บทที่ 2
การศึกษาน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิและการเก็บเกี่ยวโปรตีนโดยการกรองด้วยเมมเบรน

บทนำต้นเรื่อง

การล้างเนื้อปลาบดเป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญในกระบวนการผลิตซูริมิเพื่อกำจัดโปรตีนที่ละลายน้ำ และองค์ประกอบที่ไม่ต้องการออกไป เช่น เลือด ไขมัน รวมทั้งเอนไซม์ มักทำการล้างหลายครั้งโดยแต่ละครั้งใช้ปริมาณน้ำ 5-10 เท่าของเนื้อปลาบด (Suzuki, 1981 อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2536) ทำให้มีปริมาณน้ำทิ้งเป็นจำนวนมากประมาณ 29 ลิตรต่อการผลิตซูริมิ 1 กิโลกรัม (Lin *et al.*, 1995) และในน้ำทิ้งยังประกอบด้วยสารอินทรีย์ โดยเฉพาะโปรตีนที่ส่งผลต่อสิ่งแวดล้อม ทำให้โรงงานผลิตซูริมิต้องเสียค่าใช้จ่ายเป็นจำนวนมากในการบำบัดน้ำเสีย (Benjakul *et al.*, 1996) ดังนั้นการเก็บเกี่ยวโปรตีนจากน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตซูริมิจึงมีผลดีเกิดขึ้นหลายด้าน เช่น ช่วยเพิ่มคุณค่าให้น้ำทิ้ง ลดต้นทุนในการบำบัดน้ำเสีย และน้ำหลังจากการเก็บเกี่ยวโปรตีนแล้วยังสามารถนำไปบำบัดแล้วส่งกลับไปใช้ใหม่ในกระบวนการผลิตได้ทำให้ลดต้นทุนในการผลิต

เทคโนโลยีการกรองเป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความนิยมมากสำหรับการเพิ่มความเข้มข้น การแยกส่วน และการทำสารละลายให้บริสุทธิ์ มีการประยุกต์ใช้ในการเก็บเกี่ยวโปรตีนจากโรงงานอาหารทะเลอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้พลังงานน้อยสามารถแยกสารละลายโดยไม่จำเป็นต้องใช้ความร้อนและสารเคมี (Afonso and Borquez, 2002) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการผ่านการกรองด้วยเมมเบรนมี 2 ส่วน คือ ส่วนที่ถูกกักกันไว้ที่ผิวหน้าเมมเบรนเรียกว่า รีเทนเทท (Retentate) หรือสารละลายเข้มข้น (Concentrate) และส่วนที่ผ่านเมมเบรนได้เรียกว่า เพอมิเอท (Permeate) จากการวิจัยพบว่าน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิหลังผ่านการกรองด้วยเมมเบรนสามารถเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนในส่วนรีเทนเททได้โดยใช้ไมโครฟิลเตรชันกักโปรตีนไมโอไฟบริลล่าร์ ซึ่งสามารถนำกลับไปผสมในกระบวนการผลิตซูริมิได้และยังช่วยลดค่าซีโอดี (COD) ในส่วนเพอมิเอทได้ถึง 89-94% (Lin *et al.*, 1995) ทำให้น้ำทิ้งมีคุณภาพดีขึ้นจนสามารถนำกลับไปใช้ซ้ำในกระบวนการผลิตได้อีก (Afonso and Borquez, 2004)

การศึกษาครั้งนี้จะใช้กระบวนการกรองด้วยอัลตราฟิลเตรชันและไมโครฟิลเตรชันเก็บเกี่ยวโปรตีนในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิ โดยศึกษาถึงปริมาณและคุณภาพของน้ำทิ้งที่ปล่อยออกมาในแต่ละจุด และขนาดรูพรุนของเมมเบรนที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวโปรตีน

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาขั้นตอนที่ก่อให้เกิดน้ำทิ้งและคุณภาพน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิ
2. ศึกษาขนาดรูพรุนของเมมเบรนที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวและแยกโปรตีนที่ละลายน้ำโดยการกรองแบบอัลตราฟิลเตรชันและไมโครฟิลเตรชัน

ตรวจเอกสาร

น้ำทิ้งที่ปล่อยออกมาจากกระบวนการผลิตซูริมิมีด้วยกันหลายจุดโดยแต่ละจุดมีองค์ประกอบแตกต่างกัน ตามรายงานของ Lin และคณะ (1995) กล่าวว่า น้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 1 มีโปรตีนทั้งหมด (Total protein) สูงที่สุด จากการวิเคราะห์โดยเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีส (วิธีการ SDS-PAGE) พบโปรตีนหลายแถบในช่วง 29-49 kDa คือโปรตีนซาร์โคพลาสมิก ส่วนโปรตีนขนาด 205 kDa คือโปรตีนไมโอไฟบริลล่าร์ มีปริมาณเล็กน้อยแต่จะพบมากขึ้นในน้ำล้างครั้งหลัง โปรตีนที่สูญเสียออกมากับน้ำทิ้งสามารถเก็บเกี่ยวได้โดยใช้ไมโครฟิลเตรชันและอัลตราฟิลเตรชัน ผลจากการใช้ไมโครฟิลเตรชันเก็บเกี่ยวโปรตีนในน้ำจากการบีบน้ำส่วนเกินออกเพื่อนำกลับไปผสมในกระบวนการผลิตซูริมิปริมาณ 10% ปรากฏว่าไม่ทำให้คุณภาพของซูริมิเปลี่ยนแปลงจากเดิม ส่วนการใช้อัลตราฟิลเตรชันเก็บเกี่ยวโปรตีนจากน้ำทิ้งจุดต่างๆ อาจทำให้ได้โปรตีนเข้มข้นที่มีสีเข้มและกลิ่นแรงได้ ถึงแม้ว่าไม่เหมาะสำหรับนำกลับไปผสมในซูริมิแต่สามารถนำไปผลิตเป็นอาหารสัตว์ได้ ส่วนน้ำทิ้งหลังจากการเก็บเกี่ยวโปรตีนแล้วมีค่าซีโอดีลดลงถึง 89-94%

Benjakul และคณะ (1996) พบว่าในน้ำล้างเนื้อปลาบด (ใช้ปลาแปซิฟิคไวท์ติงเป็นวัตถุดิบ) มีโปรติเอสชนิดคาเธปซินแอล จากการวิจัยของ Mireles Dewitt และ Morrissey (2001a) ซึ่งทำการเก็บเกี่ยวโปรติเอสโดยใช้ความร้อน 60 องศาเซลเซียส และปรับพีเอชเท่ากับ 4 ในการกำจัดโปรตีนชนิดอื่นที่ไม่ต้องการออก จากนั้นนำไปผ่านเครื่องอัลตราฟิลเตรชันเพื่อทำให้โปรติเอสเข้มข้นขึ้น ได้ผลคือการใช้เมมเบรนขนาด 50 kDa สามารถเก็บเกี่ยวโปรติเอสได้ 80% นอกจากนี้ Mireles Dewitt และ Morrissey (2001b) ได้นำวิธีการเก็บเกี่ยวโปรติเอสมาประยุกต์ใช้ในระดับโรงงานต้นแบบทำให้ได้โปรติเอสที่บริสุทธิ์มากขึ้น 100 เท่า เก็บเกี่ยวจากน้ำทิ้งได้ 80% และมีความคงตัว 9 สัปดาห์ในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส

วิธีการที่ใช้เก็บเกี่ยวโปรตีนมีได้หลายวิธี สำหรับการกรองด้วยเมมเบรนเป็นวิธีที่มีข้อได้เปรียบกว่าวิธีอื่น คือ สามารถใช้ร่วมกับวิธีการอื่นและทำได้ในตัวอย่างปริมาณมาก นอกจากจะเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนแล้วส่วนเพอมิเอทยังสามารถนำกลับไปใช้ใหม่ได้หรือ

ปล่อยทิ้งโดยไม่ต้องผ่านการบำบัดอีก ที่สำคัญคือเหมาะกับการเก็บเกี่ยวโปรตีนเพราะไม่ต้องใช้สารเคมีและความร้อนโปรตีนจึงไม่เสียสภาพ (Mulder, 1993; Ghosh and Cui, 2000b; Afonso and Borquez, 2002, 2004)

