คัดเลือกระยะเวลาในการย่อยที่เหมาะสมจากข้อ 2.1 ศึกษาผลของความดันขั้วต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยตัวระบบ CBCMR สารละลายโปรตีนจากเนื้อปลานิล ถูกย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 2.4L ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปริมาตรเริ่มต้นของสารละลายโปรตีนเท่ากับ 1300 มิลลิลิตร ในถังปฏิกรณ์ อัตราส่วนของเอนไซม์อัลคาเลส 2.4L ต่อสารละลายโปรตีนเป็น 20 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน การทดลองแปรเปลี่ยนความดันขั้วจาก 0.5 บาร์ ถึง 2.5 บาร์ ใช้เวลาในการกรอง 360 นาที สุ่มเก็บตัวอย่างเพอมีเอทและรีเทนเทท ทุกๆ 30 นาที และให้ความร้อน 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ วัตถุประสงค์ของเอนไซม์ ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท ความต้านทานฟาวลิง ค่าการส่งผ่านโปรตีน และฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ตามวิธีการที่ได้กล่าวมาข้างต้น

2.3 ศึกษาผลของความเร็วดำเนินการ ต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยตัวระบบ CBCMR

คัดเลือกความดันขั้วที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 ศึกษาผลของความเร็วดำเนินการต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยตัวระบบ CBCMR สารละลายโปรตีนจากเนื้อปลานิล ถูกย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 2.4L ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปริมาตรเริ่มต้นของสารละลายโปรตีนเท่ากับ 1300 มิลลิลิตร ในถังปฏิกรณ์ อัตราส่วนของเอนไซม์อัลคาเลส 2.4L ต่อสารละลายโปรตีนเป็น 20 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน การทดลองแปรเปลี่ยนความเร็วดำเนินการจาก 0.8 เมตรต่อวินาที ถึง 2.0 เมตรต่อวินาที ใช้เวลาในการกรอง 360 นาที สุ่มเก็บตัวอย่างเพอมีเอทและรีเทนเทททุกๆ 30 นาที และให้ความร้อน 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ วัตถุประสงค์ของเอนไซม์ ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท ความต้านทานฟาวลิง ค่าการส่งผ่านโปรตีน และฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ตามวิธีการที่ได้กล่าวมาข้างต้น

2.4 ศึกษาผลของ gas-liquid two-phase flow ต่อการแยกเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง เอนไซม์ ACE จากเนื้อปลาไหลด้วยระบบ CBCMR

คัดเลือกความดันขับและความเร็วตามขวางจากข้อมูลในข้อที่ 2.2 และ 2.3 สารละลายโปรตีนจากเนื้อปลาไหล ถูกย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 2.4L ที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปริมาตรเริ่มต้นของสารละลายโปรตีนเท่ากับ 1300 มิลลิลิตร ในถังปฏิกรณ์ อัตราส่วนของเอนไซม์อัลคาเลส 2.4L ต่อสารละลายโปรตีนเป็น 20 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน ใช้เวลาในการกรอง 360 นาที ก๊าซไนโตรเจนถูกฉีดเข้าไปในทางเข้าของท่อรูปตัว Y อัตราการไหลของก๊าซถูกควบคุมด้วยเกจวัดอัตราการไหลของก๊าซ และเกจวัดความดัน อัตราส่วนการไหลระหว่างของเหลวและก๊าซคำนวณจากสมการที่ 14 ค่าแฟคเตอร์ของการฉีดก๊าซมีค่าเท่ากับ 0 0.25 0.35 และ 0.5 หรือมีค่า N'_S เท่ากับ 0.019 0.026 0.030 และ 0.039 ตามลำดับ โดยการแปรเปลี่ยนระดับการไหลของก๊าซจากการไหลแบบฟองก๊าซถึงระดับการไหลแบบกระสุน สุ่มเก็บตัวอย่างเพอมีเอทและรีเทนเทททุก ๆ 30 นาที และให้ความร้อน 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ วัดกิจกรรมของเอนไซม์ ค่าพลังค์ของเพอมีเอท ความต้านทานพาวลิ่งค่าการส่งผ่านโปรตีน และฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ตามวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น คำนวณค่าคอนเวอร์ชัน (conversion) หรือการเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบไปเป็นผลผลิตที่สนใจ และ ค่าผลิตภาพ (productivity) ค่าคอนเวอร์ชันหาได้จากการดัดแปลงวิธีการของ Cui และคณะ (2011)

$$\text{Protein conversion (\%)} = \frac{C_p \times V_p}{C_f \times V_f} \times 100 \quad (14)$$

เมื่อ	C_f	=	ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายเริ่มต้น (mg mL^{-1})
	C_p	=	ความเข้มข้นของโปรตีนในเพอมีเอทที่เวลาใดๆ (mg mL^{-1})
	V_f	=	ปริมาตรของสารละลายเริ่มต้น (mL)
	V_p	=	ปริมาตรของเพอมีเอทที่เวลาใดๆ (mL)

การเปลี่ยนแปลงสารละลายโปรตีนไปเป็นเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE หาได้จาก การดัดแปลงวิธีการของ Cui และคณะ (2011) ดังสมการ

$$\text{ACE inhibitory activity conversion (\%)} = \frac{C_p \times V_p \times A_p}{C_f \times V_f \times A_f} \times 100 \quad (15)$$

เมื่อ	A_f	=	ความสามารถของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ในสารละลายเริ่มต้น ($\mu\text{g captopril g}^{-1}$ protein)
-------	-------	---	--

A_p = ความสามารถของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ในเพอมีเอทที่เวลาใดๆ
(μg captopril g^{-1} protein)

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

$$\text{Productivity of protein} = \frac{\text{Protein conversion}_t \times S_{0,t} \times F_t \times t}{\text{Enzyme concentration} \times \text{Substrate volume}_t} \quad (16)$$

เมื่อ $\text{protein conversion}_t$ = ค่าโปรตีนคอนเวอร์ชันที่เวลาใดๆ
 $\text{enzyme concentration}$ = ความเข้มข้นของเอนไซม์ (unit mL^{-1} of protein)
 $\text{substrate volume}_t$ = ปริมาตรของสารละลายในถังปฏิกรณ์ที่เวลาใดๆ (mL)
 $S_{0,t}$ = ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดในถังปฏิกรณ์ที่เวลาใดๆ (mg mL^{-1})
 F_t = อัตราการไหลของเพอมีเอทที่เวลาการย่อยใดๆ (mL min^{-1})
 t = เวลาในการย่อยสะสม (min)

ปริมาณผลผลิตภาพของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ด้วยระบบ CBCMR หาได้จากการดัดแปลงวิธีการของ Cui และคณะ (2011) ดังสมการ

$$\text{Bioactive productivity} = \frac{\text{Bioactive activity conversion}_t \times S_{0,t} \times F_t \times t}{\text{Enzyme concentration} \times \text{Substrate volume}_t} \quad (17)$$

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

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเพิ่มประสิทธิภาพการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลาหิล ด้วยกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน

1.1 ผลของ MWCO ต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลาหิล ด้วยกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน

การแยกเพปไทด์ด้วยอัลตราฟิลเตรชันที่มี MWCO 3 ขนาดคือ 1 กิโลดาลตัน 5 กิโลดาลตัน และ 10 กิโลดาลตัน พบว่า มีสารละลายส่วนของเพอมีเอทและรีเทนเททที่แยกได้ทั้งหมด 6 ส่วน ซึ่งแต่ละส่วนได้ปริมาณเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE แตกต่างกัน Table1 แสดงค่าการส่งผ่านโปรตีนและเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ของรีเทนเททและเพอมีเอท เมมเบรนขนาด MWCO 1 กิโลดาลตัน ให้ค่าการส่งผ่านโปรตีนต่ำที่สุดประมาณร้อยละ 82 เปรียบเทียบกับเมมเบรนขนาด 5 กิโลดาลตัน ร้อยละ 87 และเมมเบรนขนาด 10 กิโลดาลตัน ร้อยละ 92 ตามลำดับ อธิบายได้โดยขนาดของเพปไทด์และขนาดรูพรุนของเมมเบรน เพปไทด์ที่มีขนาดเล็กสามารถผ่านรูพรุนของเมมเบรนได้

Table 1 Protein transmission (T_p) and ACE inhibitory peptide activity of the retentate and permeate obtained during UF of tilapia protein hydrolysates (TMP = 1.5 bar, CFV = 1 m s^{-1} , temperature = $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, VCF = 1.25 and recovery = 20 %)

T_p (%) and ACE inhibitory activity (μg captopril g^{-1} protein)	UF fraction		
	10 kDa	5 kDa	1 kDa
T_p	92.0±0.01	87.0±0.01	82.0±0.05
ACE assay in retentate	50.4±0.40	59.0±0.50	70.79±0.40
ACE assay in permeate	63.2±0.30	74.0±0.30	86.6±0.50

เพปไทด์ส่วนของเพอมีเอทที่ได้จากการแยกด้วยเมมเบรนขนาด MWCO 1 กิโลดาลตัน ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงที่สุด (87 ไมโครกรัมแคปโตพริลต่อกรัมโปรตีน) รองลงมาคือส่วนของรีเทนเททจากการแยกด้วยเมมเบรน MWCO ขนาด 5 กิโลดาลตัน (74 ไมโครกรัมแคปโตพริลต่อกรัมโปรตีน) รีเทนเททจากการแยกด้วยเมมเบรน MWCO ขนาด 1 กิโลดาลตัน (71 ไมโครกรัมแคปโตพริลต่อกรัมโปรตีน) เพอมีเอทจากการแยกด้วยเมมเบรน MWCO ขนาด 10 กิโลดาลตัน (63 ไมโครกรัมแคปโตพริลต่อกรัมโปรตีน) รีเทนเททจากการแยกด้วยเมมเบรน MWCO ขนาด 5 กิโลดาลตัน (59

ไมโครกรัมแคปโตพริลต่อกรัมโปรตีน) และ รีเทนเทจจากการแยกด้วยเมมเบรน MWCO ขนาด 10 กิโลดาลตัน (50 ไมโครกรัมแคปโตพริลต่อกรัมโปรตีน) ตามลำดับ พบว่า ขนาดโมเลกุลของเพปไทด์มีผลต่อการออกฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิล ซึ่งเพปไทด์ขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 1 กิโลดาลตัน มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ได้ดีกว่าเพปไทด์ขนาดใหญ่ สอดคล้องกับรายงานของ Raghavan และ Kristinsson (2009) ซึ่งแยกเพปไทด์จากเนื้อปลานิลที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส พบว่า เพปไทด์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กจะให้ผลในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ได้ดีกว่าเพปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลขนาดใหญ่ โดยขนาดที่เหมาะสมของเพปไทด์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จะมีขนาดอยู่ในช่วง 500 ถึง 800 ดาลตัน (Charoenphun *et al.*, 2013b) ดังนั้นเมมเบรนที่มีขนาดเหมาะสมต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE คือเมมเบรนที่มีขนาดประมาณ 1 กิโลดาลตัน การทำงานของเพปไทด์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE คือเพปไทด์ขนาดเล็กจะไปแข่งขันกับเอนไซม์ในการจับกับสารตั้งต้นตรงบริเวณเร่ง (active site) (Ko *et al.*, 2012) นอกจากนี้สารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE เช่นเดียวกับเพปไทด์ในธรรมชาติถูกผลิตในรูปสารสังเคราะห์เพื่อใช้ในการรักษาโรค (Matsui and Matsumoto, 2006) เช่น แคปโตพริล (captopril) หรือ อีนาลาพริล (enalapril) โดยโครงสร้างหลักประกอบด้วยกรดอะมิโน อะลานีนต่อกับโพรลีน (Alanine-Proline) หรือ ฟีนีลอะลานีนต่อกับอะลานีนต่อกับโพรลีน (Phenylalanine- Alanine-Proline) ตามลำดับ (Hooper, 1991) ดังนั้นปัจจุบันจึงมีการวิจัยเพื่อผลิตเพปไทด์ขนาดเล็กจากแหล่งโปรตีนต่างๆ เพื่อพัฒนาเป็นอาหารลดความดันโลหิตผ่านการกระทำยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE

1.2 ผลของความดันขั้วและความเร็วตามขวางต่อค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท และการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน

เมมเบรนที่มี MWCO ขนาด 1 กิโลดาลตัน ถูกคัดเลือกเพื่อใช้ในการศึกษาผลของความดันขั้วและความเร็วตามขวางต่อค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท และการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน (Figure 3) ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทเพิ่มแปรผันตรงกับการเพิ่มขึ้นของค่าความดันขั้วและความเร็วตามขวาง ที่ความเร็วตามขวางต่ำ (0.7 เมตรต่อวินาที) ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทเพิ่มขึ้นจาก 0.5 ถึง 7.0 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง เมื่อความดันเพิ่มขึ้นจาก 0.5 ถึง 2.0 บาร์ ขณะที่ความเร็วตามขวางสูง (2.0 เมตรต่อวินาที) ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทเพิ่มจาก 2.8 ถึง 11.2 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง เมื่อความดันขั้วเพิ่มจาก 0.5 ถึง 2.0 บาร์

เนื่องจากการเพิ่มความเร็วตามขวางทำให้โมเลกุลขนาดเล็กจำนวนมากผ่านเมมเบรนส่งผลต่อการเพิ่มค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท (Cheryan, 1986) สอดคล้องกับการรายงานของ Giri และ Mangaraj (2014) พบว่าปริมาตรของเพอมีเอทเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความดันขั้ว เมื่อใช้อัลตราฟิลเตรชันขนาด MWCO ขนาด 1 กิโลดาลตัน กรองนมถั่วเหลืองด้วยความดันขั้วแตกต่างกัน ในการกรองสารละลายโปรตีน ความดันขั้วจะช่วยพาโมเลกุลของโปรตีนผ่านผิวหน้าของเมมเบรน โมเลกุลของโปรตีนมีขนาดเล็ก

เพียงพอที่จะผ่านรูพรุนของเมมเบรน โดยจะอาศัยแรงลากตามขวาง (Ronco *et al.*, 2008) ในกรณีที่มีการใช้ความดันขับหลายระดับ แนวโน้มการเพิ่มค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทจะแปรผันตรงกับความดันขับเป็นเส้นตรงตามกฎของดาร์ซี สามารถอธิบายได้โดยใช้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทและความดันขับ ลักษณะกราฟในช่วงแรกค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทจะมีแนวโน้มเป็นเส้นตรงเมื่อความดันขับเพิ่มขึ้น เป็นช่วงที่การกรองขึ้นอยู่กับความดันขับ จนถึงความดันขับระดับหนึ่งค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทมีแนวโน้มคงที่ เป็นช่วงที่การกรองไม่ได้ขึ้นกับความดันขับ ซึ่งถ้าการกรองอยู่ในช่วงนี้แม้จะเพิ่มความดันสูงขึ้นก็ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท (Cheryan, 1986) ในการศึกษาครั้งนี้แนวโน้มของกราฟเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรง ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทเพิ่มขึ้นตามค่าความดันขับเป็นช่วงที่การกรองขึ้นอยู่กับความดันขับจะได้ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทที่สูง การใช้ความดันที่สูงเกินไปในการกรองมีโอกาสทำให้เกิดการสะสมของอนุภาคที่ผิวหน้าของเมมเบรนจะสูง และทำให้เกิดฟลาวลิ่งที่เกาะติดแน่นกับพื้นผิวของเมมเบรน (De Bruijn *et al.*, 2002) ตัวอย่างเช่นการกรองน้ำแอมบีลด้วยเมมเบรน พบว่าเมื่อเพิ่มความดันขับส่งผลให้ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น จนกระทั่งถึงปริมาตรสูงสุดจากนั้นค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทมีแนวโน้มลดลงเมื่อใช้ความดันขับที่สูงขึ้น (Rao *et al.*, 1987) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ช่วงของความดันขับอยู่ในช่วงที่อัตราการกรองขึ้นกับความดันจึงไม่สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงที่ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทคงที่เมื่อความดันขับสูงระดับหนึ่ง

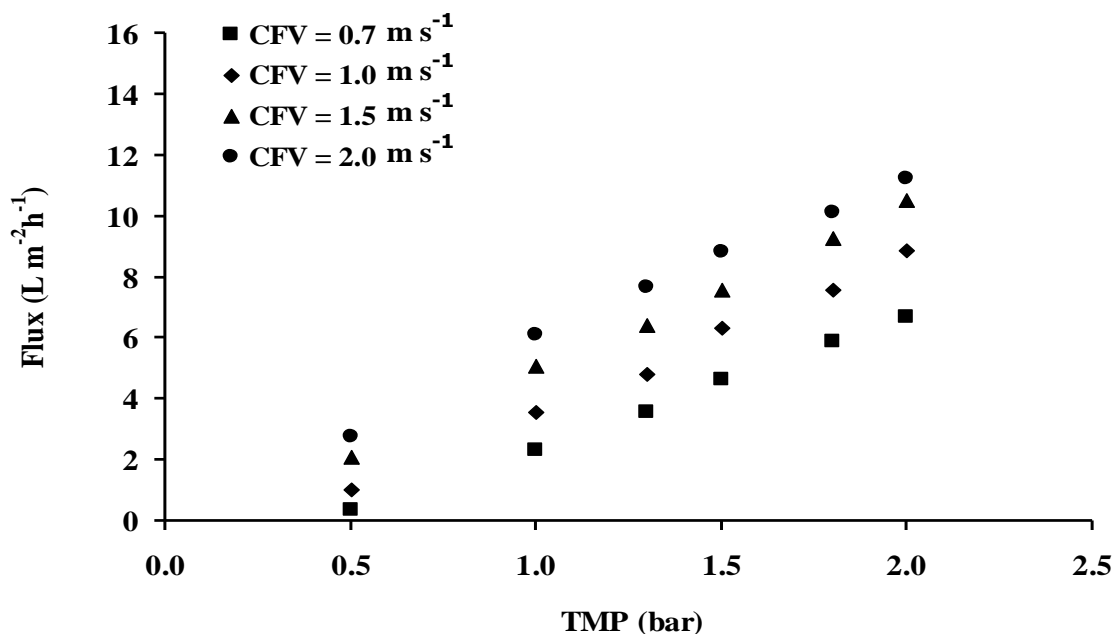


Figure 3 Effect of CFV and TMP on permeate flux during UF of tilapia protein hydrolysate using 1 kDa membrane in total recycle mode