ระบบที่ใช้สำหรับเก็บเกี่ยวโปรตีนคืออัลตราฟิลเตรชันและไมโครฟิลเตรชันอาศัยหลักการทำงานของเมมเบรนในการเลือกผ่านสาร (Bodalo *et al.*, 2001) โดยวัดอัตราการไหลของสารละลายผ่านเมมเบรนในรูปของฟลักซ์ (Flux, *J*) คือปริมาตรของเพอมิเอทต่อพื้นที่เมมเบรนต่อเวลา มีความดันเป็นแรงขับทำให้สารละลายผ่านเมมเบรนได้โดยนิยมเขียนในรูปของ Transmembrane pressure (TMP) คำนวณจากความดันเฉลี่ยของสารป้อนที่เข้าสู่เมมเบรนและความดันของส่วนรีเทนเททที่ออกจากเมมเบรน (Howell, 1993; Lui and Wu; 1998) หรือดังสมการ

$$\text{TMP} = \frac{(\text{P in} + \text{P out})}{2} - \text{P permeate}$$

อย่างไรก็ตามขณะดำเนินงานมักเกิดความต้านทานของเมมเบรนเนื่องจากฟาวลิ่งส่งผลให้ค่าฟลักซ์ลดลงและเกิดการอุดตันในรูพรุนของเมมเบรนจากความเข้มข้นของรีเทนเททที่เพิ่มขึ้น (le Roux and Belyea, 1999) นับเป็นปัญหาที่จำกัดการใช้งานของอัลตราฟิลเตรชันและไมโครฟิลเตรชันซึ่งเป็นผลมาจากการเกิด 2 ปรากฏการณ์ (Donnelly *et al.*, 1998) คือ

(1) คอนเซนเตรชันโพลาไรเซชัน (Concentration polarization, *CP*) เกิดชั้นเคกสะสมบนผิวเมมเบรนเป็นสาเหตุให้ฟลักซ์มีค่าลดลง แต่สามารถผันกลับได้โดยเพิ่มอัตราการไหล

(2) ฟาวลิ่ง (Fouling) เมื่อชั้นเคกรวมตัวกันเกิดสะสมเป็นตะกอนที่รูพรุนของเมมเบรนเป็นสาเหตุให้ค่าฟลักซ์ลดลงอย่างมากและการกักกันสารเปลี่ยนแปลง การเกิดฟาวลิ่งจะเด่นชัดหลังจากเกิดคอนเซนเตรชันโพลาไรเซชันแล้ว

Davis (1992) แบ่งการเกิดฟาวลิ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

(1) ฟาวลิ่งภายในรูพรุน (Internal membrane fouling) คือ การอุดตันที่ติดแน่นกับเมมเบรนภายในโครงสร้างของรูพรุนหรือติดแน่นกับเมมเบรนโดยตรงที่ผิวเมมเบรนเนื่องจากการดูดซับ การตกตะกอน การอุดในรูพรุน เป็นต้น

(2) ฟาวลิ่งที่ผิวหน้าเมมเบรน (External cake fouling) คือ การก่อตัวเป็นชั้นเคกบนผิวเมมเบรนเกิดเนื่องจากคอนเซนเตรชันโพลาไรเซชันตั้งแต่เริ่มดำเนินการกรอง

Afonso และ Borquez (2004) เสนอวิธีที่สามารถทำได้ในการช่วยควบคุมการเกิดฟาวลิ่งคือ การเลือกเมมเบรนที่เหมาะสมกับสารตัวอย่าง และการบำบัดสารละลายเบื้องต้น (Pre-treatment) ก่อนนำไปกรองด้วยเมมเบรน ตัวอย่างเช่น Chan และคณะ (2004) ศึกษาการเกิดฟาวลิ่งระหว่าง

เมมเบรนประเภทชอบน้ำ (Hydrophillic membrane) จากวัสดุรีเจนเนอร์เรทเซลลูโลส (Regenerated cellulose) และเมมเบรนประเภทไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic membrane) จากวัสดุโพลีซัลโฟน (Polysulfone) ปรากฏว่าโปรตีนเกิดฟาวลิ่งบนวัสดุโพลีซัลโฟนมากกว่าวัสดุรีเจนเนอร์เรทเซลลูโลส เช่นเดียวกับที่ Matthiasson (1983 อ้างโดย Huisman *et al.*, 2000) กล่าวว่าเมมเบรนที่ไม่ชอบน้ำ เกิดฟาวลิ่งได้เร็วกว่าเมมเบรนที่ชอบน้ำ และ Mireles Dewitt และ Morrissey (2001b) ศึกษาผลของการบำบัดน้ำเบื้องต้นก่อนนำไปกรองด้วยเมมเบรนเพื่อช่วยลดการเกิดฟาวลิ่งโดยการเก็บเกี่ยวโปรติเอสในน้ำล้างเนื้อปลาบดเปรียบเทียบระหว่างการบำบัดน้ำล้างเนื้อปลาบดด้วยกรดและความร้อนก่อนนำไปกรองผ่านอัลตราฟิลเตรชันและน้ำล้างเนื้อปลาบดที่ไม่ผ่านการบำบัดเบื้องต้น พบว่าน้ำล้างเนื้อปลาบดที่ไม่ผ่านการบำบัดมีค่าฟลักซ์ต่ำกว่าครึ่งของน้ำล้างเนื้อปลาบดที่ผ่านการบำบัด นอกจากนี้ Hindi (1986 อ้างโดย Afonso and Borquez, 2002) ใช้การควบคุมอุณหภูมิขณะดำเนินการกรองด้วยเมมเบรน ทำให้ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และช่วยป้องกันการเสียสภาพของโปรตีนถือว่าช่วยลดการเกิดฟาวลิ่งได้อีกทางหนึ่ง

หลังจากใช้งานแล้ววิธีการล้างเมมเบรนเป็นการดำเนินการเพื่อแก้ปัญหาการเกิดฟาวลิ่งโดยต้องเลือกสารเคมีที่ใช้ในการล้างให้เหมาะสมกับชนิดสารอุดตันและวัสดุที่ใช้ผลิตเมมเบรน (Lee *et al.*, 2001) เช่นจากงานวิจัยของ Alvise และคณะ (2000) ล้างเมมเบรนเพื่อให้ค่าฟลักซ์กลับคืนมาหลังจากกรองเอนไซม์จากโปรตีนอัลฟัลฟ่า (Alfalfa protein) ผ่านอัลตราฟิลเตรชันแล้วโดยใช้กรดไนตริก (ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (ความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที) และล้างด้วยน้ำกลั่นจนพีเอชเป็นกลาง

ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับการการดำเนินงานโดยการกรองด้วยเมมเบรนของ Mitaya (1989 อ้างโดย Afonso and Borquez, 2002) เพื่อเก็บเกี่ยวโปรตีนที่ละลายน้ำในน้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 1 จากกระบวนการผลิตซูริมิ โดยทำการบำบัดน้ำล้างเนื้อปลาบดเบื้องต้นด้วยการหมุนเหวี่ยงเพื่อกำจัดไขมันและสารแขวนลอยก่อนใช้เมมเบรนที่ผลิตจากเซลลูโลสอะซิเตท (Cellulose acetate) แบบท่อในการทำให้โปรตีนเข้มข้นและควบคุมอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียส พบว่าค่าฟลักซ์ลดลงเนื่องจากเกิดฟาวลิ่ง และทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้นจาก 4.9 กรัมต่อลิตร เป็น 55 กรัมต่อลิตร ส่วนเพอมิเอทเหลือโปรตีนเพียง 0.42 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ช่วยลดค่าซีโอดีลงได้ หลังจากดำเนินงานเสร็จได้ใช้สารเคมีผสม (0.4% DBS-Na, NTA-3Na และCMC) ในการล้างเมมเบรนเพื่อกำจัดสารอุดตันและ ให้ค่าฟลักซ์กลับคืน

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. วัสดุ

1.1 น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิ

น้ำทิ้งที่ใช้ในการทดลอง คือ น้ำทิ้งในกระบวนการผลิตซูริมิโดยใช้ปลาตาหวาน (Bigeye snapper) เป็นวัตถุดิบ ได้แก่ น้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 1, 2, 3 และน้ำจากการบีบน้ำส่วนเกินออกด้วยเครื่องสกรูเพรส (Screw press) ที่เก็บจากโรงงานอุตสาหกรรมด้วยขั้นตอนการผลิตดังแสดงในภาพที่ 2-1

1.2 สารเคมี

สารเคมีทั้งหมดที่ใช้ในการวัดปริมาณและขนาดโมเลกุลของโปรตีน ปริมาณเกลือ บีโอดี (Biochemical oxygen demand, BOD) ซีโอดี (Chemical oxygen demand, COD) และ สารละลายสำหรับล้างเมมเบรน เป็นสารเคมีระดับคุณภาพวิเคราะห์ (Analytical grade) รายละเอียดแสดงในภาคผนวก 3-8

2. อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยประกอบด้วยอุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างน้ำ อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์ทางเคมี รวมทั้งอุปกรณ์ที่ใช้เป็นแบบทดลองในห้องปฏิบัติการ มีรายละเอียดดังนี้

2.1 อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างน้ำ

2.1.1 ขวดพลาสติกขนาด 1 ลิตร

2.1.2 ขวดพลาสติกขนาด 5 ลิตร

2.1.3 ถังโฟมใส่น้ำแข็งสำหรับแช่ตัวอย่าง

2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ทดลองในห้องปฏิบัติการ

2.2.1 เครื่องกรองแบบลดความดัน

2.2.2 กระดาษกรองเบอร์ 1 และ 4 ยี่ห้อ Whatman

2.2.3 เครื่องมือวัดอุณหภูมิ (Thermometer)