บทบาทของความเร็วตามขวางในกระบวนการกรอง การเพิ่มความเร็วตามขวางช่วยเพิ่มอัตราการถ่ายเทมวลของสารในระหว่างการกรอง (She *et al.*, 2009) Kim และ Liu (2008) อธิบายการกระจายตัวของอนุภาคที่ถูกควบคุมด้วย 2 ปัจจัย คือ เอนทัลปีอุณหพลศาสตร์ ควบคุมการไหลของอนุภาคขนาดเล็ก และ ความเค้นของพลศาสตร์ของการไหล ควบคุมการไหลของอนุภาคขนาดใหญ่ (Kim and Liu, 2008) การศึกษาช่วงของเส้นผ่าศูนย์กลางโมเลกุลระหว่างขนาดเล็กและขนาดใหญ่คือ 0.1 ถึง 1.0 ไมโครเมตร ความต้านทานจะลดลงและแรงเฉือนจะเพิ่มขึ้นเมื่อเส้นผ่าศูนย์กลางของโมเลกุลใหญ่กว่า 0.1 ไมโครเมตร แต่ถ้าเส้นผ่าศูนย์กลางของโมเลกุลต่ำกว่า 0.1 ไมโครเมตร พบการกระจายตัวแบบบราวน์ (Brownian diffusion) หรือการเคลื่อนที่ของอนุภาคในของไหล ที่เชื่อว่าเป็นไปโดยสุ่มมากกว่าการกระจายตัวเนื่องจากแรงเฉือน (shear-induced diffusion) ดังนั้นในกรณีของโปรตีนพลาโนลที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 0.1 ไมโครเมตร การเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนส่วนใหญ่จึงเป็นแบบบราวน์ คือเกิดการผลึกกันเองของโมเลกุลสารละลายเจือจาง การกระจายตัวเนื่องจากแรงเฉือนเป็นปัจจัยที่ช่วยเปิดการไหลของระบบการกรองที่มีความดันเป็นตัวขับเคลื่อนอนุภาค แรงลากมีประสิทธิภาพในการขับเคลื่อนโมเลกุลผ่านเมมเบรนอย่างต่อเนื่องที่อาศัย อย่างไรก็ตามการกรองจะอาศัยทั้งแบบบราวน์และการกระจายตัวเนื่องจากแรงเฉือนในสารละลายเข้มข้น สังเกตจากผลของการเพิ่มความดันทำให้ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทเพิ่มขึ้นและลดการเกิดฟลาวลิ่ง

Figure 4 แสดงผลของความดันขั้วและความเร็วตามขวางต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยเมมเบรนที่มี MWCO ขนาด 1 กิโลดาลตัน พบว่า การเพิ่มความดันขั้วและความเร็วตามขวางส่งผลให้ค่าการส่งผ่านโปรตีนและการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE เพิ่มขึ้น โดยการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE มีค่าสูงถึง 84 ไมโครกรัม และ ค่าการส่งผ่านโปรตีนสูงถึงร้อยละ 82 ที่ความดันขั้ว 2 บาร์ และความเร็วตามขวาง 2 เมตรต่อวินาที (Figure 5) กิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE แปรผันตรงกับการเพิ่มค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท ที่ได้อธิบายไว้ก่อนหน้านี้ เนื่องจากการเพิ่มความดันขั้วและความเร็วตามขวางช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกรองโมเลกุลขนาดเล็กผ่านเมมเบรน ค่าการส่งผ่านโปรตีนสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนที่ถูกกรองผ่านเมมเบรน ขณะที่คุณภาพของผลิตภัณฑ์สัมพันธ์กับกิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE

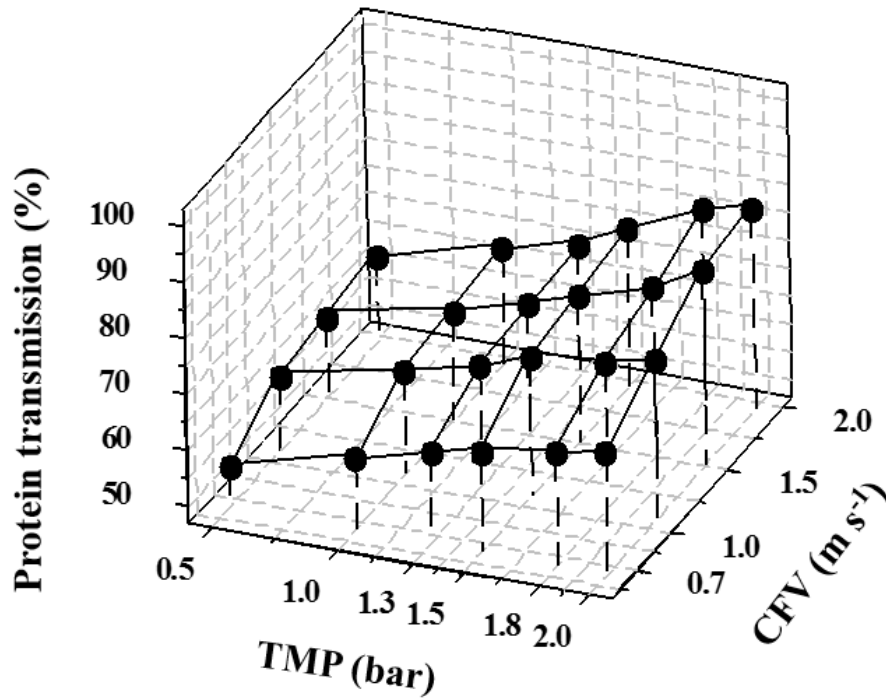


Figure 4 Effect of TMP and CFV on protein transmission of permeate obtained during UF of tilapia protein hydrolysate using 1 kDa membrane in total recycle mode

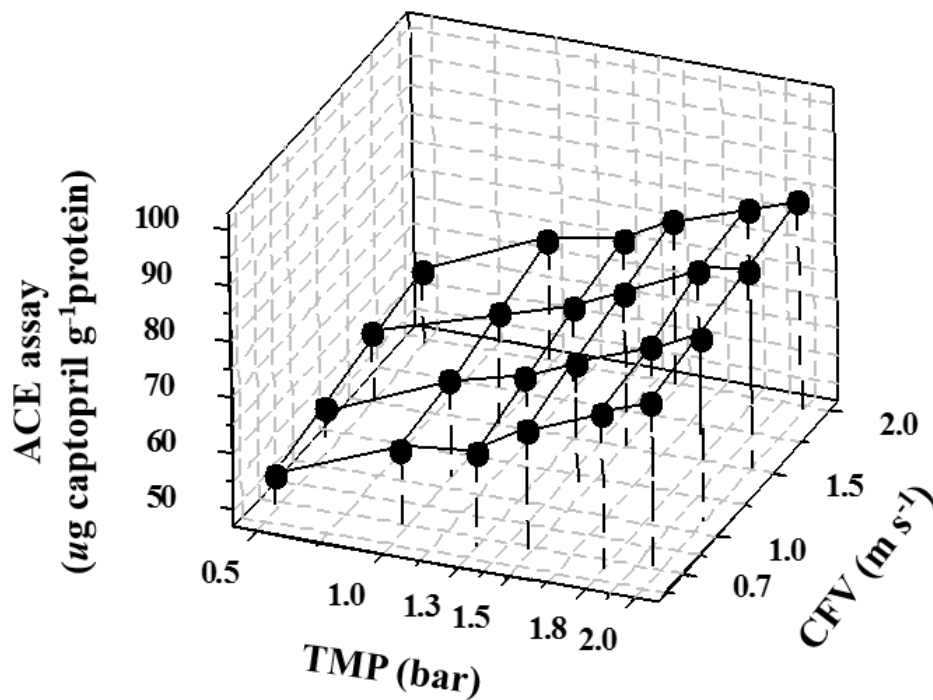


Figure 5 Effect of TMP and CFV on ACE inhibitory activity of permeate obtained during UF of tilapia protein hydrolysate using 1 kDa membrane in total recycle mode

1.3 ผลของ gas-liquid two-phase flow ต่อค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท และการแยกเฟสไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน

Figure 6 แสดงผลของความเค้นเฉือน (shear stress number; N'_S) ในช่วง 0.02 ถึง 0.04 ต่อการเพิ่มค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทในการแยกเฟสไทด์จากเนื้อปลานิลด้วยเมมเบรนที่มี MWCO ขนาด 1 กิโลดาลตัน โดยการกรองแบบวนกลับที่ความดันขับ 2 บาร์และความเร็วตามขวาง 2 เมตรต่อวินาที พบว่า ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแปรผันตรงกับการเพิ่มความเค้นเฉือน การเพิ่มขึ้นของค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทโดยความเค้นเฉือนเนื่องจากฟองอากาศในระบบ gas-liquid two-phase flow อธิบายได้ด้วยกลไกการเพิ่มความเค้นเฉือนบริเวณผนังเมมเบรนส่งผลให้เกิดฟองอากาศที่มีลักษณะเป็นแบบหัวกระสุน และช่วยการเพิ่มขึ้นของการถ่ายเทมวลเนื่องจากการเหนี่ยวนำของฟองอากาศทำให้เกิดการไหลทุติยภูมิ (Chiu and James, 2006) ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทเพิ่มขึ้นจาก 10 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง ที่ค่าความเค้นเฉือน 0.02 ถึง 15 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง ที่ค่าความเค้นเฉือน 0.04 สอดคล้องกับรายงานของ Li และคณะ (2008) และ Laorko และคณะ (2011) ซึ่งกรองตัวอย่างด้วยเมมเบรนและมีการใช้ระบบ gas-liquid two-phase flow เปรียบเทียบกับระบบที่ไม่มีกาซ พบว่า ความเค้นเฉือน 0.01 (ไม่เติมกาซ) ให้ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทต่ำที่สุด เมื่อมีการเติมกาซโดยควบคุมค่าความเค้นเฉือนที่ 0.02 ถึง 0.04 ช่วยเพิ่มค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทได้ ค่า N'_S ระหว่าง 0.02 ถึง 0.04 ในระบบ gas-liquid two-phase flow เป็นช่วงที่ฟองอากาศมีลักษณะเป็นหัวกระสุน ซึ่งเป็นช่วงที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ รูปแบบฟองอากาศแบบหัวกระสุน โดยฟองอากาศจะรวมตัวกันให้ลักษณะรูปร่างเหมือนหัวกระสุนขนาดใหญ่ตามขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของท่อ (Cui *et al.*, 2003) ฟองอากาศรูปแบบหัวกระสุนนี้ช่วยเพิ่มการไหลของอนุภาคผ่านเมมเบรนส่งผลให้ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทและลดการเกิดฟลาวลิ่งในเมมเบรนได้ การประยุกต์ใช้ระบบ gas-liquid two-phase flow ด้วยค่าความเค้นเฉือนที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกรองด้วยเมมเบรน (Ducom *et al.*, 2002)

ชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มความเร็วของกาซเป็นการเพิ่มความเค้นเฉือนส่งผลต่อการเพิ่มค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท ลดการเกิดคอนเซนเทรชัน โพลาริเซชัน และเพิ่มการเคลื่อนที่ของอนุภาคที่ผิวหน้าเมมเบรน ส่งผลต่อการเพิ่มค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท นอกจากนี้การเพิ่มประสิทธิภาพการกรองด้วยระบบ gas-liquid two-phase flow ยังอาศัยกลไกสำคัญคือรูปแบบการไหลของสารและลักษณะของฟองอากาศเพื่อลดการยึดเกาะของอนุภาคที่ผิวหน้าเมมเบรน (Smith and Cui, 2004) ดังนั้นจึงมีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของความเค้นเฉือนในระบบ gas-liquid two-phase flow อาทิ ความเร็ว (Gaucher *et al.*, 2002c) ความหนืด (Pritchard *et al.*, 1995) ความหนาแน่น (Gaucher *et al.*, 2002b) และความดัน (Gaucher *et al.*, 2002a) เป็นต้น Pospisil และคณะ (2002) รายงานเกี่ยวกับผลของความเร็วยในระบบ gas-liquid two-phase flow ต่อค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท พบว่า ความเร็วของของเหลวเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของอนุภาคผ่านผนังเมมเบรน และการใช้ความเร็วในระบบ gas-liquid two-phase flow ช่วงที่ฟองอากาศมีลักษณะเป็นหัวกระสุนสามารถเพิ่มค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทได้

ในการศึกษาผลของความเค้นเฉือนต่อกิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยกระบวนการอัลตราฟิльтраชัน ซึ่งเป็นเพปไทด์ที่มีขนาดเล็ก (MWCO ขนาด 500-800 กิโลดาลตัน) (Charoenphun *et al.*, 2013b) Table 2 แสดงผลของความเค้นเฉือนต่อค่าการส่งผ่านโปรตีนและกิจกรรมการของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยเมมเบรนที่มี MWCO ขนาด 1 กิโลดาลตัน ภายใต้สภาวะการกรองแบบวนกลับ พบว่า เพปไทด์ในเฟอมีเอทให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงกว่าในรีเทนเทท โดยเพปไทด์กลุ่มเป้าหมายถูกกรองผ่านเมมเบรนได้มากขึ้น การใช้ความเค้นเฉือนที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อค่าการส่งผ่านโปรตีน โดยค่าการส่งผ่านโปรตีนสูงที่สุดประมาณร้อยละ 95 ที่ค่าความเค้นเฉือน 0.039 รองลงมาคือ ร้อยละ 93 (ความเค้นเฉือน 0.030) ร้อยละ 90 (ความเค้นเฉือน 0.026) และ ร้อยละ 86 (ความเค้นเฉือน 0.020) ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าระบบ gas-liquid two-phase flow สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกรองโดยเพิ่มค่าการส่งผ่านโปรตีนและการเพิ่มกิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE

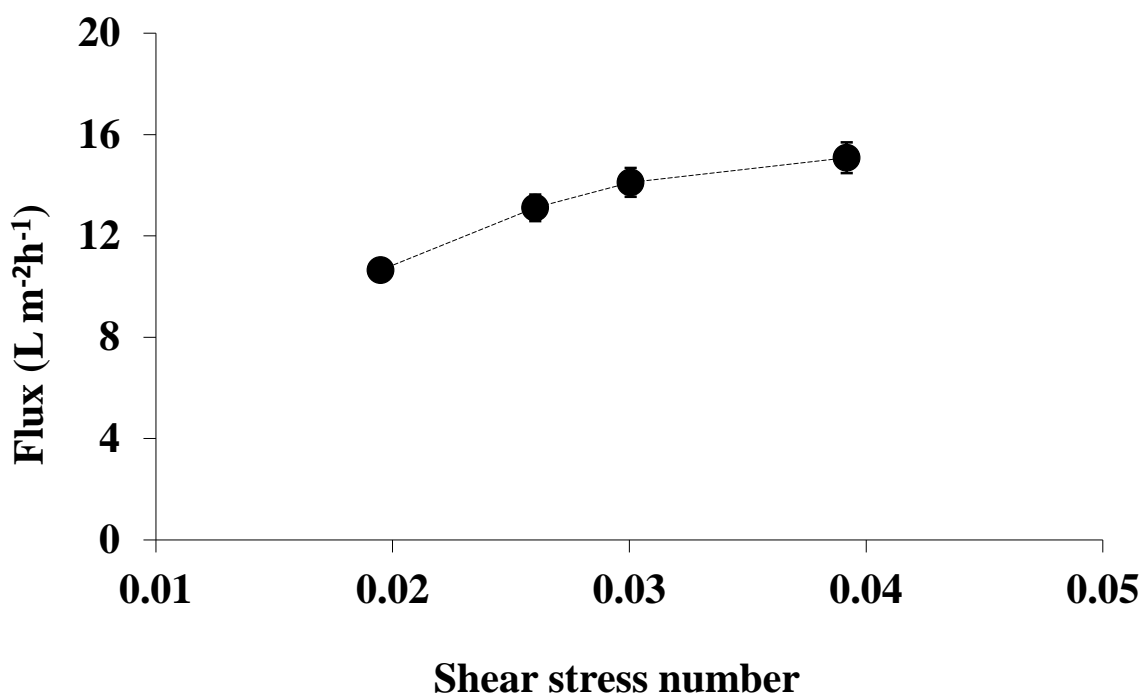


Figure 6 Effect of shear stress number (N'_S) on permeate flux during UF (MWCO 1 kDa) of tilapia protein hydrolysate in total recycle mode (TMP = 2 bar, CFV = 2 m s⁻¹ and temperature = 50 °C)

Table 2 Effect of Shear stress number (N'_S) on protein transmission and ACE inhibitory activity of permeate and retentate obtained during UF (MWCO 1 kDa) of tilapia protein hydrolysate in total recycle mode

Shear stress number (N'_S)	0.020	0.026	0.030	0.039
T_p (%)	85.84±0.01 ^a	89.61±0.03 ^b	92.50±0.03 ^c	95.00±0.02 ^d
ACE assay in retentate	66.2±0.40 ^d	64.4±0.30 ^c	62.2±0.30 ^b	58.1±0.20 ^a
ACE assay in permeate	82.2±0.40 ^a	85.4±0.20 ^b	88.2±0.10 ^c	91.4±0.40 ^d

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.