2.2.4 เครื่องมือวิเคราะห์อิเล็กโตรโฟรีซีส (Electrophoresis apparatus ยี่ห้อ Bio-Rad รุ่น Mini-Protein II ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.2.4 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Hitachi รุ่น U-2000 ประเทศญี่ปุ่น

2.2.6 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ยี่ห้อ Schott รุ่น GC825 ประเทศเยอรมัน

2.2.7 เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP2100s ประเทศเยอรมัน

2.2.8 เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP210s ประเทศเยอรมัน

2.2.9 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Low temperature incubator) ยี่ห้อ Roveo รุ่น BOD30

2.2.10 ตู้อบความชื้น (Oven) ยี่ห้อ Memmert รุ่น ULM500 ประเทศเยอรมัน

2.2.11 เมมเบรนชนิดรีเจนเนอร์เรทเซลลูโลส (Rgenerated cellulose) ขนาดรูพรุน 100 และ 300 kDa ยี่ห้อ Millipore

2.2.12 ระบบการกรองแบบไหลขวาง (Cross flow unit) ยี่ห้อ Millipore

2.2.13 ปั๊ม ยี่ห้อ Millipore รุ่น XX814V230

2.2.14 เมมบรนชนิดเซลลูโลสอะซิเตท (Cellulose acetate) ขนาดรูพรุน 0.22 0.45 และ 1 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Millipore

2.2.15 ระบบการกรองแบบปิดตาย (Dead end unit)

3. วิธีการทดลอง

3.1 การเก็บตัวอย่าง

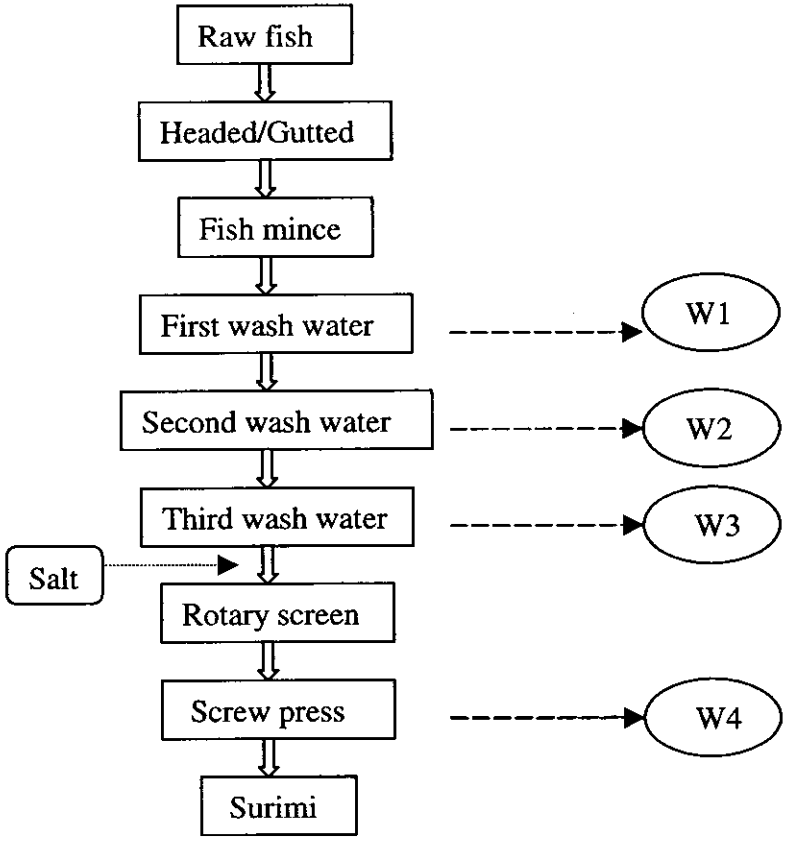
เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิ 4 จุด ได้แก่ น้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 1 (Waste1), น้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 2 (Waste2), น้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 3 (Waste3) และน้ำจากการบีบน้ำส่วนเกินออกด้วยเครื่องสกรูเพรส (Screw press) (Waste 4) จากโรงงาน ดังแสดงในภาพที่ 2-1 รักษาอุณหภูมิน้ำประมาณ 5 องศาเซลเซียสโดยเก็บในน้ำแข็งตลอดการเดินทางเมื่อถึงห้องปฏิบัติการเก็บรักษาน้ำตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งน้ำตัวอย่างที่เก็บแต่ละครั้งใช้ทำการทดลองภายใน 24 ชั่วโมง

3.2 การเตรียมตัวอย่าง

กรองน้ำทิ้งผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 เพื่อกำจัดไขมันและสารแขวนลอย (Huidobro *et al.*, 1998) โดยควบคุมอุณหภูมิตลอดการกรองประมาณ 5 องศาเซลเซียส (Lin and Park, 1996) นำน้ำทิ้งที่กรองแล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3 การศึกษาลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิ

นำน้ำทิ้งที่เตรียมได้วัดพีเอช, หาปริมาณของแข็งทั้งหมด, บีโอดี (BOD) และซีโอดี (COD) โดยวิธีการของ APHA, AWWA and WPCF (1985), หาปริมาณเกลือโดยวิธีของ AOAC (1990) และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำด้วยวิธีไบยูเรท (Robyt, 1987) ซึ่งใช้สารละลายโบวินซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin, BSA) เป็นโปรตีนมาตราฐาน (ภาคผนวก 1-6 ตามลำดับ)



ภาพที่ 2-1 แผนผังกระบวนการผลิตซูริมิและน้ำทิ้งที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิต

Figure 2-1 Surimi process and wastewater diagram.

3.4 การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่มีในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิ โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส (SDS-PAGE)

นำน้ำทิ้งที่ผ่านการเตรียมขั้นต้นมาตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยดัดแปลงวิธีการของ Laemmli (1970) (ภาคผนวก 7) ใช้ Stacking gel 3% และ Separating gel ลำดับความเข้มข้น (Gradient) 4-20% ย้อมแถบโปรตีนที่ได้บนแผ่นเจลด้วย Coomassie brilliant blue R-250 เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่มีอยู่ในน้ำทิ้งเทียบกับโปรตีนมาตรฐานชุด Broad range protein molecular weight markers ของบริษัท Promega ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 10, 15, 25, 35, 50, 75, 100, 150 และ 225 kDa หาค่าระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีนมาตรฐานต่อระยะทางการเคลื่อนที่ของ Tracking dye ที่ย้อมด้วยสีโบรโมฟีนอลบลู (Bromophenol blue) แล้วนำมาคำนวณหาการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Relative mobility, R_f) ซึ่งคำนวณได้จากสูตร (อาภัสสรา ชมิดท์, 2537)

$$\text{ค่า Rf} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนจากจุดเริ่มต้น}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของ Tracking dye จากจุดเริ่มต้น}}$$

จากนั้นจึงนำมาเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า R_f กับค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานทั้ง 9 ชนิด นำค่า R_f ของโปรตีนตัวอย่างที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (แสดงในภาพภาคผนวกที่ 2) เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในน้ำทิ้ง

3.5 ศึกษาการเก็บเกี่ยวโปรตีนในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิโดยวิธีการกรองด้วยเมมเบรน

เลือกใช้น้ำทิ้งจากจุดที่มีปริมาณโปรตีนสูงเป็นตัวอย่างในการศึกษา ในที่นี้คือน้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 1 (Waste 1) และน้ำจากการบีบน้ำส่วนเกินออกด้วยเครื่องสกรูเพรส (Waste 4) เพื่อนำไปศึกษาการเก็บเกี่ยวโปรตีนกลับโดยใช้เมมเบรนขนาดรูพรุนต่างๆ

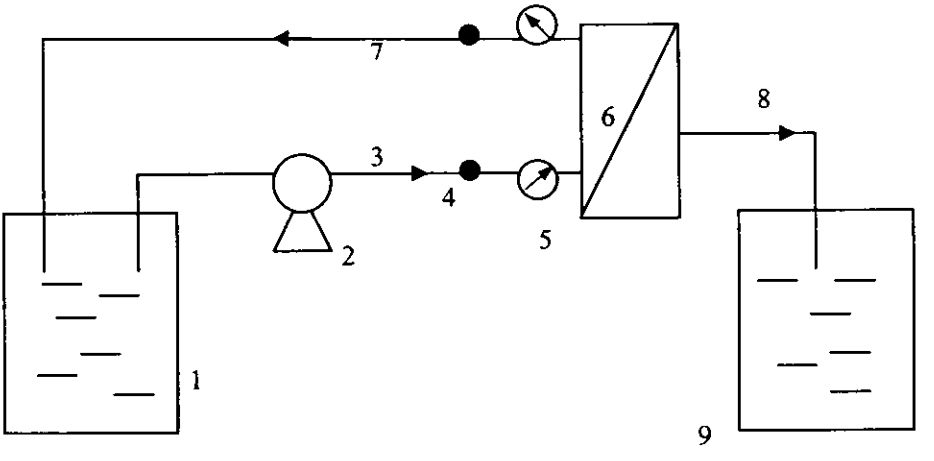
3.5.1 การกรองด้วยระบบอัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration)