ผลของความเค้นเฉือนต่อการเกิดเมมเบรนฟาวลิ่งระหว่างการกรองด้วยอัลตราฟิลเตรชันของโปรตีนจากเนื้อปลาที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แสดงใน Figure 7 พบว่า ความต้านทานรวม (R_t) ความต้านทานฟาวลิ่งผันกลับได้ (R_{fr}) ความต้านทานฟาวลิ่งภายนอกแบบผันกลับไม่ได้ (R_{if-ex}) ของเมมเบรนมีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) เมื่อเพิ่มความเค้นเฉือน ซึ่งให้เห็นว่าความเค้นเฉือนที่ระดับสูงและระดับต่ำให้ค่าความต้านทานรวมที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ฟาวลิ่งส่วนใหญ่เป็นฟาวลิ่งผันกลับได้ และฟาวลิ่งที่ผันกลับไม่ได้เกิดขึ้นบ้างเล็กน้อยเนื่องจากโปรตีนบางส่วนดูดซับที่บริเวณผิวหน้าเมมเบรนและในรูพรุนของเมมเบรนในระยะเวลาไม่นาน (Vadi and Rizvi, 2001)

Yan-Jun และคณะ (2000) อธิบายกลไกการเกิดเมมเบรนฟาวลิ่งเกี่ยวข้องกับพลศาสตร์ของเมมเบรนที่ควบคุมพฤติกรรมกการไหลของอนุภาคในเมมเบรน ในระบบอัลตราฟิลเตรชันเปรียบเทียบการเกิดฟาวลิ่งที่ผิวหน้าของเมมเบรนและการเกิดฟาวลิ่งในรูพรุนเมมเบรน โดยทั่วไปอนุภาคโปรตีนที่อุดตันในรูพรุนของเมมเบรนส่วนใหญ่เป็นอนุภาคขนาดเล็ก ดังนั้นการใช้ระบบ gas-liquid two-phase flow ช่วยลดความต้านทานฟาวลิ่งภายในแบบผันกลับไม่ได้จากเพปไทด์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก เนื่องจากผลของแรงเฉือนช่วยกำจัดเพปไทด์ออกจากรูพรุนเมมเบรน การกรองแบบความเร็วขนานไปกับผิวหน้าของเมมเบรนด้วยแรงเฉือนที่เหมาะสมจะช่วยขจัดอนุภาคที่อุดตันจากเมมเบรน (She *et al.*, 2009) ในการศึกษาครั้งนี้การเพิ่มความเค้นเฉือนช่วยลดการเกิดฟาวลิ่งของเมมเบรน และการนำระบบ gas-liquid two-phase flow มาประยุกต์ใช้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกรองได้เป็นอย่างดี

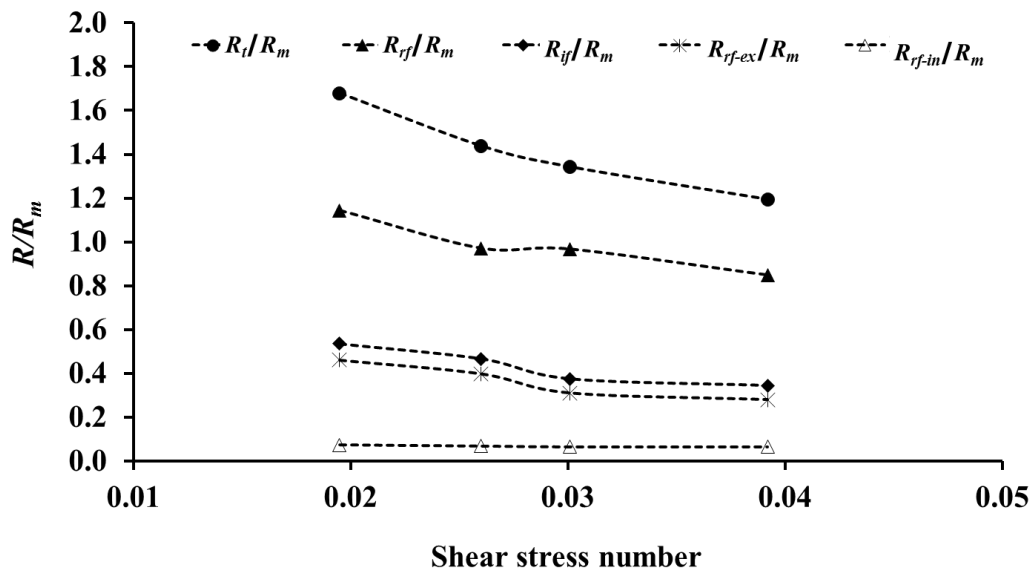


Figure 7 The profile of normalized resistance (R/R_m) tilapia protein hydrolysate in total recycle mode at CFV of 2 m s^{-1} and TMP of 2 bar as varying shear stress number (N'_S)

ในครั้งนี้นำผู้วิจัยได้การศึกษาผลของความเค้นเฉือนต่อค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท ค่ารีคัพเวอรี (recovery) การแยกเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE และการเกิดฟาวลิงภายใต้สภาวะการกรองแบบกะ ด้วยอัลตราฟิลเตรชันที่มี MWCO ขนาด 1 กิโลดาลตัน ที่ความเร็วตามขวาง 2 เมตรต่อวินาที ความดันขั้ว 2 บาร์ และค่าความเค้นเฉือน 0.039 Figure 8 แสดงผลของเวลาในการกรองต่อค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท และร้อยละของค่ารีคัพเวอรีในการแยกเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE พบว่า ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง 30 นาทีแรกของการกรอง จากนั้นเมื่อเวลาผ่านไปค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทมีแนวโน้มคงที่จนกระทั่งสิ้นสุดการกรอง 360 นาที ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทที่วัดได้เท่ากับ 6.7 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง ได้ค่าร้อยละรีคัพเวอรีเท่ากับ 78 คำนวณค่าฟลักซ์เฉลี่ยตลอดการกรองเท่ากับ 10 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง ค่ารีคัพเวอรีมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงแปรผันตรงกับเวลาในการกรอง ข้อจำกัดของกระบวนการกรองคือการลดลงของค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท เนื่องจากการเกิดคอนเซนเตรชัน โพล่าไรเซชัน เช่น การสะสมของอนุภาคตัวถูกละลายที่ผิวหน้าของเมมเบรนซึ่งส่งผลต่อการต้านการไหลของตัวทำละลายขณะที่ถูกกรองผ่านเมมเบรน (Karthik *et al.*, 2002)

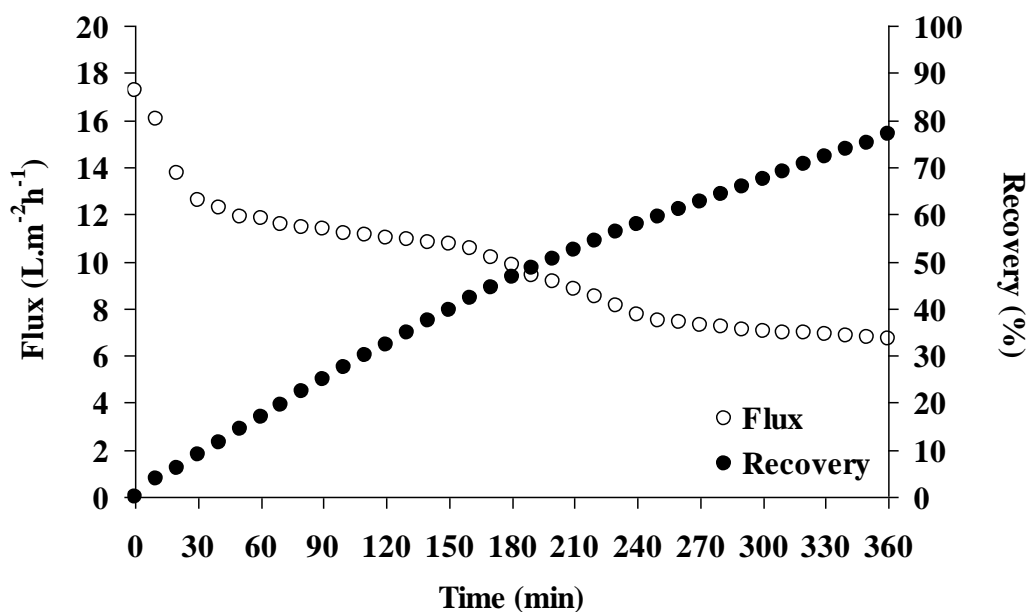


Figure 8 Permeate flux and % recovery during UF (MWCO 1kDa) of tilapia protein hydrolysate in batch mode (TMP = 2 bar, CFV = 2 m s⁻¹, temperature = 50 °C, $N'_S = 0.039$)

ค่าการส่งผ่านโปรตีนในเพอมีเอทและรีเทนเททผ่านเมมเบรนระหว่างการกรองด้วยอัลตราฟิลเตรชันของโปรตีนจากเนื้อปลานิลที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ภายใต้สภาวะการกรองแบบกะ พบว่าค่าการส่งผ่านโปรตีนในมีแนวโน้มลดลงอย่างช้าๆ เมื่อเวลาในการกรองเพิ่มขึ้น (Figure 9) แสดงให้เห็นว่าค่าการส่งผ่านโปรตีนมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทและระยะเวลาในการกรอง ค่าการส่งผ่านโปรตีนที่ค่าความคั้นเงื่อนไข 0.039 ลดลงจากร้อยละ 93 ถึง ร้อยละ 81 ที่เวลาในการกรอง 360 นาที นอกจากนี้การลดลงของค่าการส่งผ่านโปรตีนทำให้ค่ากิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ในเพอมีเอท และรีเทนเททลดลงเล็กน้อยเมื่อเวลาในการกรองเพิ่มขึ้น ซึ่งค่ากิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ในเพอมีเอทมีค่าสูงกว่าในรีเทนเททเสมอ (Figure 10) เนื่องจากเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE เป็นเพปไทด์ขนาดเล็ก (MWCO ขนาดน้อยกว่า 1 กิโลดาลตัน)

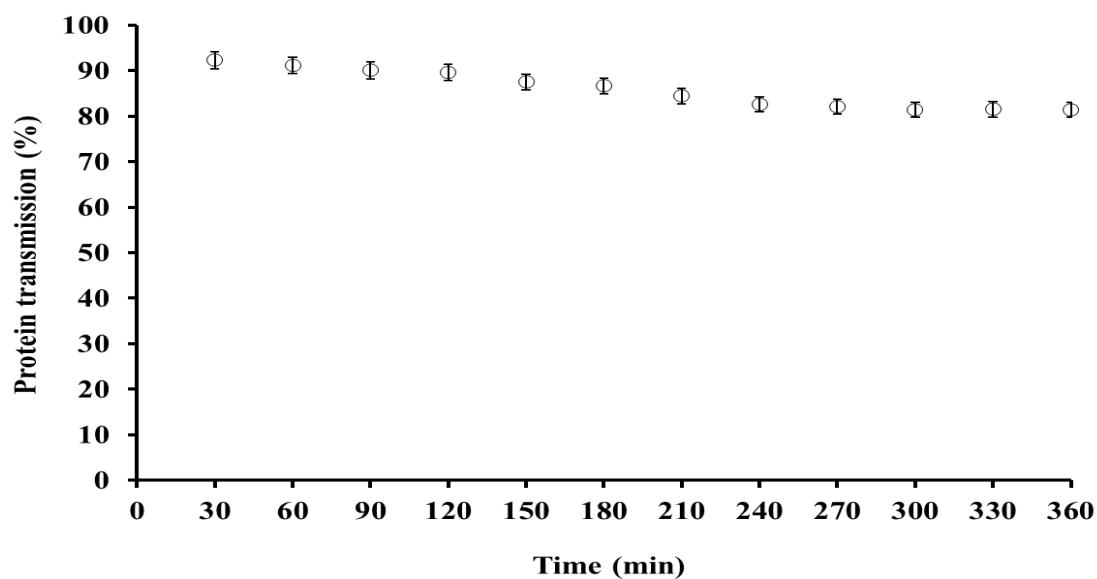


Figure 9 Protein transmission (T_p) of permeate and retentate obtained during UF (MWCO 1kDa) of tilapia protein hydrolysate in batch mode (TMP = 2 bar, CFV = 2 m s⁻¹, temperature = 50 °C and $N'_S = 0.039$)

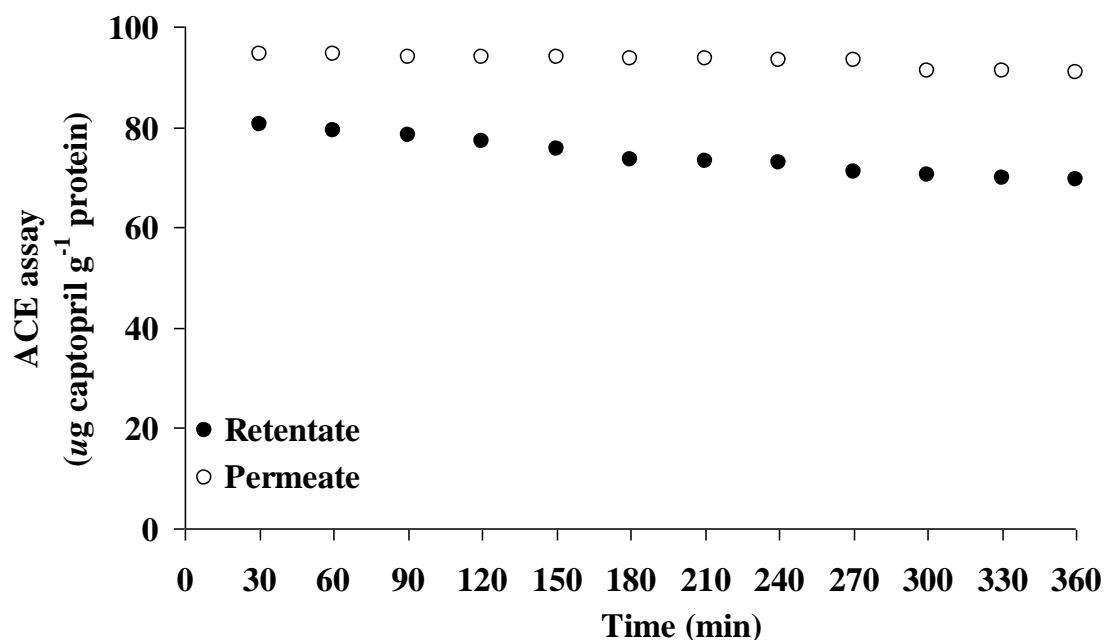


Figure 10 ACE activity of permeate and retentate obtained during UF (MWCO 1 kDa) of tilapia protein hydrolysate in batch mode (TMP = 2 bar, CFV = 2 m s⁻¹, temperature = 50 °C and $N'_S = 0.039$)

2. การผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลาไหลด้วยระบบ CBEMR

2.1 ผลของเวลาในการย่อย (pre-hydrolysis) โปรตีนจากเนื้อปลาไหลต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ด้วยระบบ CBEMR

การย่อยสารละลายโปรตีนจากเนื้อปลาไหลด้วยเอนไซม์โปรตีเอสบางส่วนก่อนนำเข้าสู่กระบวนการกรอง เพื่อลดการเกิดฟาวลิงในระบบ CBEMR เนื่องจากการย่อยโปรตีนบางส่วนจะช่วยลดความหนืดของสารละลายโปรตีนจากเนื้อปลาไหลส่งผลดีต่อการกรองในขั้นตอนต่อไป นอกจากนี้การย่อยสารละลายโปรตีนจากเนื้อปลาไหลด้วยเอนไซม์โปรตีเอสบางส่วนก่อนนำเข้าสู่กระบวนการกรองช่วยเพิ่มค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท ค่าคอนเวอร์ชัน และ ค่าผลิตภาพ ในระบบปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์ (Rios *et al.*, 2004) การศึกษาเวลาที่เหมาะสมของการย่อยสารละลายโปรตีนจากเนื้อปลาไหลด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 2.4L ก่อนนำเข้าสู่ระบบปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์ เพื่อเพิ่มการละลายของโปรตีนและลดการเกิดฟาวลิง Figure 11 แสดงผลของเวลาในการย่อยสารละลายโปรตีนจากเนื้อปลาไหลด้วยเอนไซม์โปรตีเอสบางส่วนก่อนนำเข้าสู่กระบวนการกรองต่อระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis, DH) และความหนืด พบว่า ระดับการย่อยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 60 นาทีแรกของการย่อย จากนั้นค่อยๆ เพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ร้อยละการย่อยประมาณ 35 ให้ค่ากิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูง (Charoenphun *et al.*, 2013b)