การกรองใช้ระบบไหลขวาง (Cross-flow) โดยเมมเบรนที่ใช้เป็นประเภทชอบน้ำ (Hydrophillic membrane) ผลิตจากรีเจเนอร์เรทเซลลูโลส (Regenerated cellulose) มีขนาดพื้นที่ผิว 0.5 ตารางเมตร เปรียบเทียบระหว่างเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 100 และ 300 kDa ทำการทดลองที่สภาวะคงที่ อุณหภูมิ 8±2 องศาเซลเซียส Transmembrane pressure (TMP) เท่ากับ 2.5 บาร์ สำหรับการทำให้เข้มข้นสารละลายด้านรีเทนเททจะถูกป้อนกลับเข้าสู่ถังป้อนเพื่อให้กลับมาผ่านเมมเบรนอีก (Shiau and Chai, 1999) โดยทำการทดลองกรองน้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 1 (Waste 1)

และน้ำจากการบีบน้ำส่วนเกินออกด้วยเครื่องสกรูเพรส (Waste 4) แผนผังการจัดอุปกรณ์แสดงดังภาพที่ 2-2

วัดค่าฟลักซ์ (Flux, J) โดยล้างเมมเบรนด้วยน้ำสะอาดจนค่าพีเอชเป็นกลางและวัดฟลักซ์น้ำดีก่อน จากนั้นจึงทำการทดลองโดยเติมสารป้อน (Waste 1/Waste 4) 5000 มิลลิลิตร วัดอัตราการไหลของเพอมิเอททุกๆ 60 วินาที หยุดทำการทดลองเมื่อสารละลายในถังป้อนลดลงเหลือ 500 มิลลิลิตร ซึ่งทำให้ค่า Concentration factor (CF) เท่ากับ 10 นำส่วนรีเทนเททและเพอมิเอทวิเคราะห์หาซีโอดี ปริมาณโปรตีนและค่าฟลักซ์ คำนวณได้ดังสมการ

$$J\,(\mathrm{m/s}) = \frac{\text{อัตราการไหลของเพอมิเอท } (\mathrm{m^3/s})}{\text{พื้นที่ผิวของเมมเบรน } (\mathrm{m^2})}$$



(1) Reservoir, (2) Pump, (3) Feed inlet, (4) Valve, (5) Pressure gauges, (6) Plate and frame membrane, (7) Retentate outlet, (8) Permeate outlet and (9) Permeate container

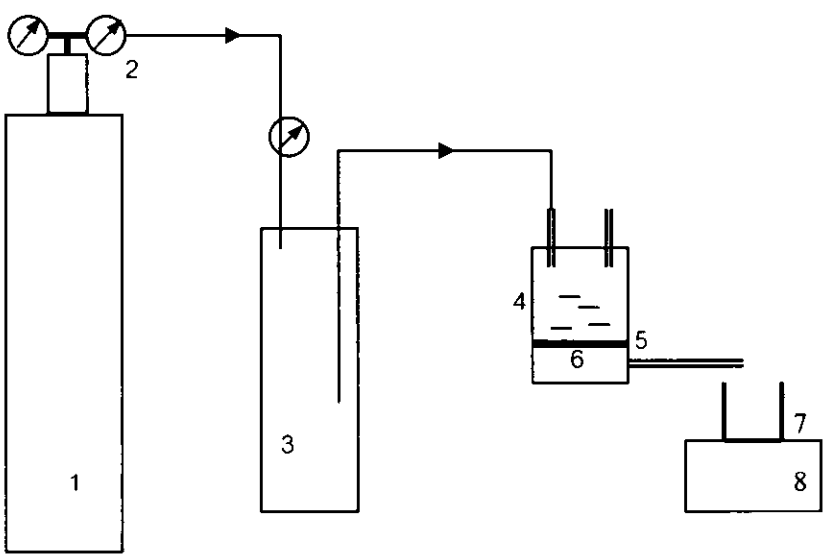
ภาพที่ 2-2 แผนผังกระบวนการกรองด้วยระบบอัลตราฟิลเตรชันชนิดไหลขวาง

Figure 2-2 Flow diagram of cross-flow ultrafiltration set-up.

3.5.2 การกรองด้วยระบบไมโครฟิลเตรชัน (Microfiltration)

การกรองใช้ระบบปิดตาย (Dead-end) โดยเมมเบรนที่ใช้เป็นประเภทชอบน้ำ (Hydrophillic membrane) ผลิตจากเซลลูโลสอะซิเตท (Cellulose acetate) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร เปรียบเทียบระหว่างเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 0.22 0.45 และ 1 ไมโครเมตร ทำการทดลองที่สภาวะคงที่ อุณหภูมิ 8±2 องศาเซลเซียส Transmembrane pressure (TMP) เท่ากับ 2.0 บาร์ ทำการทดลองกรองน้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 1 (Waste 1) และน้ำจากการบีบน้ำส่วนเกินออกด้วยเครื่องสกรูเพรส (Waste 4) จัดอุปกรณ์ดังแผนผังภาพที่ 2-3

วัดค่าฟลักซ์ (Flux, J) โดยเติมสารป้อน (Waste 1/Waste 4) 50 มิลลิลิตร ลงในถังป้อน ปรับสภาวะการทำงานให้คงที่ วัดอัตราการไหลของเพอมิเอทที่ 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240 และ 300 วินาที และกรองจนกระทั่งค่าฟลักซ์คงที่จึงหยุดทำการทดลอง ซึ่งทำให้ค่า Concentration factor (CF) ของ Waste 1 ที่กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.22 0.45 และ 1.0 ไมโครเมตร เท่ากับ 1.20 1.52 และ 1.54 ตามลำดับ ส่วน CF ของ Waste 4 ที่กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.22 0.45 และ 1.0 ไมโครเมตร เท่ากับ 1.10 1.30 และ 1.42 ตามลำดับ นำส่วนรีเทนเททและเพอมิเอท วิเคราะห์หาซีโอดี ปริมาณโปรตีนและน้ำหนักโมเลกุลโปรตีน



(1) Gas N_2, (2) Pressure gauges, (3) Feed chamber, (4) Feed, (5) Membrane, (6) Permeate, (7) Permeate container and (8) Measure

ภาพที่ 2-3 แผนผังกระบวนการกรองด้วยระบบไมโครฟิลเตรชันชนิดปิดตาย

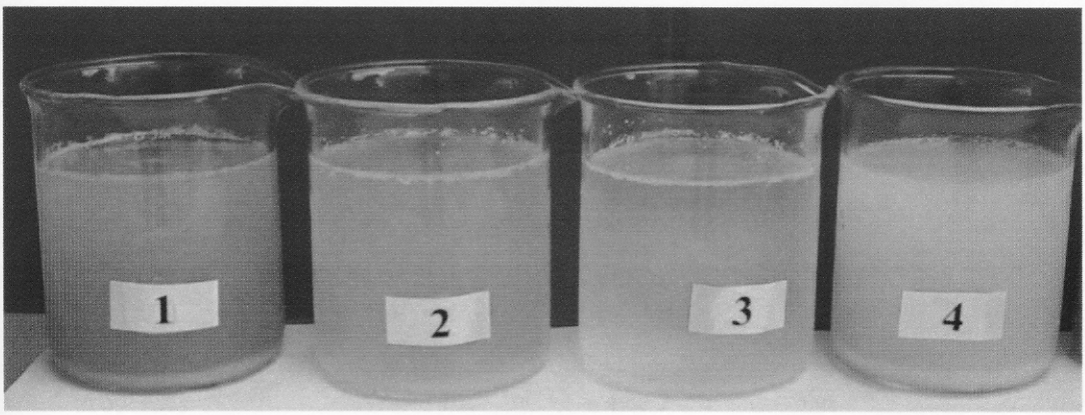
Figure 2-3 Flow diagram of dead-end microfiltration set-up.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ลักษณะและองค์ประกอบของน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตซูริมิ

การศึกษาพบว่าแหล่งที่มาของน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิ ได้แก่ น้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 1, 2, 3 และน้ำจากการบีบน้ำส่วนเกินออกด้วยเครื่องสกรูเพรส ลักษณะน้ำทิ้งจากจุดต่างๆ มีสี เศษเนื้อปลา ไขมัน เลือด แตกต่างกันดังภาพที่ 2-4

ลักษณะสีของน้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 1 มีสีเข้มมากกว่าน้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 2 และ 3 โดย Lee (1986) กล่าวว่าน้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 1 มีสิ่งปนเปื้อนในปริมาณสูงได้แก่ เลือด เอนไซม์ ไขมัน เป็นต้น จึงมีสีเข้มส่วนในน้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 2 และ 3 จะมีลักษณะใสขึ้นเป็นลำดับ



ภาพที่ 2-4 น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิ : (1) น้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 1, (2) น้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 2, (3) น้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 3 และ (4) น้ำจากการบีบน้ำส่วนเกินออกด้วยเครื่องสกรูเพรส

Figure 2-4 Wastewater discharged from surimi production : (1) First wash water, (2) Second wash water, (3) Third wash water and (4) Dewatering from screw press.

องค์ประกอบทางเคมีและทางกายภาพของน้ำทิ้งจากจุดต่างๆ แสดงในตารางที่ 2-1 โดยค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.8-7.1 และตรวจไม่พบเกลือในน้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 1-3 (Waste 1 – Waste 3) ส่วนน้ำจากการบีบน้ำส่วนเกินออก (Waste 4) มีเกลือ 0.34% ซึ่งค่าพีเอชและปริมาณเกลือสอดคล้องกับที่ สุทธวัฒน์ เบญจกุล (2536) กล่าวว่า น้ำล้างเนื้อปลาบดควรมีค่าพีเอชใกล้เคียงกับพีเอชของเนื้อปลา คือ 6.5-7.0 และการล้างครั้งสุดท้ายนิยมใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1-0.3% ซึ่งจากการทดลองได้เก็บตัวอย่างน้ำจากการล้างครั้งสุดท้ายก่อนเติมเกลือจึงไม่พบปริมาณเกลือแต่จะพบเกลือในน้ำจากการบีบน้ำส่วนเกินออกเท่านั้น ส่วนปริมาณโปรตีน (Soluble protein) อยู่ในช่วง 0.1-5.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และของแข็งทั้งหมด (Total solid) อยู่ในช่วง 1.1-6.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยพบว่า Waste 4 มีองค์ประกอบของปริมาณโปรตีนและของแข็งทั้งหมด สูงที่สุด ในขณะที่ Waste 3 มีน้อยที่สุด ซึ่ง Waste 1, 2 และ 3 มีแนวโน้มเหมือนในรายงานของ Lin และคณะ (1995) คือในน้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งแรกมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าน้ำล้างครั้งหลัง อย่างไรก็ตามใน Waste 4 มีปริมาณโปรตีนสูงกว่า Waste 1 ซึ่งแตกต่างจากในรายงาน เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ได้กรองน้ำทิ้งจากทุกจุดเพื่อกำจัดสารแขวนลอยและเศษเนื้อปลาบดก่อนนำมาวิเคราะห์ค่าโปรตีนที่วิเคราะห์ได้เป็นค่าของโปรตีนที่ละลายน้ำเท่านั้น ส่วนค่าบีโอดีและซีโอดีพบว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนและของแข็งทั้งหมด

ตารางที่ 2-1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตซูริมิ

Table 2-1 The physical and chemical properties of surimi wastewater in processing line.

Properties	Waste 1	Waste 2	Waste 3	Waste 4
pH	6.87 ± 0.05	7.10 ± 0.04	6.90 ± 0.04	6.81 ± 0.01
Salt (%)	ND	ND	ND	0.34 ± 0.04
Soluble protein (mg/ml)	1.57 ± 0.19	1.03 ± 0.16	0.11 ± 0.03	5.53 ± 0.26
Total solid (mg/L)	4.20 ± 0.35	3.20 ± 0.43	1.14 ± 0.11	6.42 ± 0.24
COD (mg/L)	7400 ± 390.51	6100 ± 476.97	5200 ± 396.86	9600 ± 389.24
BOD (mg/L)	5750 ± 589.49	3650 ± 776.21	3100 ± 854.40	7600 ± 672.68

Waste 1 - Waste 4 : Sources of wastewater as illustrated in Figure 2-1

ND : Not detected

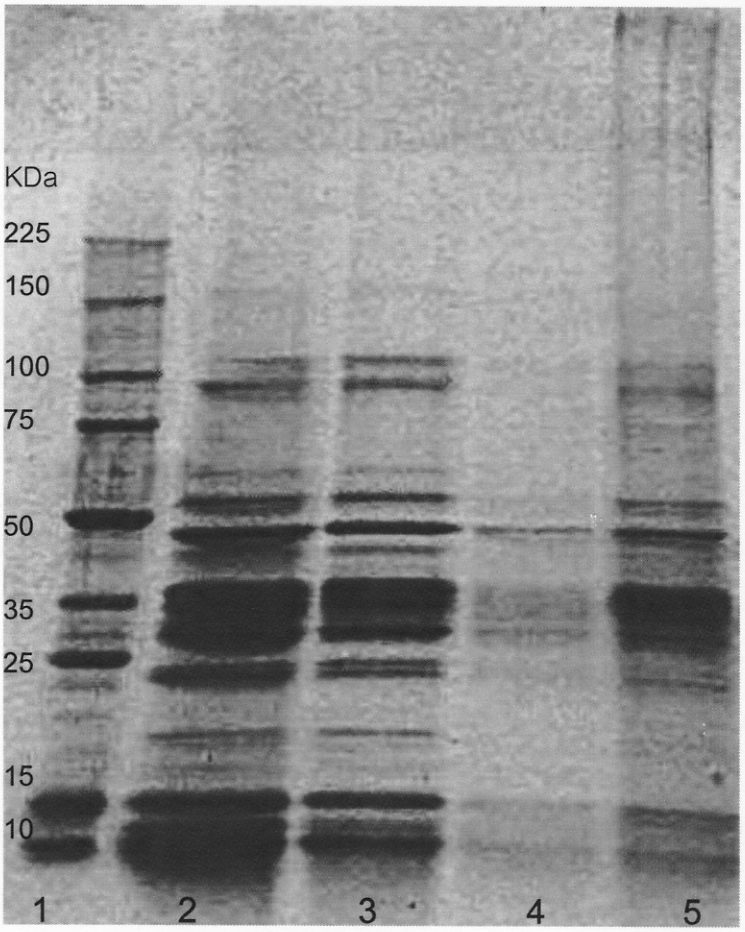
2. น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิ

เมื่อนำน้ำทิ้งจากจุดต่างๆ มาวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ปรากฏแถบโปรตีนเรียงลำดับจากซ้ายไปขวา (ภาพที่ 2-5) แถวที่ 1 คือ สารละลายโปรตีนมาตรฐานชนิด Broad range protein molecular weight markers แถวที่ 2 คือ น้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 1 แถวที่ 3 คือ น้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 2 แถวที่ 4 คือ น้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 3 และแถวที่ 5 คือ น้ำจากการบีบน้ำส่วนเกินออกด้วยเครื่องสกรูเพรส พบว่าในน้ำทิ้งทุกจุดมีแถบโปรตีนรูปแบบเหมือนกันอยู่ในช่วงน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10-60 และ 100-110 kDa ซึ่งคล้ายกับผล SDS-PAGE ของ Huidobro และคณะ (1997) พบว่าในน้ำล้างเนื้อปลาบดที่เตรียมในห้องปฏิบัติการจากปลาซาร์ดีนมีโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 67 kDa โดยส่วนใหญ่เป็นโปรตีนซาร์โคพลาสมิก จากการรายงานของ Lin และคณะ (1995) กล่าวว่ามีโปรตีนซาร์โคพลาสมิกจากปลาแปซิฟิคไวท์ติงที่สูญเสียออกมากับน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 29-45 kDa และพบโปรตีนไมโอไฟบริลล่าร์ ได้แก่ ไมโอซินน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 205 kDa แต่ในการทดลองครั้งนี้ไม่พบแถบโปรตีนขนาด 205 kDa อาจเป็นเพราะในน้ำทิ้งมีเอนไซม์โปรติเอสอยู่ด้วย ซึ่งเอนไซม์สามารถย่อยสลายไมโอซินได้ สอดคล้องกับการทดลองของ Ladrat และคณะ (2003) รายงานว่า Myosin heavy chain จากปลาซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200 kDa สามารถย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอสชนิดคาเธปซินบี (Cathepsin B) ในเวลา 21 ชั่วโมง ได้เป็น 2 ส่วนย่อย คือ 150 และ 140 kDa ส่วนคาเธปซินแอล (Cathepsin L) สามารถย่อยสลายส่วนย่อยของไมโอซินได้อีกภายในเวลา 21 ชั่วโมงเช่นกัน นอกจากนี้โปรตีนซาร์โคพลาสมิกก็ถูกย่อยด้วย ดังนั้นจากภาพที่ 2-5 การที่ SDS-PAGE พบโปรตีนอยู่ในช่วง 10-110 kDa บางส่วนอาจเป็นโปรตีนที่เกิดจากการถูกย่อยสลายจากเอนไซม์ในน้ำทิ้งเองที่ปนอยู่ด้วย