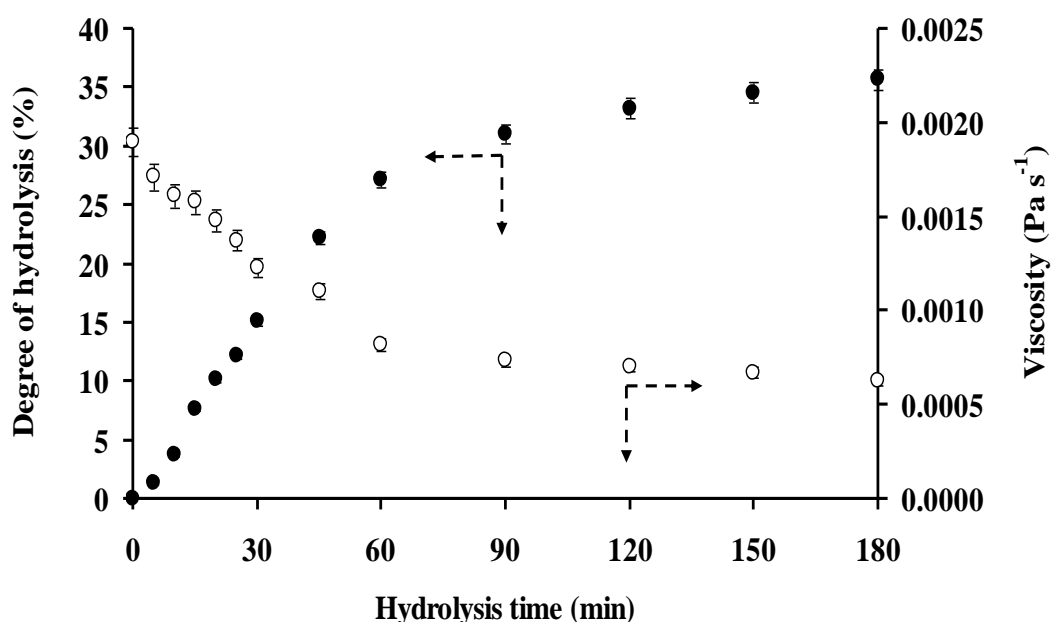


Figure 11 Effect of pre-hydrolysis time on degree of hydrolysis (DH) and viscosity at pH 8.0 and 50 °C ($S_0 = 1\%$ w/v and $E_0 = 20$ unit g^{-1} protein) (● and ○; degree of hydrolysis and viscosity, respectively)

ดังนั้นจึงเลือกเวลาการย่อยในช่วง 0 ถึง 180 นาทีในการศึกษาครั้งนี้ เมื่อเวลาการย่อยเพิ่มขึ้น ความหนืดของสารละลายมีแนวโน้มลดลง เนื่องจากเมื่อเวลาการย่อยเพิ่มขึ้นอนุภาคขนาดใหญ่มีปริมาณลดลงส่งผลให้ความหนืดของสารละลายลดลง สารละลายที่มีความหนืดสูงจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของอัลตราฟิลเตรชันเพราะเป็นสาเหตุให้เกิดฟาวลิ่ง ดังนั้นการลดความหนืดของสารละลายก่อนกระบวนการกรองด้วยเมมเบรนช่วยลดการเกิดฟาวลิ่งได้ (Jeon and Kim, 2000)

Figure 12 แสดงผลของเวลาในการย่อยต่อค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท และร้อยละรีคัฟเวอรีในระบบ CBEMR พบว่า ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทของสารละลายโปรตีนจากเนื้อปลาชนิดที่ไม่ผ่านการย่อยก่อนเข้าสู่ระบบ CBEMR ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 60 นาทีแรกของการกรองและค่อยๆ ลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดการกรองที่เวลา 360 นาที ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทเท่ากับ 1.2 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง (ค่ารีคัฟเวอรีร้อยละ 12)

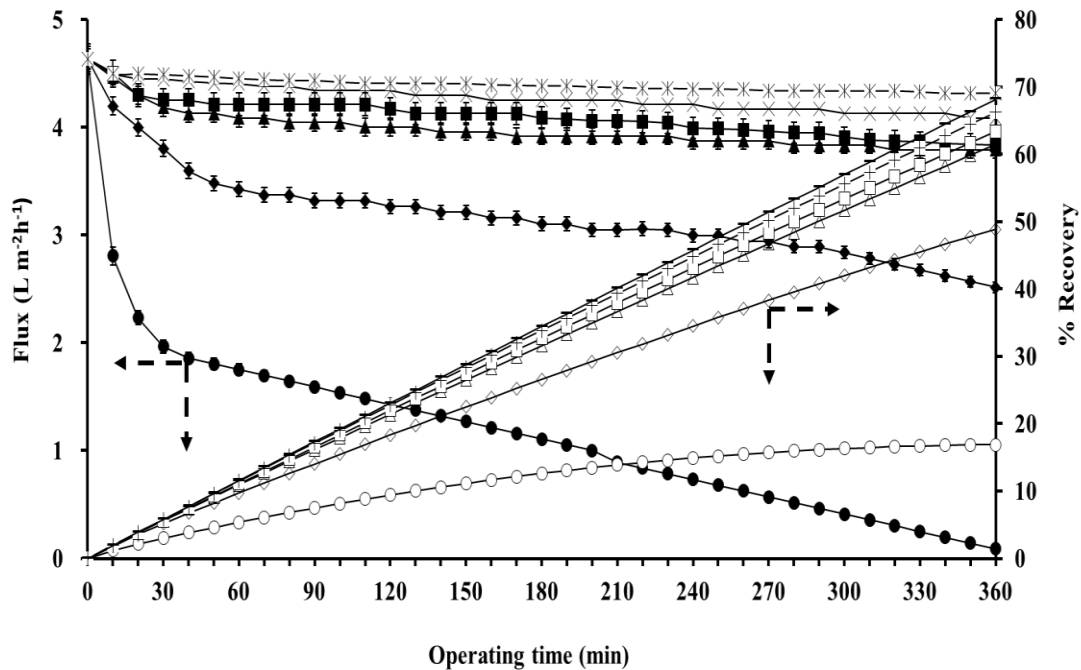


Figure 12 Effect of pre-hydrolysis time on permeate flux and % recovery during CBEMR system ($S_0 = 1\%$ w/v and $E_0 = 20$ unit g^{-1} protein, TMP = 1 bar, CFV = 1 m s^{-1} , temperature = $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, and initial volume = 550 mL) (●, ◆, ▲, ■, × and *; permeate flux of pre-hydrolysis time = 0, 60, 90, 120, 150 and 180 min and ○, ◇, △, □, + and -; % recovery of pre-hydrolysis time = 0, 60, 90, 120, 150 and 180 min, respectively)

ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทเฉลี่ยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการย่อยก่อนการกรองเพิ่มขึ้น ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทเฉลี่ยที่เวลาในการย่อยก่อนการกรองที่ 60 90 120 150 และ 180 นาที เป็น 3.2 4.0 4.1 4.3 และ 4.4 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทของการย่อย

ก่อนการกรองที่เวลา 180 นาที มีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยในช่วง 30 นาทีแรกของการกรอง จากนั้นค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทมีแนวโน้มคงที่ เมื่อสิ้นสุดการกรองค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทมีค่าเท่ากับ 4.3 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง ที่เวลา 360 นาที (คาร์คัพเวอร์ร้อยละ 68)

การเปลี่ยนแปลงค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทกับเวลาในการกรองสามารถอธิบายผลของการเกิดฟาวลิงได้ (Figure 13) ตัวอย่างที่ถูกย่อยก่อนเข้าสู่ระบบกรองด้วยเวลาที่แตกต่างกัน ส่งผลให้ค่าฟาวลิงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่ผ่านการย่อยก่อนกรอง ซึ่งสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท พบว่าความต้านทานฟาวลิงผันกลับได้ ความต้านทานฟาวลิงภายนอกแบบผันกลับไม่ได้ และความต้านทานฟาวลิงภายในแบบผันกลับไม่ได้ของเมมเบรนลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเวลาในการย่อยก่อนกรองเพิ่มขึ้น การวิเคราะห์ความต้านทานรวม พบว่า ความต้านทานรวมระหว่างระยะเวลาการย่อยที่นานและระยะเวลาการย่อยที่สั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าความต้านทานฟาวลิงผันกลับไม่ได้เกิดขึ้นน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับค่าความต้านทานรวม และค่าความต้านทานฟาวลิงผันกลับได้ ดังนั้นฟาวลิงส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นเป็นฟาวลิงที่ผันกลับได้

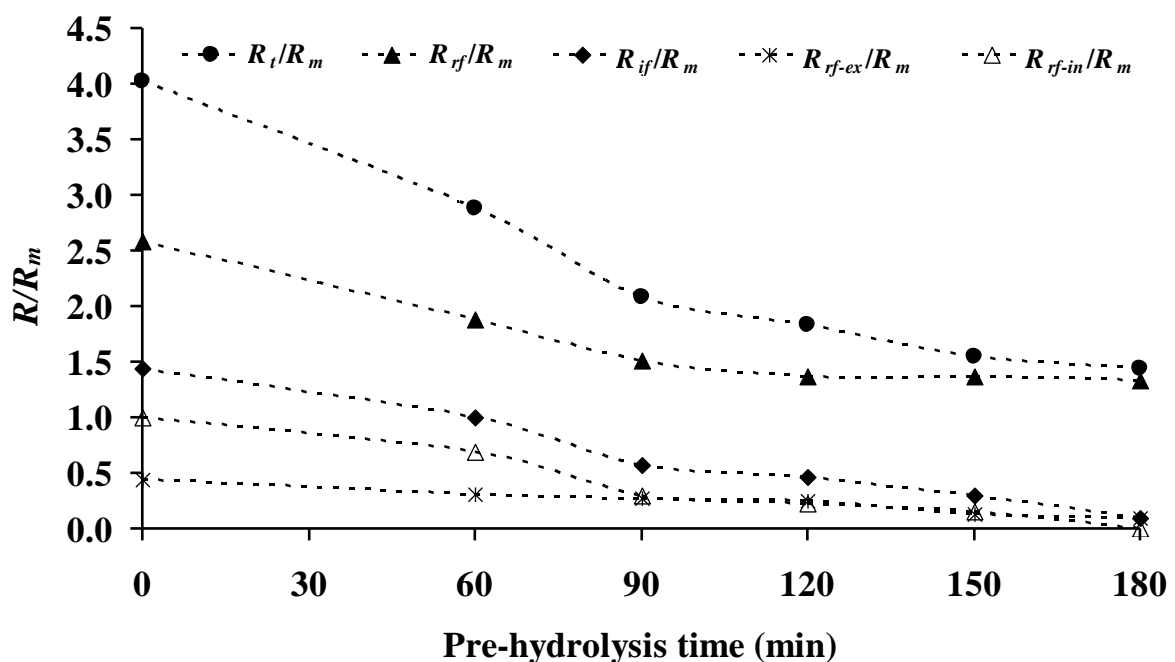


Figure 13 The profile of normalized resistance (R/R_m) tilapia protein hydrolysate in CBEMR at CFV of 1 m s^{-1} and TMP of 1 bar as varying pre-hydrolysis time

การปรากฏของอนุภาคขนาดใหญ่ในสารละลายโปรตีนจากเนื้อปลานิลเป็นสาเหตุจากแรงที่เกิดจากการกีดขวางเนื่องจากขนาด (steric hindrance interaction) ที่ขัดขวางการส่งอนุภาคขนาดเล็กผ่าน

เมมเบรน เนื่องจากอนุภาคขนาดใหญ่เข้าไปเกาะที่รูพรุนของเมมเบรน (Yan-jun *et al.*, 2000) ในการศึกษาครั้งนี้การย่อยสารละลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ก่อนการกรอง ช่วยลดการเกิดฟาวลิ่งเนื่องจากโปรตีนขนาดใหญ่ถูกลดให้เป็นอนุภาคขนาดเล็ก สอดคล้องกับรายงานผลการทดลองที่นักวิจัยหลายท่าน รายงานไว้เกี่ยวกับการลดลงของเมมเบรนฟาวลิ่งและคอนเซนเทรชัน โพลาริเซชัน (Misun *et al.*, 2008) Wang และคณะ (2013) รายงานผลการศึกษาผลของเวลาในการย่อยก่อนกรองของโปรตีนข้าวหักด้วยเอนไซม์โปรตีเอส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีก่อนนำเข้าสู่ระบบปฏิบัติการเมมเบรนเอนไซม์ ลดการเกิดเมมเบรนฟาวลิ่งได้

การติดตามการลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์ระหว่างการย่อยด้วยเวลาแตกต่างกัน (Figure 14) ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า การใช้เวลานานในการย่อยส่งผลต่อการลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์ การใช้เวลาในการย่อยนาน 180 นาทีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสลดลงมากที่สุด การลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์เกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย อาทิ ค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ ผลของแรงเฉือนและการยืดเกาะที่ผนังเมมเบรน (Rios *et al.*, 2004) ผลของระยะเวลาในการย่อยและอุณหภูมิอาจเป็นสาเหตุให้เกิดการลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์ในครั้งนี้ สอดคล้องกับการรายงานของ Mannheim และ Cheryan (1990) ศึกษาผลของเวลาในการย่อยโปรตีนนมด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 50 องศาเซลเซียส ในถังปฏิบัติการเมมเบรนเอนไซม์ ผลการทดลองที่ได้พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาเลสลดลง เมื่อสิ้นสุดการกรองที่เวลา 360 นาที อยู่ที่ร้อยละ 57 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ ร้อยละ 43 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ นอกจากนี้การลดลงของกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ยังอาจเกิดจากตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกิดจากผลิตภัณฑ์ในกระบวนการย่อย ตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ก่อนเข้าสู่ระบบ CBEMR ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์มีแนวโน้มลดลงอย่างช้าๆ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ก่อนเข้าสู่ระบบ CBEMR โดยผลิตภัณฑ์ของตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ก่อนเข้าสู่ระบบ CBEMR เป็นอนุภาคขนาดเล็กถูกกรองออกเมื่อเข้าสู่ระบบ CBEMR แต่ถ้าเป็นตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ก่อนเข้าสู่ระบบ CBEMR ผลิตภัณฑ์จะถูกสะสมอยู่เป็นระยะเวลาหนึ่งก่อนที่จะถูกกรอง ในการศึกษาครั้งนี้เอนไซม์อัลคาเลส 2.4L เป็นเอนไซม์ในกลุ่มซีรีนโปรตีเอสซึ่งอาจถูกยับยั้งการทำงานด้วยตัวยับยั้งซีรีนโปรตีเอส (serine proteinase inhibitors; serpins) ในผลิตภัณฑ์ เซอร์ปินเป็นกลุ่มของโปรตีนที่มีโครงสร้างที่คล้ายกันซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มซีรีนโปรตีเอส (Silverman *et al.*, 2010)

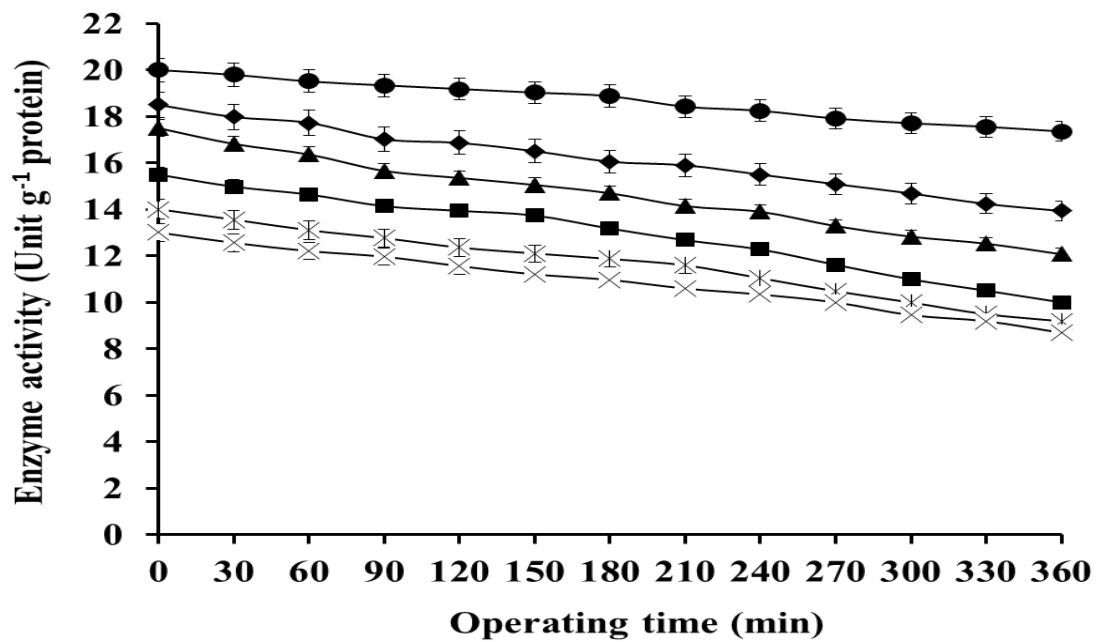


Figure 14 Effect of pre-hydrolysis time on enzyme activity during CBEMR system ($S_0 = 1\%$ w/v and $E_0 = 20\text{ unit g}^{-1}\text{protein}$, TMP = 1 bar, CFV = 1 m s^{-1} , temperature = $50\text{ }^\circ\text{C}$, and initial volume = 550 mL) (●, ◆, ▲, ■, * and × ; enzyme activity of pre-hydrolysis time = 0, 60, 90, 120, 150 and 180 min, respectively)

ผลของเวลาในการย่อยสารละลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ก่อนเข้าสู่ระบบ CBEMR ต่อค่าเฉลี่ยการส่งผ่านโปรตีนและกิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ของเพอมีเอทแสดงข้อมูลใน Table 3 ค่าการส่งผ่านโปรตีนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการย่อยสารละลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ก่อนเข้าสู่ระบบ CBEMR เพิ่มขึ้น ตัวอย่างที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ก่อนเข้าสู่ระบบ CBEMR ให้ค่าการส่งผ่านโปรตีนต่ำที่สุดประมาณร้อยละ 40 เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ผ่านการย่อยสารละลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ก่อนเข้าสู่ระบบ CBEMR ที่เวลาการย่อย 180 นาที ให้ค่าการส่งผ่านโปรตีนสูงที่สุดที่ร้อยละ 90 รองลงมาคือที่เวลาการย่อย 150 นาที ค่าการส่งผ่านโปรตีนอยู่ที่ร้อยละ 88 ที่เวลาการย่อย 120 นาที ค่าการส่งผ่านโปรตีนอยู่ที่ร้อยละ 86 ที่เวลาการย่อย 90 นาที ค่าการส่งผ่านโปรตีนอยู่ที่ร้อยละ 83 และ เวลาการย่อย 60 นาที ค่าการส่งผ่านโปรตีนอยู่ที่ร้อยละ 70 ตามลำดับ เวลาในการย่อยที่แตกต่างกันทำให้ได้เพปไทด์ที่มีขนาดแตกต่างกัน ผลผลิตส่วนใหญ่คำนวณจากปริมาณเพปไทด์ขนาดเล็กในส่วนของเพอมีเอทที่ผ่านเมมเบรนออกมา การใช้เอนไซม์ช่วยย่อยบางส่วนก่อนกรองจะทำให้การส่งผ่านโปรตีนเกิดได้ดีขึ้น เนื่องจากเอนไซม์เข้าไปตัดพันธะของโปรตีนสายยาวทำให้ได้เพปไทด์ที่มีขนาดเล็กลงสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงของระดับการย่อยใน Figure 11

Table 3 Effect of pre-hydrolysis time on the average of T_p and bioactive peptide activities of permeate during CBEMR system ($S_0 = 1\%$ w/v, $E_0 = 20$ unit g^{-1} protein, TMP = 1 bar, CFV = 1 $m\ s^{-1}$, temperature = 50 $^{\circ}C$, and initial volume = 550 mL)

Pre-hydrolysis time (min)	T_p (%)	ACE activity
0	39.45±0.45 ^a	45.0±0.50 ^a
60	69.50±0.50 ^b	70.3±0.70 ^b
90	83.34±0.32 ^c	86.5±0.76 ^c
120	85.84±0.16 ^d	83.0 ±0.40 ^d
150	87.80 ±0.20 ^e	80.8 ±0.20 ^e
180	89.65 ±0.35 ^f	78.6 ±0.40 ^f

ns, a, b, c, d, e and f mean with same column sharing same letter were not significantly ($p < 0.05$) different.

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

ผลของเวลาในการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ก่อนเข้าสู่ระบบ CBEMR ต่อกิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE พบว่า ที่เวลาในการย่อย 90 นาที ให้ค่ากิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงที่สุด ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท และกิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE เวลาในการย่อยที่ 90 นาที ถูกเลือกเพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ก่อนเข้าสู่ระบบ CBEMR มีประโยชน์ต่อกระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์ (Wang *et al.*, 2013) เนื่องจากการย่อยตัวอย่างก่อนจะช่วยลดความหนืดทำให้ง่ายต่อการกรอง (Darnoko *et al.*, 1989; Rios *et al.*, 2004) อย่างไรก็ตามสิ่งที่ต้องระวังคือการเลือกระยะเวลาการย่อยที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์คุณภาพ

2.2 ผลของความดันขั้วต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื่อปลานิลด้วยระบบ CBCMR

ความดันขั้วเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทและการเกิดฟาวลิงระหว่างการแยกสารด้วยระบบปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์ (Hua *et al.*, 2007) ผลของความดันขั้วต่อค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทและค่ารีคัฟเวอรีของการแยกสลายโปรตีนจากเนื่อปลานิล ที่มีการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 90 นาที และแยกเพปไทด์ด้วยระบบ CBCMR (Figure 15) ค่าเฉลี่ยฟลักซ์ของเพอมีเอท และค่ารีคัฟเวอรีที่ความดันขั้ว 0.5 1.0 1.3 และ 1.6 บาร์ เป็น 3.3 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง (ร้อยละ

29) 4.0 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง (ร้อยละ 34) 4.2 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง (ร้อยละ 36) และ 3.7 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง (ร้อยละ 33) ตามลำดับ สังเกตการเปลี่ยนแปลงค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง 60 นาทีแรกของการกรอง จากนั้นค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทลดลงอย่างช้าๆ จนสิ้นสุดการกรองที่เวลา 360 นาที การเลือกใช้ความดันขับที่เหมาะสมส่งผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการกรอง เมื่อพิจารณาจากค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทและคาร์คิฟเวอรีของการศึกษาครั้งนี้ ความดันขับที่เหมาะสมในการกรองคือ 1.3 บาร์ แต่ต้องพิจารณาค่าการเกิดฟาวลิงและกิจกรรมของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ร่วมด้วย

ความดันขับเป็นปัจจัยเริ่มต้นในการวิเคราะห์การเกิดฟาวลิงผ่านค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท ดังนั้นค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทที่คงที่บ่งบอกถึงการเกิดฟาวลิงต่ำ ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ที่ความดันขับต่ำ (0.5 บาร์) ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยมากตลอดการกรอง เมื่อเปรียบเทียบกับ การกรองที่ความดันขับสูง (1.6 บาร์) โดยทั่วไปการเคลื่อนที่ของของเหลวผ่านเมมเบรนอาศัยความดันขับ การเพิ่มความดันขับที่สูงเกินไปเป็นสาเหตุให้เกิดคอนเซนเทรชัน โพลาริเซชัน ทำให้ในช่วงนี้ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทจึงไม่ขึ้นกับความดัน แต่กลับถูกควบคุมโดยการถ่ายเทมวล (mass transfer controlled) แต่ละช่วงความต่างของความดันขับส่งผลต่อค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท โดยช่วงสมดุลของความดันขับที่เหมาะสมการเพิ่มค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทจะแปรผันตรงกับความดันขับ แต่เมื่อผ่านช่วงสมดุลของความดันขับ ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทแม้จะเพิ่มความดันขับสูงขึ้นก็ตาม

ผลจากการทดลองการใช้ความดันขับที่สูงถึง 1.6 บาร์ ทำให้ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทลดลง เมมเบรนฟาวลิงเกิดขึ้นสูง การใช้ความดันขับสูงเกินจุดสมดุลมีโอกาสเกิดการจับตัวกันของอนุภาคที่ผิวเมมเบรนมากขึ้น (Cheryan, 1998) เนื่องจากความดันสูงเกินไปทำให้เกิดแรงส่งเสริมให้อนุภาคยึดเกาะกับผิวเมมเบรนได้มากขึ้น โดยเฉพาะในสารที่มีโมเลกุลเล็กสามารถเข้าไปแทรกและยึดกับโครงสร้างรูพรุนของเมมเบรนได้ ส่งผลให้ขนาดรูพรุนของเมมเบรนมีขนาดเล็กลง ความต้านทานการไหลเพิ่มขึ้น ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทลดลง (Viadero, 1997) การใช้ความดันขับในช่วงที่เหมาะสมช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกรอง สอดคล้องกับรายงานของ Hua *et al.* (2007) ศึกษาผลของความดันขับจาก 0.5 บาร์ ถึง 3 บาร์ ต่อค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท พบว่า ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทแปรผันตรงกับความดันขับ การใช้ความดันขับต่ำทำให้ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทสูงกว่าที่ความดันสูง เมื่อเพิ่มความดันขับเกิน 2 บาร์ ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทมีแนวโน้มลดลง การเพิ่มความดันขับในระดับที่เหมาะสมทำให้เกิดการกระจายตัวของอนุภาคได้ดี (Elmaleh and Ghaffor, 1996)

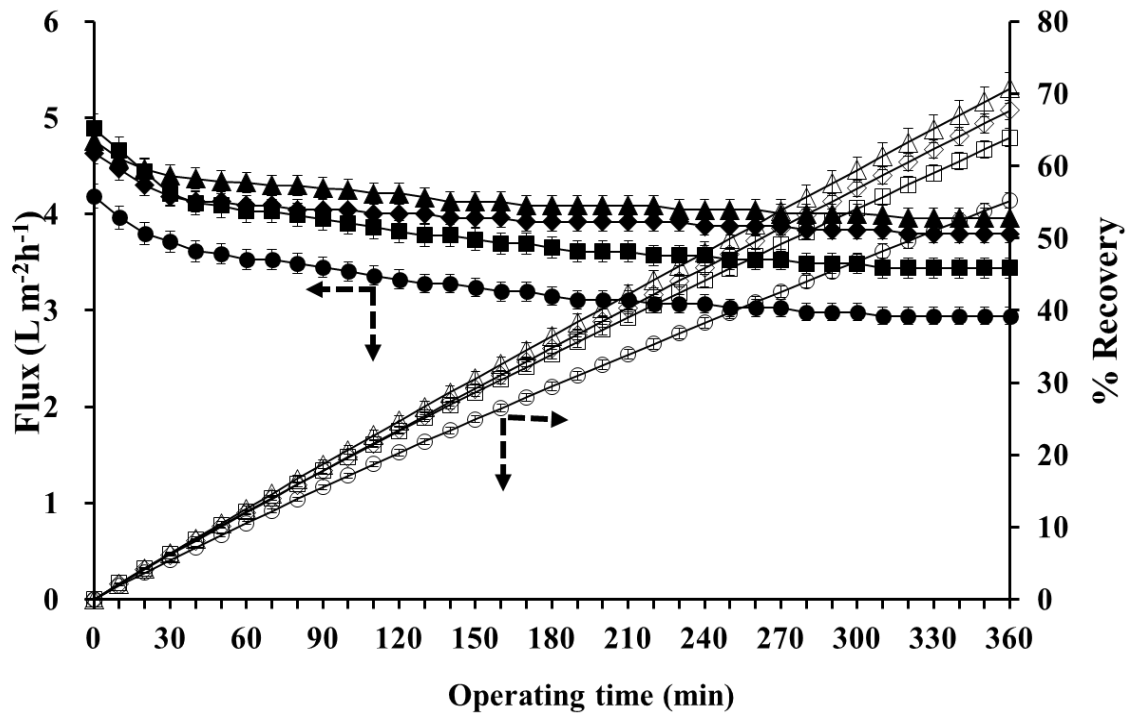


Figure 15 Effect of TMP on permeate flux and % recovery during CBEMR system ($S_0 = 1$ % w/v and $E_0 = 20$ unit g^{-1} protein, pre-hydrolysis time = 90 min, CFV = 1 m s^{-1} , temperature = 50 °C, and initial volume = 550 mL) (●, ◆, ▲ and ■; permeate flux of TMP = 0.5, 1, 1.3, and 1.6 bar and ○, ◇, △ and □; % recovery of TMP = 0.5, 1, 1.3, and 1.6 bar, respectively)

Table 4 แสดงผลของความดันขั้วต่อการเกิดฟาวลิง พบว่า ค่าความต้านทานรวม และค่าความต้านทานฟาวลิงผันกลับได้ของเมมเบรนเพิ่มขึ้นแปรผันตรงกับการเพิ่มของค่าความดันขั้ว การเพิ่มความดันขั้วเป็นสาเหตุให้เกิดฟาวลิงทั้งที่ผันกลับได้และผันกลับไม่ได้ การเกิดฟาวลิงแบบผันกลับไม่ได้มีแนวโน้มลดลงเมื่อใช้ความดันขั้วสูง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะและองค์ประกอบของตัวอย่างด้วย เนื่องจากอนุภาคของสารละลายโปรตีนจากเนื้อปลานิลในระบบ CBEMR ยึดเกาะที่ผิวหน้าเมมเบรนถูกกำจัดออกไป ประสิทธิภาพการกรองสารลดลงทำให้เกิดคอนเซนเตรชัน โพลาริเซชันเพิ่มขึ้น และนำไปสู่การเกิดเมมเบรนฟาวลิงในที่สุด ทำให้อนุภาคของสารเกิดการสะสมที่พื้นผิวของเมมเบรน และในระบบอัลตราฟิลเตรชันจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท (Marshall *et al.*, 1993; Yan-jun *et al.*, 2000; Das *et al.*, 2009; She *et al.*, 2009)

Table 4 Membrane fouling of UF membrane in CBEMR at CFV of 1 m s^{-1} as varying TMP

TMP (bar)	R_f/R_m	R_{rf}/R_m	R_{if}/R_m	R_{if-ex}/R_m	R_{if-in}/R_m
0.5	0.96	1.3	0.8	0.4	0.5
1.0	1.39	0.8	0.6	0.3	0.3
1.3	1.41	1.1	0.3	0.2	0.1
1.6	1.43	1.2	0.2	0.0	0.0

การเปลี่ยนแปลงค่าความดันขับส่งผลต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อัลคาเลส 2.4L (Figure 16) Lopes และคณะ (2009) อธิบายเกี่ยวกับผลของการเพิ่มความดันขับต่อการลดลงของกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ขณะเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของเมมเบรนหรือเคลื่อนที่ผ่านชั้นของสารละลายที่เกิดการอุดตันเป็นฟาวลิงส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง

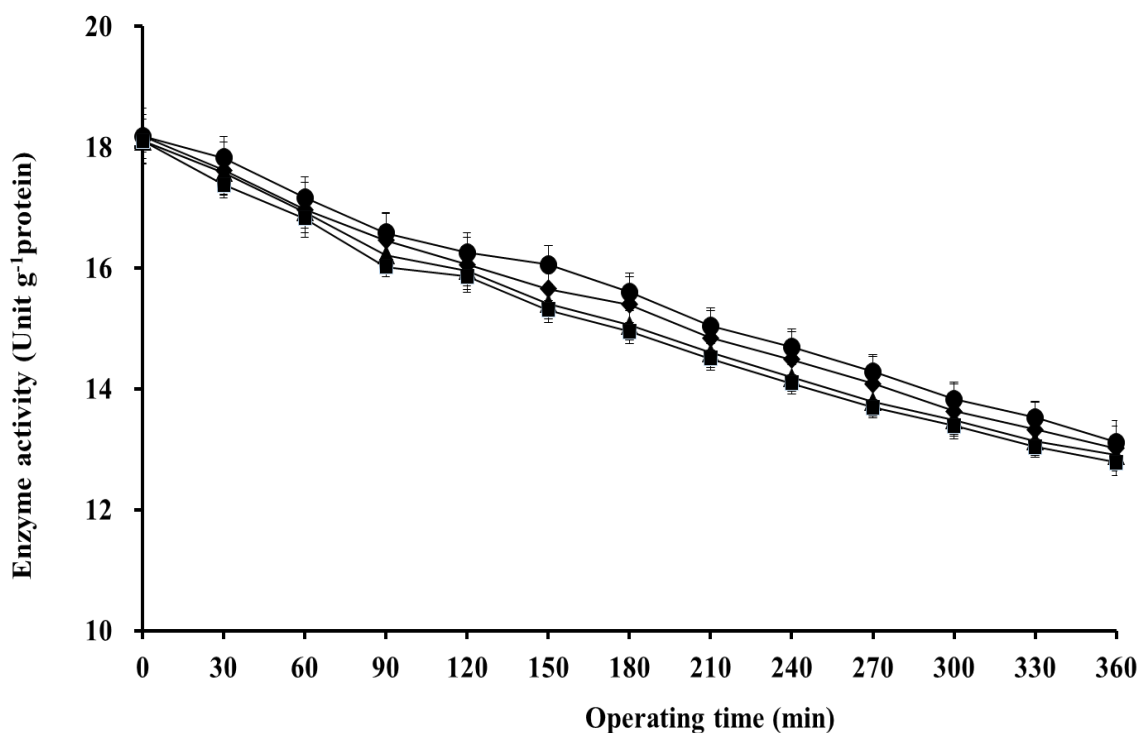


Figure 16 Effect of TMP on enzyme activity during CBEMR system ($S_0 = 1 \text{ \% w/v}$ and $E_0 = 20 \text{ unit g}^{-1} \text{ protein}$, pre-hydrolysis time = 90 min, CFV = 1 m s^{-1} , temperature = $50 \text{ }^\circ\text{C}$, and initial volume = 550 mL) (●, ◆, ▲ and ■; enzyme activity of TMP = 0.5, 1.0, 1.3 and 1.6 bar, respectively)

Table 5 แสดงผลของความดันขับต่อค่าเฉลี่ยการส่งผ่านโปรตีนและกิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE พบว่า ค่าการส่งผ่านโปรตีนที่ความดันขับ 1.3 บาร์ มีค่าสูงที่สุดคือ ร้อยละ 84.97 รองลงมาคือ ที่ความดันขับ 1.6 บาร์ อยู่ที่ร้อยละ 83.57 ความดันขับ 1.0 บาร์ อยู่ที่ร้อยละ 83.34 และ ความดันขับ 0.5 บาร์ อยู่ที่ร้อยละ 79.25 ตามลำดับ ค่าการส่งผ่านโปรตีนแปรผันตรงกับการเปลี่ยนแปลงค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท ในส่วนของกิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงแปรผันตรงกับค่าการส่งผ่านโปรตีน ที่ค่าความดันขับ 1.3 บาร์ ให้ค่ากิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงที่สุด คือ 90.31 ไมโครกรัมแคปโตพริลต่อกรัมโปรตีน ดังนั้นค่าความดันขับส่งผลต่อกิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ที่ความดันขับ 1.3 บาร์ เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไปเมื่อพิจารณาจากค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท การเกิดฟาวลิงและกิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE

Table 5 Effect of TMP on the average of T_p and ACE inhibitory activities of permeate during CBEMR system ($S_0 = 1\% \text{ w/v}$, $E_0 = 20 \text{ unit g}^{-1} \text{ protein}$, pre-hydrolysis = 90 min, CFV = 1 m s^{-1} , temperature = 50°C , and initial volume = 550 mL)

T_p and ACE inhibitory activities	TMP (bar)			
	0.5	1.0	1.3	1.6
T_p (%)	79.25±0.25 ^a	83.34±0.66 ^b	84.07±0.93 ^b	83.44±0.05 ^c
ACE assay*	80.32±0.31 ^a	86.5±0.50 ^a	90.31±0.55 ^b	88.01±0.70 ^c

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

* Unit for ACE assay is $\mu\text{g captopril g}^{-1} \text{ protein}$

2.3 ผลของความเร็วตามขวาง ต่อการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยระบบ CBCMR