3. การเก็บเกี่ยวโปรตีนในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิโดยวิธีการกรองด้วยเมมเบรน

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและทางกายภาพของน้ำทิ้ง พบว่าน้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 1 (Waste 1) และน้ำจากการบีบน้ำส่วนเกินออกด้วยเครื่องสกรูเพรส (Waste 4) เป็นน้ำทิ้งที่มีปริมาณโปรตีนสูง จึงนำมาศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เมมเบรนขนาดต่างๆ เก็บเกี่ยวโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงประมาณ 10-110 kDa โดยเลือกใช้อัลตราฟิลเตรชัน (UF) ขนาด 100 และ 300 kDa (ประมาณ 0.1 ไมโครเมตร) ที่ TMP เท่ากับ 2.5 บาร์ และไมโครฟิลเตรชัน (MF) ขนาด 1 0.45 และ 0.22 ไมโครเมตร ที่ TMP เท่ากับ 2.0 บาร์ เพื่อทำให้โปรตีนเข้มข้น (Concentration) และ/หรือแยกส่วน (Fractionation) ตามน้ำหนักโมเลกุล โดยเหตุผลที่เลือกเมมเบรนรูพรุนขนาดใหญ่กว่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ต้องการแยกเนื่องจากการเกิดฟาวลิ่ง

ระหว่างการกรองโปรตีนซึ่งถือเป็นปัญหาและอุปสรรคสำคัญต่อระบบการกรองผ่านเมมเบรน ส่งผลให้ค่าฟลักซ์ (*J*) ลดลงและค่าการกักกันเปลี่ยนแปลงไป (Huisman *et al.*, 2000)



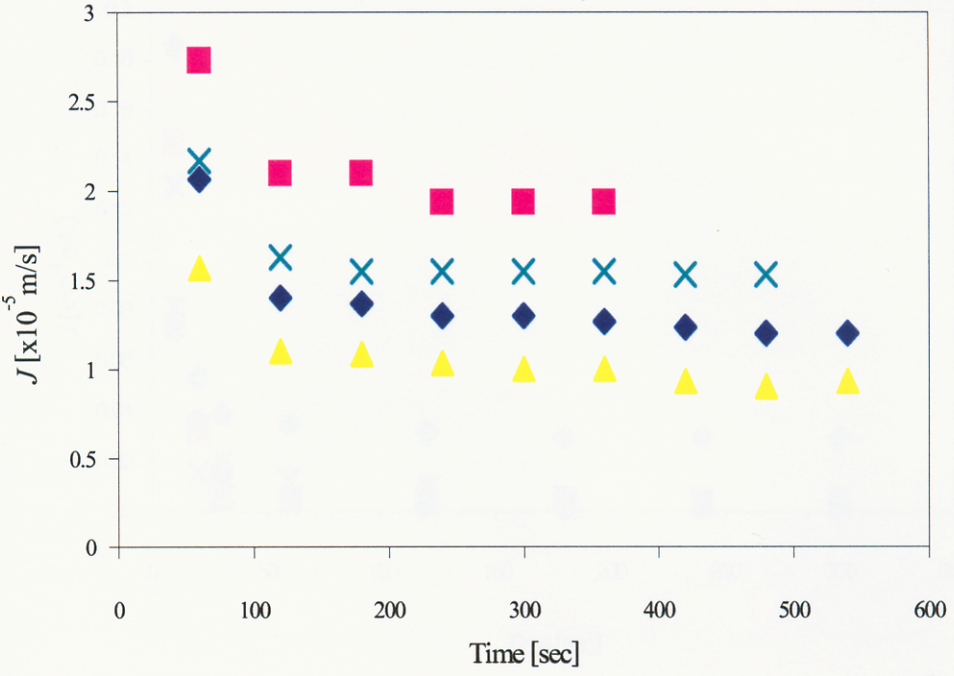
ภาพที่ 2-5 SDS-PAGE ของโปรตีนในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิ : (1) โปรตีนมาตรฐาน, (2) น้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 1, (3) น้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 2, (4) น้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 3 และ (5) น้ำจากการบีบน้ำส่วนเกินออกด้วยเครื่องสกรูเพรส

Figure 2-5 SDS-PAGE pattern of surimi wastewater fraction : (1) Standard proteins, (2) First wash water, (3) Second wash water, (4) Third wash water and (5) Dewatering from screw press.

3.1 ฟลักซ์การกรองน้ำทิ้งผ่านอัลตราฟิลเตรชันและไมโครฟิลเตรชัน

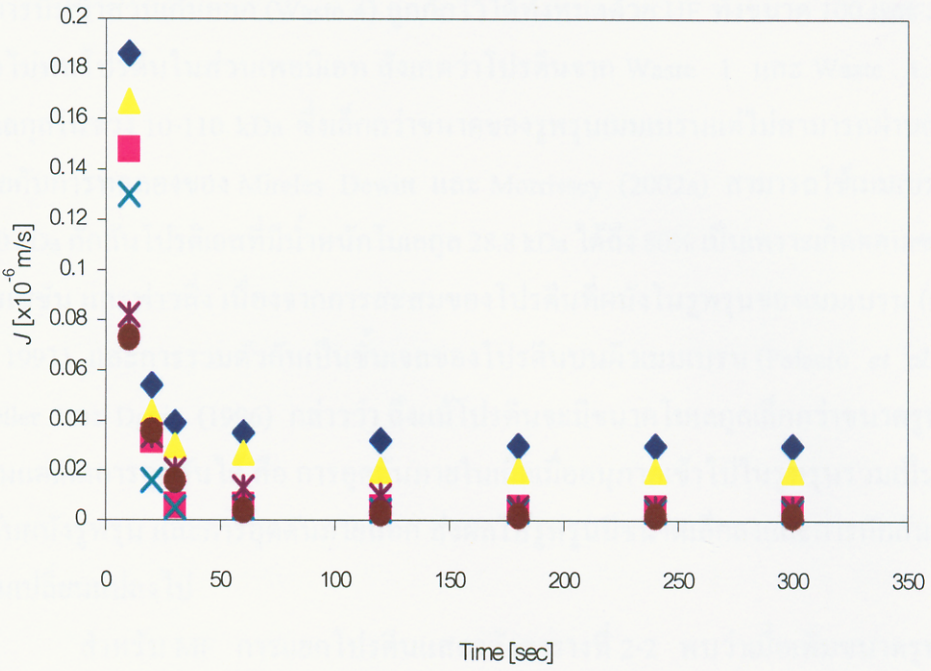
ฟลักซ์ของการกรองน้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 1 (Waste 1) และ น้ำจากการบีบน้ำส่วนเกินออก (Waste 4) ด้วย UF และ MF แสดงดังภาพที่ 2-6 และ 2-7 ตามลำดับ พบว่าการใช้เมมเบรนขนาดเดียวกัน ค่าฟลักซ์ของ Waste 1 สูงกว่าค่าฟลักซ์ของ Waste 4 เนื่องจากความเข้มข้นของโปรตีนที่ไม่เท่ากันมีผลต่อค่าฟลักซ์ สอดคล้องกับรายงานของ Alvise และคณะ (2000) ศึกษาผลของความเข้มข้นโปรตีนที่มีต่อการกรองด้วย UF โดยในการทดลองใช้โปรตีนความเข้มข้นต่างๆ กัน ช่วงระหว่าง 1-5% ดำเนินงานที่สภาวะเดียวกัน พบว่าฟลักซ์แรกเริ่มของโปรตีนความเข้มข้น 5% ต่ำกว่าฟลักซ์ของโปรตีนความเข้มข้น 1% ถึง 2 เท่า แต่ความลาดเอียงของกราฟค่าฟลักซ์ไม่ต่างกัน และความเข้มข้นของโปรตีนยิ่งสูงทำให้มีการเกิดฟาวลิ่งบนผิวเมมเบรนมากกว่าในรูพรุนส่งผลให้เกิดความต้านทานการไหลมากขึ้นด้วย