ผลของเมมเบรนฟาวลิงต่อการถ่ายเทมวลของระบบปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์ ถ้าเมมเบรนฟาวลิงเป็นสาเหตุให้เกิดการขัดขวางรูพรุนของเมมเบรน เป็นฟาวลิงที่ไม่ขึ้นอยู่กับความเร็วตามขวาง (Vela *et al.*, 2009) ผลของความเร็วตามขวางต่อค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท ค่ารีคัฟเวอรีในระบบ CBCMR แสดงใน Figure 17 ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทเฉลี่ยและค่ารีคัฟเวอรีที่ความเร็วตามขวางที่ 1.0 1.5 และ 2.0 เมตรต่อวินาที เป็น 4.15 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง (ร้อยละ 31) 4.50 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง (ร้อยละ 40) และ 4.50 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง (ร้อยละ 40) ตามลำดับ ที่ความเร็วตามขวาง 1.5 และ 2.0 เมตรต่อวินาที ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทและค่ารีคัฟเวอรีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และสูงกว่าที่ความเร็วตามขวาง 1.0 เมตรต่อวินาที แนวโน้มการ

เปลี่ยนแปลงค่าฟลักซ์ของเพอเมอเทลดลงในช่วง 30 นาทีแรกของการกรองจากนั้นมีแนวโน้มคงที่จนสิ้นสุดกระบวนการกรองที่เวลา 360 นาที ค่าฟลักซ์ของเพอเมอเท และค่ารีคัฟเวอรีที่ความเร็วตามขวาง 1.0 1.5 และ 2.0 เมตรต่อวินาที เป็น 3.96 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง (ร้อยละ 71) 4.33 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง (ร้อยละ 77) และ 4.34 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง (ร้อยละ 77) ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มความดันขับส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของค่าฟลักซ์ของเพอเมอเท เนื่องจากการเพิ่มความเร็วมตามขวางช่วยเพิ่มความเค้นเฉือนที่ผิวหน้าเมมเบรน เมื่อค่าความเค้นเฉือนเฉือนสูงช่วยลดการเกิดคอนเซนเทรชัน โพลาริเซชันและเพิ่มการอัตราการกำจัดอนุภาคของสารปนผิวหน้าเมมเบรน นำไปสู่การเพิ่มค่าฟลักซ์ของเพอเมอเท (Laorko *et al.*, 2011) Hua และคณะ (2007) ศึกษาผลของความเร็วมตามขวางในช่วง 0.21 ถึง 1.68 เมตรต่อวินาที ต่อค่าฟลักซ์ของเพอเมอเท ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของค่าฟลักซ์ของเพอเมอเทแปรผันตรงกับการเพิ่มขึ้นของความเร็วมตามขวาง การเลือกใช้ค่าความเร็วมตามขวางในระดับที่เหมาะสมจะเพิ่มประสิทธิภาพของการกรองได้ ความเร็วมตามขวางที่แนะนำให้ใช้ในระบบอัลตราฟิลเตรชันสำหรับการทดลองนี้คือ 2 เมตรต่อวินาที

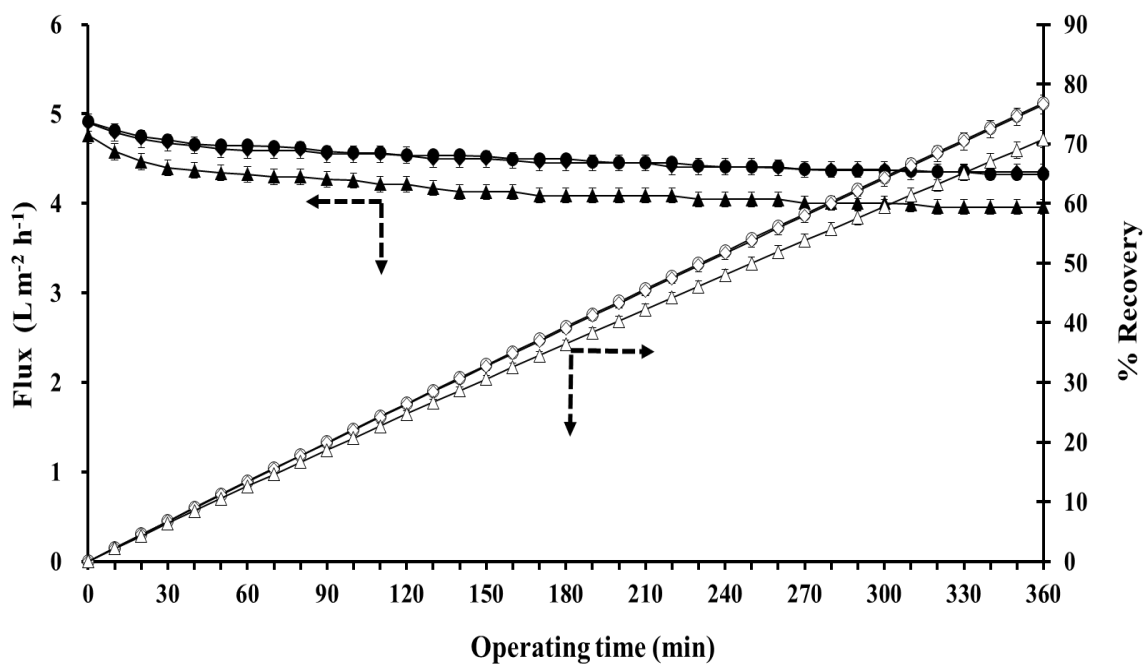


Figure 17 Effect of CFV on permeate flux and % recovery during CBEMR system ($S_0 = 1\%$ w/v, $E_0 = 20$ unit g^{-1} protein, pre-hydrolysis time = 90 min, TMP = 1.3 bar, temperature = $50^\circ C$, and initial volume = 550 mL) (\blacktriangle , \blacklozenge , and \bullet ; permeate flux of CFV = 1.0, 1.5, and 2.0 m s^{-1} and \triangle , \diamond , and \circ ; % recovery of CFV = 1.0, 1.5, and 2.0 m s^{-1} , respectively)

Table 6 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทกับเวลาในการกรองสามารถอธิบายการเกิดเมมเบรนฟาวลิง พบว่า ค่าความต้านทานรวม ค่าความต้านทานฟาวลิงผันกลับได้ ค่าความต้านทานฟาวลิงภายนอกแบบผันกลับไม่ได้ และค่าความต้านทานฟาวลิงภายในแบบผันกลับไม่ได้ ของเมมเบรนลดลงแปรผกผันกับการเพิ่มของค่าความเร็วตามขวาง การเพิ่มขึ้นของค่าความเร็วตามขวางช่วยลดการเกิดเมมเบรนฟาวลิง (Vadi and Rizvi, 2001) เมมเบรนฟาวลิงผันกลับได้และผันกลับไม่ได้ลดลงเมื่อใช้ความเร็วตามขวางที่เหมาะสม และเมมเบรนฟาวลิงถูกกำจัดออกจากผิวหน้าของเมมเบรนด้วยแรงเฉือน (She *et al.*, 2009) Choi และคณะ (2005) รายงานผลของความเร็วตามขวางต่อการเกิดเมมเบรนฟาวลิงระหว่างกระบวนการอัลตราฟิลเตรชันขนาด MWCO 30 กิโลดาลตัน พบว่า ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทเพิ่มขึ้นแปรผันตรงกับความเร็วตามขวาง และที่ความเร็วตามขวางสูงลดการเกิดฟาวลิงได้

Table 6 Membrane fouling of UF membrane in CBEMR at TMP of 1.3 bar as varying CFV

CFV (ms^{-1})	R_f/R_m	R_{if}/R_m	R_{if}/R_m	R_{if-ex}/R_m	R_{if-in}/R_m
1.0	1.4	1.1	0.3	0.2	0.1
1.5	1.3	1.0	0.2	0.1	0.1
2.0	1.2	1.0	0.2	0.1	0.0

ผลของความเร็วตามขวางต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสแสดงในFigure 16 พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสลดลงแปรผกผันกับการเพิ่มขึ้นของความเร็วตามขวาง Nakkeeran และ Subramanian (2010) อธิบายผลของความเร็วตามขวางทำให้เกิดแรงเฉือนจากกระบวนการต่างๆ เช่น ระหว่างการกรอง การกวน ส่งผลต่อการลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอส นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Thomas และ Geer (2010) เกี่ยวกับความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเคมี เมื่อได้รับแรงเฉือนจากภายนอก ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนจากโครงสร้างจตุรภูมิ เป็นทุติยภูมิหรือตติยภูมิ ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีน ซึ่งส่งผลต่อการลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอส

Table 7 แสดงผลของความเร็วตามขวางต่อค่าเฉลี่ยการส่งผ่านโปรตีนและกิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ในระบบ CBEMR พบว่า ค่าการส่งผ่านโปรตีนแปรผันตรงกับค่าความเร็วตามขวาง ค่าการส่งผ่านโปรตีนที่ความเร็วตามขวาง 2 เมตรต่อวินาที และ 1.5 เมตรต่อวินาที มีค่าเท่ากันคือร้อยละ 86 สูงกว่าที่ความเร็วตามขวาง 1.0 เมตรต่อวินาที มีค่าเท่ากับร้อยละ 84 ค่าการส่งผ่านโปรตีนขึ้นอยู่กับสภาพอนุภาคผ่านเมมเบรนสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทที่ความเร็วตามขวาง 2 เมตรต่อวินาที และ 1.5 เมตรต่อวินาที ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) เช่นเดียวกับค่ากิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง

เอนไซม์ ACE ที่แปรผันตรงกับค่าความเร็วตามขวางสอดคล้องกับค่าการส่งผ่านโปรตีน ดังนั้นค่าความเร็วตามขวางที่ 1.5 เมตรต่อวินาที จึงถูกคัดเลือกเพื่อศึกษาผลของ gas-liquid two-phase flow ต่อการแยกเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยระบบ CBCMR ในขั้นตอนต่อไป

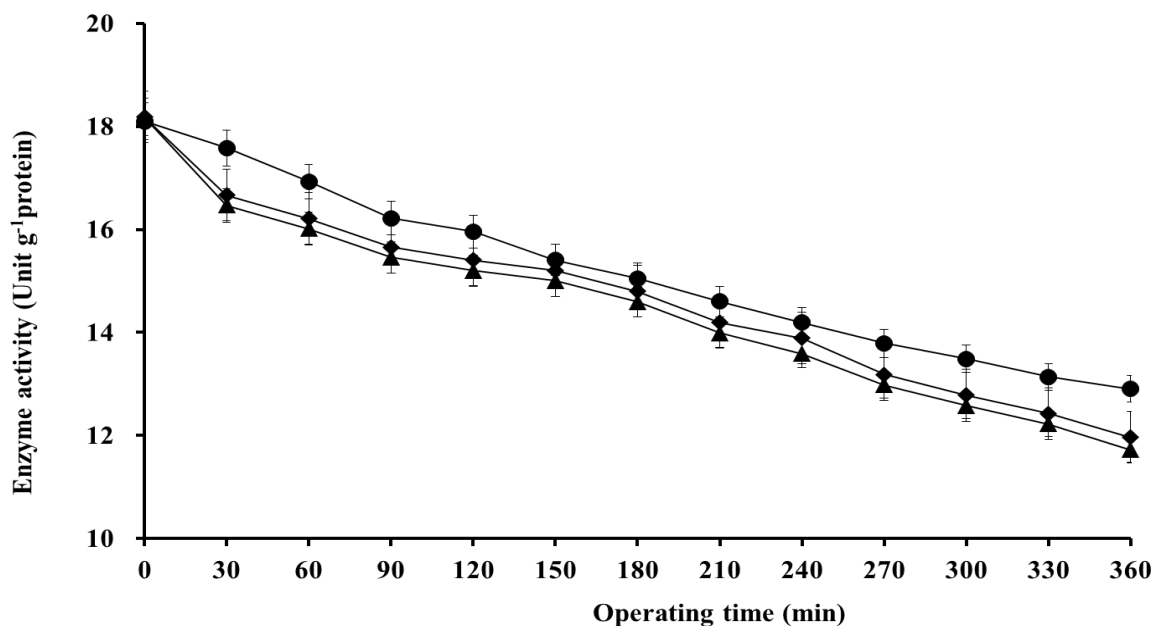


Figure 18 Effect of CFV on enzyme activity during CBEMR system ($S_0 = 1\%$ w/v, $E_0 = 20$ unit g^{-1} protein, pre-hydrolysis time = 90 min, TMP = 1.3 bar, temperature = 50 °C, and initial volume = 550 mL) (●, ◆, and ▲; enzyme activity of CFV = 1.0, 1.5, and 2.0 $m\ s^{-1}$, respectively)

Table 7 Effect of CFV on the average of T_p and ACE inhibitory activities of permeate during CBEMR system ($S_0 = 1\%$ w/v, $E_0 = 20$ unit g^{-1} protein, pre-hydrolysis time = 90 min, TMP = 1.3 bar, temperature = 50 °C, and initial volume = 550 mL)

T_p and bioactive peptide activities	CFV ($m\ s^{-1}$)		
	1.0	1.5	2.0
T_p (%)	84.07±0.93 ^a	86.34±0.66 ^b	86.38±0.62 ^b
ACE assay*	90.31±0.69 ^a	93.21±0.79 ^b	93.22±0.78 ^b

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

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

2.4 ผลของ gas-liquid two-phase flow ต่อการแยกเฟสไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยระบบ CBCMR

การเกิดเมมเบรนฟาวลิงเป็นปัญหาสำคัญของการประยุกต์ใช้ระบบ CBCMR ในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ หลายๆ เทคนิคถูกนำมาใช้เพื่อแก้ปัญหานี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกรองในปฏิกรณ์เมมเบรนเอนไซม์ gas-liquid two-phase flow เป็นอีกหนึ่งวิธีที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการกรองได้ ผลของ gas-liquid two-phase flow ต่อการแยกเฟสไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยระบบ CBCMR แสดงใน Figure 19 พบว่า ค่าเฉลี่ยฟลักซ์ของเพอมีเอทและรีคัฟเวอรีเฉลี่ยที่ค่าความเค้นเฉือน 0.019 0.026 0.030 และ 0.039 เป็น 4.50 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง (ร้อยละ 40) 4.56 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง (ร้อยละ 40) 4.72 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง (ร้อยละ 40) และ 4.81 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง (ร้อยละ 40) ตามลำดับ ที่ค่าความเค้นเฉือน 0.039 ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยในช่วง 30 นาทีแรกของการกรอง และค่อนข้างคงที่เมื่อเวลาในการกรองเพิ่มขึ้น จนกระทั่งสิ้นสุดการกรองที่เวลา 360 นาที ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทเท่ากับ 4.73 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง ร้อยละรีคัฟเวอรีเท่ากับ 82 ที่เวลาการกรองเท่ากับค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทที่ค่าความเค้นเฉือน 0.019 เท่ากับ 4.35 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง ร้อยละรีคัฟเวอรีเท่ากับ 77

การเปลี่ยนแปลงค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทที่เวลาในการกรองต่างๆ อธิบายด้วยผลของการเกิดเมมเบรนฟาวลิงใน Table 8 พบว่า ค่าความต้านทานรวม ค่าความต้านทานฟาวลิงผันกลับได้ ค่าความต้านทานฟาวลิงภายนอกแบบผันกลับไม่ได้ และค่าความต้านทานฟาวลิงภายในแบบผันกลับไม่ได้ ของเมมเบรนลดลงแปรผกผันกับการเพิ่มของค่าความเค้นเฉือน ระบบ gas-liquid two-phase flow สามารถลดค่าความต้านทานฟาวลิงได้ ส่งผลให้ค่าฟลักซ์ของเพอมีเอทเพิ่มขึ้น เนื่องจากแรงเฉือนที่ผิวหน้าเมมเบรนเพิ่มขึ้น (Pospisil *et al.*, 2004)

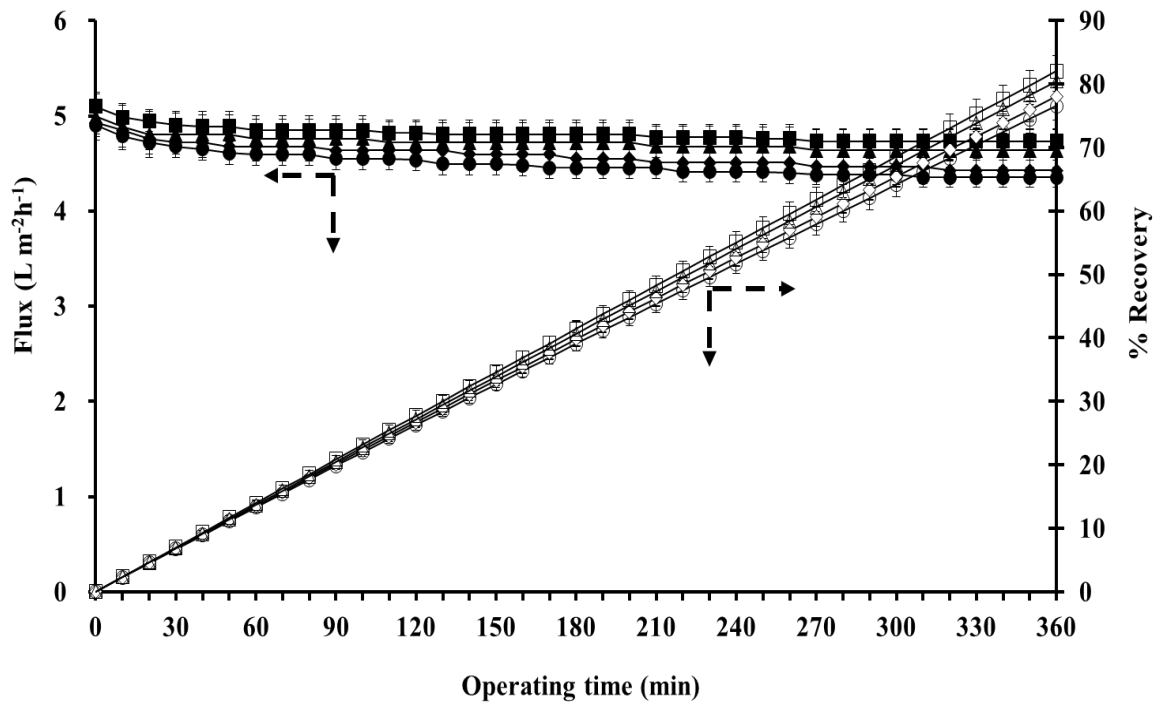


Figure 19 Effect of gas-liquid two-phase flow on permeate flux and % recovery during CBEMR system ($S_0 = 1\%$ w/v, $E_0 = 20$ unit g^{-1} protein, pre-hydrolysis time = 90 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1} , temperature = $50\text{ }^\circ\text{C}$, and initial volume = 550 mL) (●, ◆, ▲ and ■; permeate flux of $N'_S = 0.019, 0.026, 0.030$ and 0.039 and ○, ◇, △ and □; % recovery of $N'_S = 0.019, 0.026, 0.030$ and 0.039 , respectively)