ขนาดรูพรุนของเมมเบรนที่แตกต่างกันก็มีผลทำให้ค่าฟลักซ์ของสารชนิดเดียวกันแตกต่างกันด้วย คือ ทั้ง Waste 1 และ Waste 4 ที่กรองผ่านเมมเบรนขนาด 300 kDa มีค่าฟลักซ์สูงกว่าและใช้เวลาในการกรองน้อยกว่าเมมเบรนขนาด 100 kDa อย่างชัดเจน แต่กราฟแสดงค่าฟลักซ์ทั้งหมดของ MF และ UF มีรูปแบบในทิศทางเดียวกัน คือลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรกและค่อนข้างคงที่ในช่วงหลัง ผลที่ได้คล้ายกับค่าฟลักซ์ในการทดลองของ Mireles Dewitt และ Morrissey (2001b) ซึ่งใช้ UF ขนาด 30 และ 50 kDa เพื่อทำให้โปรติเอสบริสุทธิ์จากน้ำล้างเนื้อปลาบด และงานวิจัยของ Huang และ Morrissey (1998) ใช้ MF ขนาด 0.2 ไมโครเมตร กรองน้ำล้างเนื้อปลาบด เพื่อเก็บเกี่ยวโปรตีนไมโอไฟบริลล่าร์ ได้อธิบายว่าค่าฟลักซ์ที่ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรกเกิดจากการอุดตันของโปรตีนภายในรูพรุน ต่อมาโปรตีนจำนวนมากจะสะสมเป็นชั้นเจลอยู่บริเวณผิวหน้าเมมเบรนทำให้เกิดแรงต้านทานมากขึ้นมีผลให้ค่าฟลักซ์ลดลงในช่วงหลัง ซึ่งการเกิดเจล (เคก) บนผิวหน้าเมมเบรนอธิบายได้ด้วยแบบจำลองเจลโพลาไรเซชัน (Gel polarization model, GP) คือการกรองสารโมเลกุลใหญ่โดยเฉพาะโปรตีนในระบบ UF เมื่อตัวทำละลายลดลง ซึ่งในการทดลองนี้คือน้ำ ส่วนตัวถูกละลายคือโปรตีนไม่สามารถผ่านเมมเบรนได้จะถูกกักที่บริเวณผิวหน้าเมมเบรนจนความเข้มข้นสูงมากขึ้นจนถึงขีดจำกัดการละลายก็จะรวมตัวกันเป็นเจลหรือตกตะกอนบนผิวเมมเบรน ชั้นเจลนี้จะคลุมผิวหน้าเมมเบรนไว้ทำให้เกิดการต้านทานการไหลฟลักซ์ของสารละลายจึงมีค่าลดลงและชั้นเจลก็ทำให้ค่าการกักกันสารของเมมเบรนเปลี่ยนไปอีกด้วย (Zeman and Zydney, 1996)



ภาพที่ 2-6 ฟลักซ์ขณะกรองน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิผ่านอัลตราฟิลเตรชันแบบไหลขนานกับเมมเบรน ที่อุณหภูมิ 8±2°C TMP 2.5 บาร์ : (◆) น้ำล้างเนื้อปลาครั้งที่1/100 kDa, (■) น้ำล้างเนื้อปลาครั้งที่1/300 kDa, (▲) น้ำจากการบีบน้ำส่วนเกินออก/100 kDa, (×) น้ำจากการบีบน้ำส่วนเกินออก/300 kDa

Figure 2-6 Permeate flux during cross-flow ultrafiltration of surimi wastewater at 8±2°C, TMP 2.5 bars: (◆) Waste1/100 kDa, (■) Waste1/300 kDa, (▲) Waste4/100 kDa, (×) Waste4/300 kDa



ภาพที่ 2-7 ฟลักซ์ขณะกรองน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิผ่านไมโครฟิลเตรชันแบบไหลตั้งฉากกับเมมเบรน ที่อุณหภูมิ 8±2°C TMP 2.0 บาร์ : (◆) น้ำล้างเนื้อปลาครั้งที่1/1 μm, (▲) น้ำล้างเนื้อปลาครั้งที่1/0.45 μm, (✳) น้ำล้างเนื้อปลาครั้งที่1/0.22 μm, (■) น้ำจากการบีบน้ำส่วนเกินออก/1 μm, (×) น้ำจากการบีบน้ำส่วนเกินออก/0.45 μm, (●) น้ำจากการบีบน้ำส่วนเกินออก/0.22 μm

Figure 2-7 Permeate flux during dead-end microfiltration of surimi wastewater at 8±2°C, TMP 2.0 bars: (◆) Waste1/1 μm, (▲) Waste1/0.45 μm, (✳) Waste1/0.22 μm, (■) Waste4/1 μm, (×) Waste4/0.45 μm, (●) Waste4/0.22 μm

3.2 ผลการเก็บเกี่ยวโปรตีนด้วยอัลตราฟิลเตรชันและไมโครฟิลเตรชัน

ความสามารถในการแยกโปรตีนของเมมเบรนเป็นตัวบ่งชี้ความเหมาะสมในการเลือกใช้งานของ MF และ UF การศึกษาผลของการคัดแยกโปรตีนในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิแสดงในตารางที่ 2-2 พบว่าโปรตีนจากน้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 1 (Waste 1) และน้ำจากการบีบน้ำส่วนเกินออก (Waste 4) ถูกกักไว้ได้ทั้งหมดด้วย UF ทั้งขนาด 100 และ 300 kDa จึงตรวจไม่พบโปรตีนในส่วนเพอมิเอท สังเกตว่าโปรตีนจาก Waste 1 และ Waste 4 มีขนาดมวลโมเลกุลในช่วง 10-110 kDa ซึ่งเล็กกว่าขนาดของรูพรุนเมมเบรนแต่ไม่สามารถผ่านเมมเบรนได้ คล้ายกับการทดลองของ Mireles Dewitt และ Morrissey (2002a) สามารถใช้เมมเบรนรูพรุนขนาด 50 kDa กักกันโปรติเอสที่มีน้ำหนักโมเลกุล 28.8 kDa ได้ถึง 80% เป็นเพราะเกิดคอนเซนเตรชันโพลาไรเซชัน และฟาวลิ่ง เนื่องจากการสะสมของโปรตีนที่ผนังในรูพรุนของเมมเบรน (Marshall *et al.*, 1993) และการรวมตัวกันเป็นชั้นเจลของโปรตีนบนผิวเมมเบรน (Palacio *et al.*, 2002) ซึ่ง Mueller และ Davis (1996) กล่าวว่า ถึงแม้โปรตีนจะมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าขนาดรูพรุนของเมมเบรนแต่เกิดการอุดตันได้ คือ การอุดตันภายในเกิดเมื่ออนุภาคเข้าไปในรูพรุนรวมเป็นตะกอนดูดซับกับผนังรูพรุน และการอุดตันภายนอก ส่งผลให้รูพรุนมีขนาดเล็กลงและการกักกันสารของเมมเบรนเปลี่ยนแปลงไป

สำหรับ MF การแยกโปรตีนแสดงดังตารางที่ 2-2 พบว่าเมื่อเพิ่มขนาดรูพรุนของเมมเบรนทำให้โปรตีนผ่านได้มากขึ้น และโปรตีนในส่วนรีเทนเททและเพอมิเอทไม่แตกต่างกันและมีรูปแบบเหมือนกับของสารป้อน (ภาพที่ 2-8) แสดงว่าโปรตีนทุกขนาดสามารถผ่านเมมเบรนได้ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า MF ไม่สามารถใช้แยกโปรตีนในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิเนื่องจากการแยกส่วนโปรตีนทำได้ยากซึ่งสามารถทำได้ในสภาวะที่มีความเหมาะสมสูงเท่านั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยทั้งด้านกายภาพและทางเคมี เช่น ความดัน ความเร็วของสารป้อน พีเอช ความเข้มข้นของเกลือ ความเข้มข้นของสารป้อน ค่าฟลักซ์ อุปกรณ์เมมเบรน รวมไปถึงผลจากการกรอง คือ คอนเซนเตรชันโพลาไรเซชันและฟาวลิ่ง ที่สำคัญโปรตีนที่ต้องการใช้แยกควรมีความแตกต่างกันประมาณ 10 เท่า (Ghosh and Cui, 200a; Ghosh *et al.*,2003) จากการรายงานของ Punidadus และ Rizvi (1998) สามารถใช้ MF ในการแยกส่วนโปรตีนในนมได้โดยใช้เมมเบรนขนาด 0.5 ไมโครเมตร ผลปรากฏว่าเมมเบรนสามารถกักกันเคซีน (Casein) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 20-6,000 kDa และยอมให้ β-Lactoglobulin (น้ำหนักโมเลกุล 18 kDa), α-Lactalbumin (น้ำหนักโมเลกุล 14 kDa) และสารโมเลกุลขนาดเล็กอื่นๆ ผ่านเมมเบรนได้ สังเกตได้ว่าน้ำหนักโมเลกุลของเคซีนแตกต่างกับน้ำหนักโมเลกุลของ β-Lactoglobulin และ α-Lactalbumin มาก แต่ในน้ำทิ้งจากการทดลองมีโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10-110 kDa ซึ่งแตกต่างกันไม่มากทำให้ไม่สามารถแยกออกเป็นช่วงน้ำหนักโมเลกุลได้