Table 8 Membrane fouling of UF membrane in CBEMR at TMP of 1.3 bar and CFV of 1.5 m s^{-1} as varying Shear stress number (N'_S)

Shear stress number (N'_S)	R_t/R_m	R_{if}/R_m	R_{if}/R_m	R_{if-ex}/R_m	R_{if-in}/R_m
0.019	1.3	1.0	0.20	0.12	0.1
0.026	1.1	1.0	0.16	0.10	0.0
0.030	1.0	0.9	0.10	0.08	0.0
0.039	1.0	0.8	0.10	0.08	0.0

ผลของ gas-liquid two-phase flow ต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสแสดงใน Figure 20 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสลดลงแปรผกผันกับการเพิ่มขึ้นของค่าความดันเฉือน Clarkson

และคณะ (1999) อธิบายผลของการใช้ก๊าซในการกรองสารละลายด้วยเมมเบรนทำให้เกิดฟองอากาศในระบบ ที่ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนทำให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสลดลง อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มค่าความเร็วของก๊าซในระดับที่สูงขึ้น การเกิดฟองอากาศจะมากขึ้นตาม Clarkson และคณะ (2000) ศึกษาการเสถียรภาพของโปรตีนในสภาวะการกรองที่มีฟองอากาศ พบว่า ฟองอากาศทำให้โปรตีนเสถียรภาพ ทำให้เกิดการออกซิไดซ์กับออกซิเจนในอากาศเล็กน้อย และความเสียหายของโปรตีนที่เกิดจากค่าความเป็นกรดและแรงของประจุ ฟองอากาศและผลจากแรงเฉือนที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการกรองทำให้โครงสร้างจตุรภูมิของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป

Table 9 แสดงผลของความเค้นเฉือนต่อค่าเฉลี่ยของการส่งผ่านโปรตีนและกิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ในระบบ CBEMR พบว่า ที่ค่าความเค้นเฉือนสูงที่สุดคือ 0.039 ให้ค่าการส่งผ่านโปรตีนร้อยละ 90.75 รองลงมาคือ ที่ค่าความเค้นเฉือน 0.030 0.026 และ 0.019 เป็นร้อยละ 88.18 ร้อยละ 87.06 และ ร้อยละ 86.34 ตามลำดับ ค่าการส่งผ่านโปรตีนแปรผันตรงกับค่าความเค้นเฉือน และสัมพันธ์กับการค่าฟลักซ์ของเพอมีเอท นอกจากนี้ความเค้นเฉือนยังส่งผลต่อกิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ในระบบ CBEMR พบว่า ค่ากิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) ที่ค่าความเค้นเฉือนต่างๆ ที่ค่าความเค้นเฉือนสูงที่สุด 0.039 ให้ค่ากิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงที่สุด

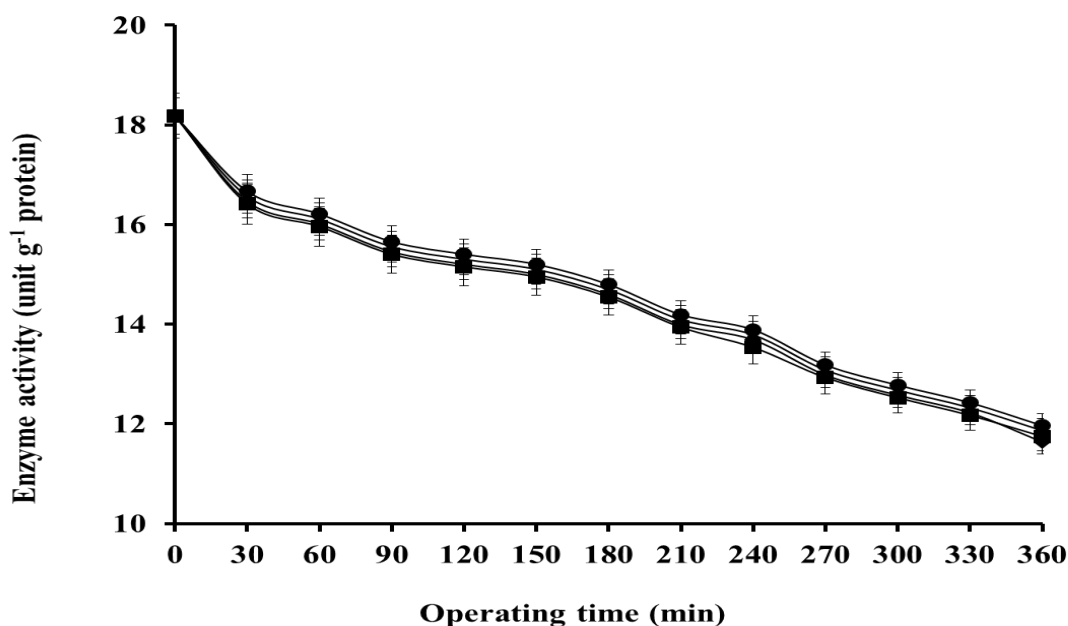


Figure 20 Effect of gas-liquid two-phase flow on enzyme activity during CBEMR system ($S_0 = 1\%$ w/v, $E_0 = 20$ unit g^{-1} protein, pre-hydrolysis time = 90 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1} , temperature = 50 °C, and initial volume = 550 mL) (●, ▲, ■ and ◆; enzyme activity of $N'_S = 0.019, 0.026, 0.030$ and 0.039 , respectively)

Table 9 Effect of Shear stress number on average of T_p and bioactive activities during CBEMR 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 = $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, and initial volume = 550 mL)

T_p and bioactive peptide activities	Shear stress number (N'_S)			
	0.019	0.026	0.030	0.039
T_p (%)	86.34 ± 0.66^a	87.06 ± 0.94^{ab}	88.18 ± 0.82^b	90.75 ± 0.25^c
ACE assay*	93.21 ± 0.79^a	95.34 ± 0.66^b	96.68 ± 0.19^c	98.99 ± 0.01^d

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

Figure 21 และ 22 แสดงผลของ gas-liquid two-phase flow ต่อค่าโปรตีนคอนเวอร์ชันและค่าผลิตภาพของโปรตีนคำนวณในรูปของปริมาณที่เหมาะสมที่เวลาการกรองใดๆ พบว่า ค่าคอนเวอร์ชันและค่าผลิตภาพของโปรตีนแปรผันตรงกับค่าความเข้มข้น การวิเคราะห์หาค่าความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการของ Lowry (Lowry's method) ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้เวลาไม่นานและมีความแม่นยำ

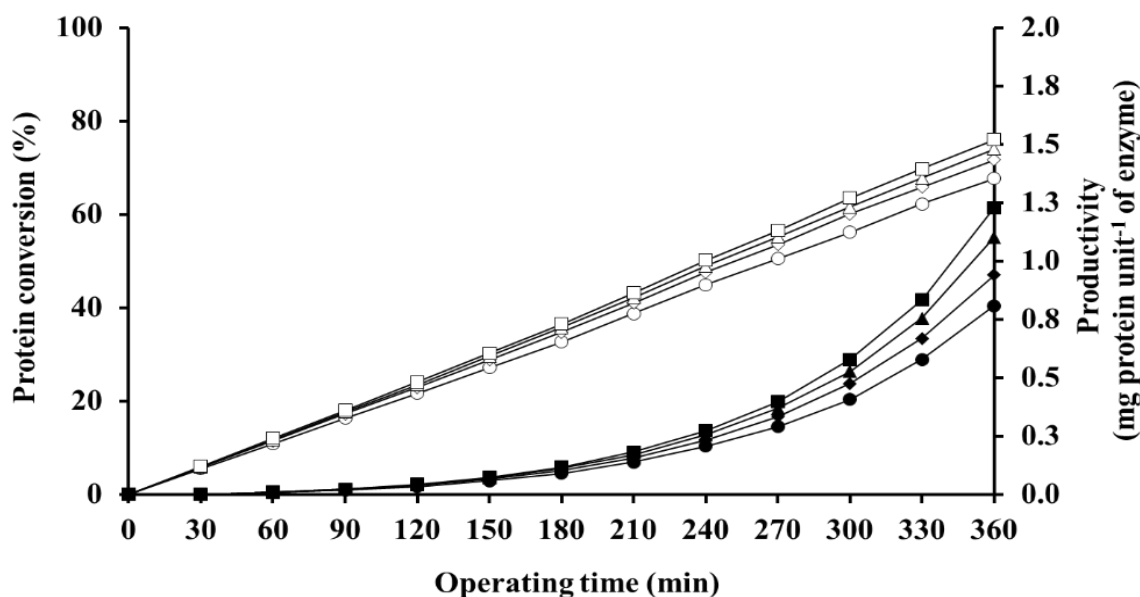


Figure 21 Effect of gas-liquid two-phase flow on protein conversion and productivity of protein during CBEMR system ($S_0 = 1\%$ w/v, $E_0 = 20$ unit g^{-1} protein, pre-hydrolysis time = 90 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1} , temperature = $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, and initial volume = 550 mL) (\circ , \diamond , \triangle and \square ; conversion of $N'_S = 0.019, 0.026, 0.030$ and 0.039 and \bullet , \blacklozenge , \blacktriangle and \blacksquare ; productivity of $N'_S = 0.019, 0.026, 0.030$ and 0.039 , respectively)

ค่าโปรตีนคอนเวอร์ชันเมื่อสิ้นสุดเวลาการกรองที่ 360 นาที มีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 68 ถึง 76 โดยมีค่าสูงสุดที่ความเข้มข้น 0.039 จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าระบบ gas-liquid two-phase flow ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกรองได้ ในส่วนของค่าผลิตภาพของโปรตีน คำนวณในรูปของมวลของผลิตภัณฑ์ต่อยูนิตของเอนไซม์ พบว่า ผลิตภาพของโปรตีนแปรผันตรงกับเวลาในการกรองที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Cui และคณะ (2011) ค่าความเข้มข้นที่ 0.039 ให้ค่าโปรตีนคอนเวอร์ชัน และค่าผลิตภาพของโปรตีนสูงที่สุด คือ ร้อยละ 202 และ 0.9 มิลลิกรัมเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ต่อยูนิตของเอนไซม์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าระบบ gas-liquid two-phase flow สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ได้ทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ

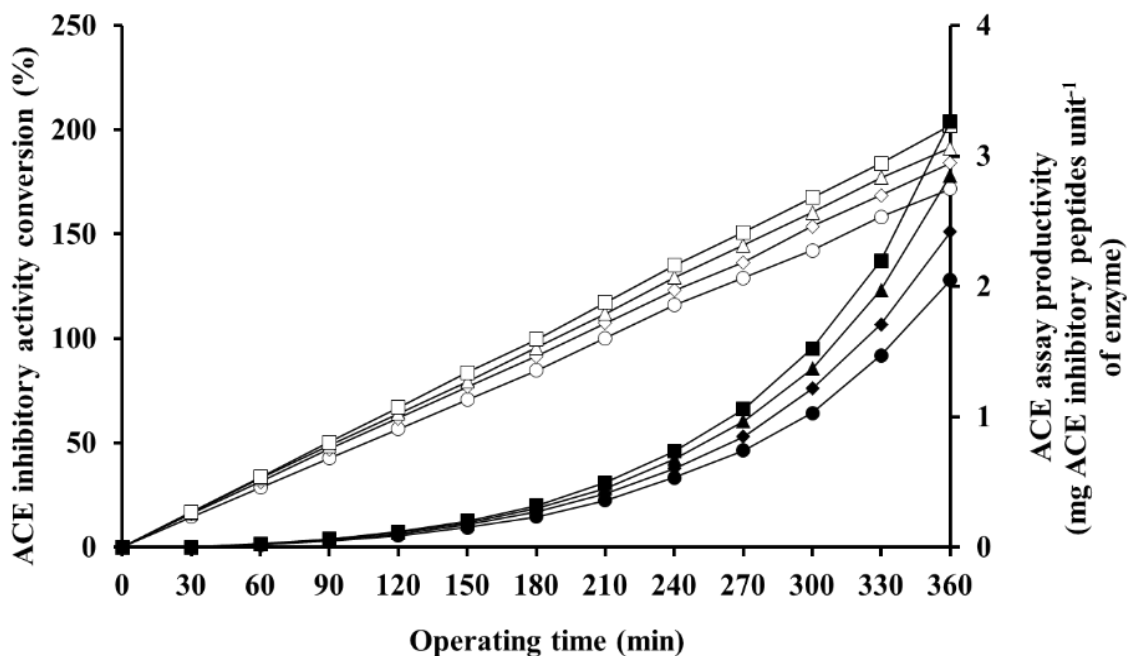


Figure 22 Effect of gas-liquid two-phase flow on ACE inhibitory capacity conversion and productivity of ACE inhibitory peptides during CBEMR system ($S_0 = 1\%$ w/v, $E_0 = 20$ unit g^{-1} protein, pre-hydrolysis time = 90 min, TMP = 1.3 bar, CFV = 1.5 m s^{-1} , temperature = 50 °C, and initial volume = 550 mL) (○, ◇, △ and □; conversion of $N'_S = 0.019, 0.026, 0.030$ and 0.039 and ●, ◆, ▲ and ■; productivity of $N'_S = 0.019, 0.026, 0.030$ and 0.039 , respectively)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ของโปรตีนจากเนื้อปลานิลด้วยเมมเบรนที่มีขนาด MWCO 1 กิโลดาลตัน ให้ค่ากิจกรรมของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงที่สุด ความดันขับและความเร็วตามขวางที่เหมาะสมในการกรอง คือ 2 บาร์ และ 2 เมตรต่อวินาที ตามลำดับ การเพิ่มประสิทธิภาพการกรองด้วยระบบ gas-liquid two-phase flow ที่ค่าความเค้นเฉือน 0.039 มีประสิทธิภาพสูงในการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE จากเนื้อปลานิลด้วยกระบวนการอัลตราฟิลเตรชันดีที่สุดในลำดับ
2. การพัฒนากระบวนการผลิตโดยการประยุกต์ใช้ระบบ CBEMR พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายโปรตีนจากเนื้อปลานิลก่อนการแยกเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE คือ 90 นาที และความดันขับและความเร็วตามขวางที่เหมาะสม คือ 1.3 บาร์ และ 1.5 เมตรต่อวินาที ตามลำดับ การใช้ gas-liquid two-phase flow ในการกรอง ที่ค่าความเค้นเฉือน 0.039 ให้ค่าคอนเวอร์ชันและผลิตภาพของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงที่สุด คือ ร้อยละ 202 และ 0.9 มิลลิกรัมเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ต่อยูนิตของเอนไซม์ ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. การพัฒนาระบบการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเนื้อปลานิลด้วยปฏิกรณ์เมมเบรน เอนไซม์สู่กระบวนการผลิตอย่างต่อเนื่อง continuous enzymatic membrane reactor (CEMR) ในระดับอุตสาหกรรม
2. การศึกษากระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเนื้อปลานิลในรูปแบบแคปซูล หรือพัฒนาเป็นอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ และติดตามการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเคมีและกายภาพของผลิตภัณฑ์
3. การผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากวัสดุเศษเหลือ (by-product) ของอุตสาหกรรมแปรรูปปลานิล

ผลผลิต

นำเสนอผลงานต่อที่ประชุมวิชาการ

1. 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.
2. 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.

รายงานสรุปการเงิน

รหัสโครงการ 103106 เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย 2558A10802005 สัญญาเลขที่ 1/2558

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE (Angiotensin-I converting enzyme)

จากโปรตีนปลาไหล ด้วยปฏิกรณ์เอนไซม์เบรอนเอนไซม์

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ดร. นรินทร์ เจริญพันธ์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2557 ถึงวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2558

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2557

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	220,000	บาท	เมื่อวันที่ 15	มกราคม 2558
งวดที่ 2 (40%)	176,000	บาท	เมื่อวันที่ 18	มีนาคม 2558
งวดที่ 3 (10%)	44,000	บาท	เมื่อวันที่ 30	กันยายน 2558
รวม	440,000	บาท		

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1. ค่าตอบแทนที่ปรึกษา	20,000	20,000	0
2. ค่าจ้าง	0	0	0
3. ค่าวัสดุ	276,000	276,000	0
4. ค่าใช้สอย	100,000	100,000	0
5. ค่าครุภัณฑ์	0	0	0
6. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ	44,000	44,000	0
ค่าสาธารณูปโภค 10 %			
รวม	440,000	440,000	0

นรินทร์ เจริญพันธ์

(นางสาวนรินทร์ เจริญพันธ์)

หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

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.
- Akagunduz, Y., Mosquera, M., Gimenez, B., Aleman, A., Montero, P. and Gomez-Guillen, M.C. 2014. Sea bream bones and scales as a source of gelatin and ACE inhibitory peptides. LWT - Food Sci. Technol. 55 : 579-585.
- Baker, R.W. 2000. Membrane Technology and Applications. Menlo park. California.
- Balti, R., Bougatef, A., Sila, A., Guillochon, D., Dhulster, P. and Nedjar-Arroume, N. 2015. Nine novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle protein hydrolysates and antihypertensive effect of the potent active peptide in spontaneously hypertensive rats. Food Chem. 170 : 519-525.
- Bako, K., Koutinas, A., Nemestothy, N., Gubicza, L. and Webb, C. 2006. Continuous enzymatic cellulose hydrolysis in a tubular membrane bioreactor. Enzym. Microb. Tech. 38 : 155–161.
- Bonin, M. M., Fonade, C. and Guiziou, G.G. 2004. Application of gas/liquid two-phase flows during crossflow microfiltration of skimmed milk under constant flux conditions. Chem. Eng. Sci. 59 : 2333 – 2341.
- Chabeaud, A. Vandanjon, L. Bourseau, P. Jaouen, P. Chaplain-Derouiniot, M. and Guerard, F. 2009. Performances of ultrafiltration membranes for fractionating a fish protein hydrolysate: application to the refining of bioactive peptidic fractions. Sep. Purif. Technol. 66: 463–71.
- Charoenphun, N., Cheirsilp, B., Sirinupong, N. and Youravong W. 2013a. Calcium- binding

peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate. Eur. Food Res. Tech. 236 : 57–63.

Charoenphun, N., Youravong, W. and Cheirsilp, B. 2013b. 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.

Chen, J., Liu, S., Ye, R., Cai, G., Ji, B. and Wu, Y. 2013. Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory tripeptides from rice protein hydrolysate: Purification and characterization. J. funct. food. 5 : 1684-1692.

Chen, J., Wang, Y., Zhong, Q., Wu, Y. and Xia, W. 2012. Purification and characterization of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysate of grass carp protein. Peptides. 33 : 52-8.

Cheryan, M. 1986. Modelling of Ultrafiltration Processes, in: Ultrafiltration Handbook, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA.

Cheryan, M. 1998. Ultrafiltration and Microfiltration Handbook. 2nd ed. CRC Press. New York.

Cheryan, M. and Deeslie, W.D. 1983. Soy protein hydrolysis in membrane reactors. J. Am. Oil Chem. Soc. 60 : 1112–1115.

Chiang, W.D., Shih, C.J. and Chu, Y.H. 1999. Functional properties of soy protein hydrolysate produced from a continuous membrane reactor system. Food Chem. 65 : 189-194.

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.
- Choi, H., Zhang, K., Dionysiou, D.D., Oerther, D.B. and Sorial, G.A. 2005. George A. Influence of cross-flow velocity on membrane performance during filtration of biological suspension. *J. Membr. Sci.* 248 : 189-199.
- 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.
- Clarkson, J.R., Cui, Z.F. and Darton, R.C. 2000. Effect of solution conditions on protein damage in foam. *Biochem. Eng. J.* 2 : 107–114.
- Connolly, A., O’Keeffe, M.B., Piggott, C.O., Nongonierma, A.B. and FitzGerald, R.J. 2015. Generation and identification of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from a brewers’ spent grain protein isolate. *Food Chem.* 176 : 64-71.
- 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.
- Darnoko, D., Cheryan, M., and Artz, W. E. 1989. Saccharification of cassava starch in an ultrafiltration reactor. *Enzyme. Microb. Technol.* 11 : 21–34.
- Das, R., Bhattacharjee, C. and Ghosh, S. 2009. Effects of operating parameters and nature of fouling behavior in ultrafiltration of sesame protein hydrolysate. *Desalination.* 237 : 268–2761.

- De Bruijn, J., Venegas, A. and Borquez, R. 2002. Influence of crossflow filtration on membrane fouling and apple juice quality. *Desalination*, 148 : 131–136.
- Department of Fisheries Thailand. 2011. Strategic Development of Tilapia (2010–2014) (Online). Available : <http://www.fisheries.go.th/dof/> (1 September 2014).
- Ducom, G., Puech, F.P. and Cabassud, C. 2002. Air sparging with flat sheet nanofiltration: a link between wall shear stresses and flux enhancement. *Desalination*. 145 : 97–102.
- Duncan, D.B. 1995. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*. 11 : 1–42.
- Elmaleh, S. and Ghaffor, N. 1996. Upgrading oil refinery effluents by cross-flow ultrafiltration. *Water Sci. Technol.* 34 : 231-238.
- Field, R.W., Wu, D. and Howell, J.A. 1995. Critical flux for microfiltration fouling. *J. Membr. Sci.* 100 : 259-272.
- Fisheries economics division. 2015. Production and marketing systems of tilapia in 2014 and trends in 2015 (Online). Available : <http://fishco.fisheries.go.th/fisheconomic/> (22 May 2015).
- Foh, M.B.K., Amadou, I., Foh, B.M., Kamara, M.T. and Xia,W. 2010. Functionality and antioxidant properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) as influenced by the degree of hydrolysis. *Int. J. Mol. Sci.* 11 : 1851-1869.
- Gao, D., Chang, T., Li, H. and Cao, Y. 2010. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from cottonseed protein hydrolysate. *Afr. J. Biotechnol.* 9 : 8977-8983.
- Gaucher, C., Jaouen, P., Legentilhomme, P. and Comiti, J. 2002a. Suction effect on the shear stress at a plane ultrafiltration ceramic membrane surface. *Separ. Sci. Technol.* 37 : 2251-2270.
- Gaucher, C., Legentilhomme, P., Jaouen, P. and Comiti, J. 2002b. Influence of fluid

distribution on the wall shear stress in a plane ultrafiltration module using an electrochemical method. *Chem. Eng. Res. Des.* 80 : 111–120.

Gaucher, C., Legentilhomme, P., Jaouen, P., Comiti, J. and Pruvost, J. 2002c.

Hydrodynamics study in a plane ultrafiltration module using an electrochemical method and particle image velocimetry visualization. *Exp. Fluids.* 32 : 283-293.

Giri, S.K. and Mangaraj, S. 2014. Soymilk concentration by ultrafiltration: effects of pore size and transmembrane pressure on filtration performance. *Inter. J. Food Sci. Technol.* 49 : 666–672.

Hooper, N.M. 1991. Angiotensin converting enzyme: implications from molecular biology for its physiological functions. *Intl. J. Biochem.* 23 : 641–647.

Hua, F.L., Tsang, Y.F., Wang, Y.J., Chan, S.Y., Chua, H. and Sin, S.N. 2007. Performance study of ceramic microfiltration membrane for oily wastewater treatment. *Chem. Eng. J.* 128 : 169–175.

Huang, G., Ren, L. and Jiang, J. 2011. Purification of a histidine-containing peptide with calcium binding activity from shrimp processing byproducts hydrolysate. *Eur. Food Res. Tech.* 232 : 281-287.

Hwang, K.J. and Hsu, C.E. 2009. Effect of gas–liquid flow pattern on air-sparged cross-flow microfiltration of yeast suspension. *Chem. Eng. J.* 151 : 160–167.

Jakubczyk, A., Karas, M., Baraniak, B. and Pietrzak, M. 2013. The impact of fermentation and in vitro digestion on formation angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory (peptides from pea proteins. *Food Chem.* 141 : 3774–3780.

Je, J.Y., Park, P.J., Kwon, J.Y. and Kim, S.K. 2004. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 52 : 7842-7845.

Jeon, Y.J. and Kim, S.K. 2000. Production of chitooligosaccharides using an ultrafiltration

- membrane reactor and their antibacterial activity. *Carbohydr. Polym.* 41 : 133–141.
- Jung, W.K., Karawita, R., Heo, S.J., Lee, B.J., Kim, S.K. and Jeon, Y.J. 2006. Recovery of a novel Ca-binding peptide from Alaska Pollock (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis. *Process Biochem.* 41 : 2097–2100.
- Karthik, V., Gupta, S.D. and De, S. 2002. Modeling and simulation of osmotic pressure controlled electro-ultrafiltration in a cross-flow system. *J. Membr. Sci.* 199 : 29–40.
- 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, A.S. and Liu, Y. 2008. Irreversible chemical potential and shear-induced diffusion in crossflow filtration. *Ind. Eng. Chem. Res.* 47 : 5611–5614.
- 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, S.K. and Senevirathne, M. 2011. Membrane bioreactor technology for the development of functional materials from sea-food processing wastes and their potential health benefits. *Membranes.* 1 : 327-344.
- Kim, Y.K., Lim, C.W., Yeun, S.M., Lee, M.H., Moon, H.S., Cho, H.A., Yoon, N.Y., Yoon, H.D., Park, H.Y. and Lee, D.S. 2011. Dipeptide (Tyr-Ile) acting as an Inhibitor of Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) from the hydrolysate of Jellyfish *Nemopilema nomurai*. *Fish Aquat Sci.* 14 : 283-288.
- Ko, S.C., kang, N., Kim, E.A., Kang, M.C., Lee, S.H., Kang, S.M., Lee, J.B., Jeon, B.T., Kim, S.K., Park, S.J., Park, P.J., Jung, W.K., Kim, D. and Jeon, Y.J. 2012. A novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from a marine *Chlorella ellipsoidea* and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Process Biochem.* 47 : 2005-2011.

- Korhonen, H. and Pihlanto, A. 2006. Review bioactive peptides: production and functionality. *Intern. Dairy J.* 16 : 945–960.
- 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., Tongchitpakdee, S. and Youravong, W. 2011. Effect of gas sparging on flux enhancement and phytochemical properties of clarified pineapple juice by microfiltration. *Sep. Purif. Technol.* 80 : 445–451.
- Lassoued, I., Mora, I., Nasri, R., Jridi, M., Toldra, F., Aristoy, M.C., Barkia, A. and Nasri, M. 2015. Characterization and comparative assessment of antioxidant and ACE inhibitory activities of thornback ray gelatin hydrolysates. *J. Funct. Foods.* 13 : 225-238.
- 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 Complementary and Alternative Medicine.* 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.
- 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.
- Lopes, F.L.G., Junior, J.B.S., Souza, R.R.d., Ehrhardt, D.D., Santana, J.C.C. and Tambourgi, E.B. 2009. Concentration by membrane separation processes of a medicinal product obtained from pineapple pulp. *Braz. arch. biol. technol.* 52 : 457-464.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275.
- Mannheim, A. and Cheryan, M. 1990. Continuous hydrolysis of milk protein in a membrane

reactor. *Food Sci.* 55 : 381-385.

Marshall, A.D., Munro, P.A. and 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.

Matsui, T. and Matsumoto, K. 2006. Antihypertensive peptides from natural resources. *Adv. Phytomed.* 2 : 255–271.

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

Misun, D., Curda, L. and Jelen, P. 2008. Batch and continuous hydrolysis of ovine whey proteins. *Small Ruminant Res.* 79 : 51–56.

Nakkeeran, E. and Subramanian, R. 2010. Effect of stirring and pump on membrane processing of *Aspergillus carbonarius* culture broth for polygalacturonase. *Biochem. Eng. J.* 52 : 99–103.

Padmasiri, S.I., Zhang, J., Fitch, M., Norddahl, B., Morgenroth, E. and Raskin, L. 2007. Methanogenic population dynamics and performance of an anaerobic membrane bioreactor (AnMBR) treating swine manure under high shear conditions. *Water Res.* 41 : 134-144.

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

Picot, L., Ravallec, R., Fouchereau-Péron, M., Vandanjon, L., Jaouen, P., Chaplain-Derouiniot, M., Guérard, F., Chabeaud, A., LeGal, Y., Alvarez, O.M., Bergé, J.P., Piot, J.M., Batista, I., Pires, C., Thorkelsson, G., Delannoy, C., Jakobsen, G., Johansson, I. and Bourseau, P. 2010. Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties. *J. Sci. Food Agric.* 90 : 1819–1826.

- Pihlanto, A., Akkanen, S. and Korhonen, H. J. 2008. ACE-inhibitory and antioxidant properties of potato (*Solanum tuberosum*). *Food Chem.* 109 : 104–112.
- Pospisil, P., Mikulasek, P., Dolecek, P. and Cakl, J. 2002. Enhancement of tubular cross-flow microfiltration of dispersions by gas-liquid two-phase flow. *Chem. Pap.* 56 : 7-13.
- Pospisil, P., Wakeman, R.J., Hodgson, I.O.A. and Mikulasek, P. 2004. Shear stress-based modelling of steady state permeate flux in microfiltration enhanced by two-phase flows. *Chem. Eng. J.* 97 : 257–263.
- Prieto, C.A., Guadix, A., González-Tello, P. and Guadix, E.M. 2007. A cyclic batch membrane reactor for the hydrolysis of whey protein. *J. Food Eng.* 78 : 257–265.
- Prieto, C.A., Guadix, E.M. and Guadix, A. 2010. Optimal operation of a protein hydrolysis reactor with enzyme recycle. *J. Food Eng.* 97 : 24–30.
- Pritchard, M., Howell, J.A. and Field, R.W. 1995. The ultrafiltration of viscous fluids. *J. Membr. Sci.* 102 : 223-235.
- Qu, W., Ma, H., Zhao, W. and Pan, Z. 2013. ACE-inhibitory peptides production from defatted wheat germ protein by continuous coupling of enzymatic hydrolysis and membrane separation: Modeling and experimental studies. *Chem. Eng. J.* 226 : 139–145.
- Raghavan, S. and Kristinsson, H. G. 2009. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. *Food Chem.* 117 : 582-588.
- Raghavan, S. and Kristinsson, H.G. 2008. Antioxidative efficacy of alkali-treated tilapia protein hydrolysates: a comparative study of five enzymes. *J. Agric. Food Chem.* 56 : 1434-1441.
- Rao, M.A., Acree, T.E., Cooley, H.J. and Enis, R.W. 1987. Clarification of apple juice by hollow fiber ultrafiltration: fluxes and retention of odor-active volatiles. *J. Food Sci.*

52 : 375–377.

- Razavi, M.A., Mortazavi, A. and Mousavi, M. 2004. Application of neural networks for crossflow milk ultrafiltration simulation. *Int. Dairy J.* 14 : 69–80.
- Rios, G.M., Belleville, M.P., Paolucci, D. and Sanchez, J. 2004. Progress in enzymatic membrane reactors – a review. *J. Memb. Sci.* 242 : 189–196.
- Ronco, C., Bellomo, R., John, A. and Kellum, M.D. 2008. *Critical Care Nephrology*. Saunders Elsevier. Philadelphia. PA.
- She, Q., Tang, C.Y., Wang, Y.N., and Zhang, Z. 2009. The role of hydrodynamic conditions and solution chemistry on protein fouling during ultrafiltration. *Desalination*. 249 : 1079–1087.
- Silverman, G.A., Whisstock, J.C., Bottomley, S.P., Huntington, J.A., Kaiserman, D., Luke, C.F., Pak, S.C., Reichhart, J.M. and Bird, P.I. 2010. Surpins flex their muscle I: putting the clamps on proteolysis in diverse biological system. *J. Biol. Chem.* 285 : 24299–24305.
- Smith, S.R. and Cui, Z.F. 2004. Gas-slug enhancement hollow fibre ultrafiltration: an experimental study. *J. Membr. Sci.* 242 : 117–128.
- Thomas, C.R. and Geer, D. 2010. Review: effects of shear on proteins in solution. *Biotech. Letters*. 33 : 443-456.
- Vadi, P.K. and Rizvi, S.S.H. 2001. Experimental evaluation of a uniform transmembrane pressure crossflow microfiltration unit for the concentration of micellar casein from skim milk. *J. Membr. Sci.* 189 : 69–82.
- Vela, M.C.V., Blanco S.A, García, J.L. and Rodríguez, E.B. 2009. Analysis of membrane pore blocking models to crossflow ultrafiltration in the ultrafiltration of PEG. *Chem. Eng. J.* 149 : 232-241.

- Viadero, R.C. 1997. Effects of membrane rotation and transmembrane pressure on the high- shear rotary ultrafiltration of an oily wastewater. PhD Thesis in Civil and Environmental Engineering. West Virginia University.
- 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., Wang, J., Lv, Z., Liu, Y. and Lu, F. 2013. Preparing oligopeptides from broken rice protein by ultrafiltration-coupled enzymatic hydrolysis. *Eur. Food Res. Technol.* 236 : 419-424.
- Wang, H.L. and Hesseltince, W. 1965. Studies on the extracellular proteolytic enzymes of *Rhizopus oligosporus*. *Can. J. Microbiol.* 11: 727-732.
- Ward, W. W. and Swiatek, G. 2009. Protein purification. *Curr. Anal. Chem.* 5 : 85-105.
- 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.
- Wu, S., Feng, X., Lan, X., Xu, Y. and Liao, D. 2015. Purification and identification of Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) inhibitory peptide from lizard fish (*Saurida elongata*) hydrolysate. *J. Funct. foods.* 13 : 259-299.
- Yang, W., Cicek, N. and Ilg, J. 2006. State-of-the-art of membrane bioreactors: worldwide research and commercial applications in North America. *J. Membr. Sci.* 207 : 201–211.
- Yan-Jun, Z, Kai-Fen, W.U., Zheng-Jun, W.A.N.G., Liang, Z.H.A.O. and Shu-Shen, L.I. 2000. Fouling and cleaning of membrane-a literature review. *J. Environ. Sci.* 121 : 241-251.

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.