นอกจากการใช้ UF และ MF เก็บเกี่ยวโปรตีนแล้ว ขณะเดียวกันยังทำให้ในส่วนเพอมิเอทมีค่าซีโอดีลดลงอย่างชัดเจน (ภาพที่ 2-9) โดยการใช้ UF สามารถลดค่าซีโอดีใน Waste 1 และ Waste 4 ประมาณ 93% และ 96% ตามลำดับ ส่วนการใช้ MF ความสามารถในการลดค่าซีโอดีขึ้นอยู่กับขนาดรูพรุนของเมมเบรนโดย Waste 1 ค่าซีโอดีลดลงประมาณ 59.75-88.62% ส่วนใน Waste 4 ลดลงประมาณ 28.57-87.76%

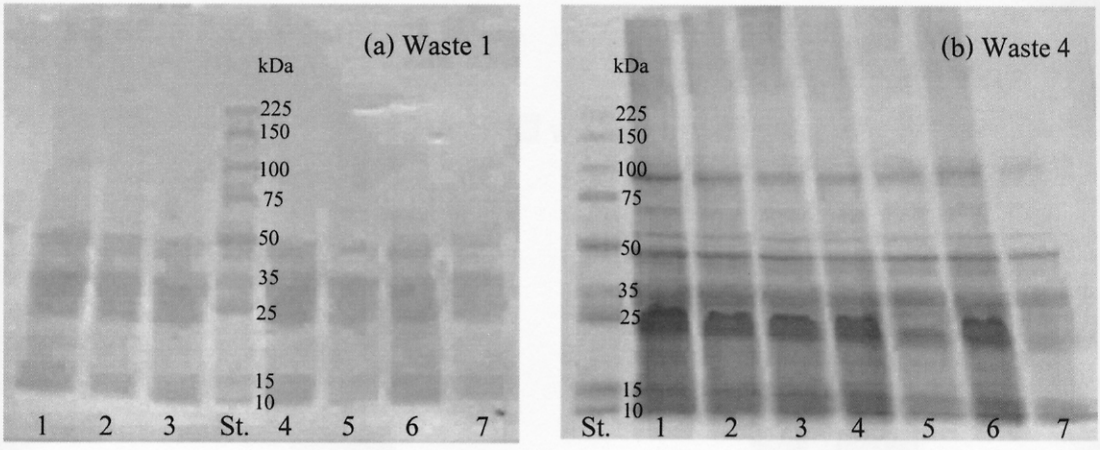
ตารางที่ 2-2 ผลการกรองโปรตีนในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิด้วยอัลตราฟิลเตรชันและไมโครฟิลเตรชัน

Table 2-2 Protein transmission during ultrafiltration and microfiltration of surimi wastewater.

Sample / MWCO or pore size of membrane	Protein concentration (mg/ml)	
	Retentate	Permeate
Waste 1 (UF 100 kDa)	13.47 ± 1.60	ND
Waste 1 (UF 300 kDa)	12.63 ± 1.15	ND
Waste 4 (UF 100 kDa)	26.66 ± 0.81	ND
Waste 4 (UF 300 kDa)	26.38 ± 0.95	ND
Waste 1 (MF 0.22 μm)	7.46 ± 1.55	0.26 ± 0.05
Waste 1 (MF 0.45 μm)	5.74 ± 0.77	1.34 ± 0.05
Waste 1 (MF 1.0 μm)	4.81 ± 0.18	1.86 ± 0.05
Waste 4 (MF 0.22 μm)	8.09 ± 0.60	0.16 ± 0.05
Waste 4 (MF 0.45 μm)	7.64 ± 0.40	1.27 ± 0.05
Waste 4 (MF 1.0 μm)	7.26 ± 0.31	5.51 ± 0.05

Waste 1 : First wash water and Waste 4 : Dewatering from screw press

ND : Not detected

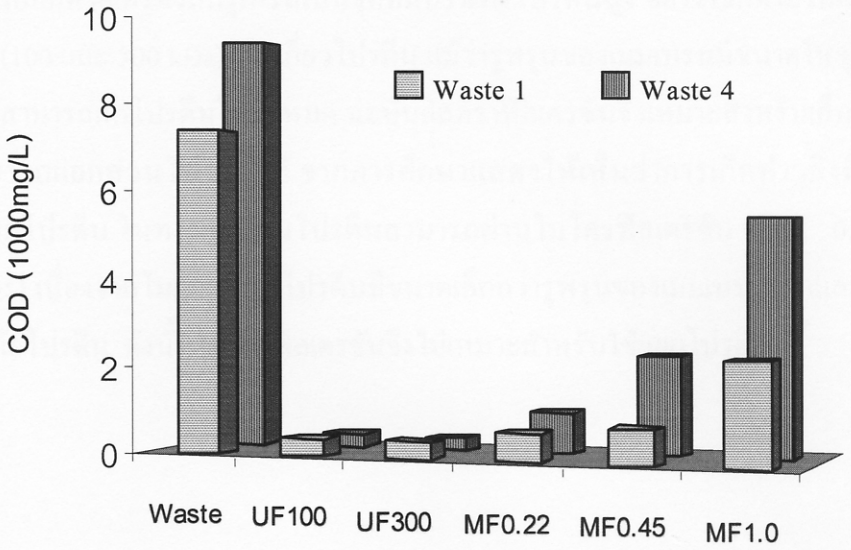


ภาพที่ 2-8 SDS-PAGE ของโปรตีนในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิ : น้ำล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 1 (Waste 1) และน้ำจากการบีบน้ำส่วนเกินออกด้วยเครื่องสกรูเพรส (Waste 4) และส่วนรีเทนเททและเพอมิเอท หลังจากกรองผ่านไมโครฟิลเตรชันด้วยเมมเบรนที่มีรูพรุนขนาด 1, 0.45 และ 0.22 ไมโครเมตร

Figure 2-8 SDS-PAGE of surimi wastewater (Waste 1, Waste 4) : Retentate and permeate of microfiltration with membrane pore size 1, 0.45 and 0.22 μm.

(a) Lane 1 : Waste 1, Lane2 : Retentate MF1, Lane 3 : Permeate MF1, Lane St : Standard proteins, Lane 4 : Retentate MF0.45, Lane 5 : Permeate MF0.45, Lane 6 : Retentate MF0.22 and Lane 7 : Permeate MF0.22

(b) Lane St : Standard proteins, Lane 1 : Retentate MF1, Lane 2 : Permeate MF1, Lane 3 : Retentate MF0.45, Lane 4 : Permeate MF0.45, Lane 5 : Retentate MF0.22, Lane 6 : Permeate MF0.22 and Lane 7 : Waste 4



ภาพที่ 2-9 ผลของอัลตราฟิลเตรชันและไมโครฟิลเตรชันที่มีต่อค่าซีโอดีของน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิ

Figure 2-9 Effect of ultrafiltration and microfiltration on chemical oxygen demand (COD) of surimi wastewater.

สรุปผลการทดลอง

น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิที่เก็บในจุดต่างๆ ประกอบด้วยโปรตีนที่มีขนาดมวลโมเลกุล 10-110 kDa เหมือนกันทุกจุด โดยน้ำทิ้งจากการล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 1 และน้ำจากการบีบน้ำส่วนเกินออกด้วยเครื่องสกรูเพรสเป็นจุดที่มีปริมาณโปรตีนสูง อย่างไรก็ตามในการใช้อัลตราฟิลเตรชัน (100 และ 300 kDa) เก็บเกี่ยวโปรตีน แม้ว่ารูพรุนของเมมเบรนมีขนาดใหญ่กว่าโมเลกุลโปรตีนแต่สามารถกักโปรตีนได้ทั้งหมด ฉะนั้นอัลตราฟิลเตรชันจึงเหมาะสำหรับเก็บเกี่ยวโปรตีนแต่ไม่สามารถแยกส่วนโปรตีนได้ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเกิดฟาวลิ่งมีบทบาทต่อการคัดเลือกโปรตีน ในทางกลับกันโปรตีนสามารถผ่านไมโครฟิลเตรชัน (0.22, 0.45 และ 1 ไมโครเมตร) เนื่องจากโมเลกุลของโปรตีนมีขนาดเล็กกว่ารูพรุนของเมมเบรนมากและฟาวลิ่งไม่มีผลต่อการกักโปรตีน ดังนั้นไมโครฟิลเตรชันจึงไม่เหมาะสำหรับใช้แยกโปรตีน

เอกสารอ้างอิง

สุทธวัฒน์ เบญจกุล. 2536. ซูริมิและผลิตภัณฑ์จากซูริมิ. ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อาภัสสรา ชมิดท์. 2537. เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส. คณะสัตวแพทยศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ

Afonso, M. D. and Borquez, R. 2002. Review of treatment of seafood processing wastewaters and recovery of proteins therein by membrane separation processes – prospects of the ultrafiltration of wastewater from the fish meal industry. Desalination. 142 : 29–45.

Afonso, M. D. and Borquez, R. 2004. An economic assessment of proteins recovery from fish meal effluents by ultrafiltration. Food Sci. Technol. 15 : 506-512.

Alvise, N. D., Lesueur-Lambert, C., Fertin, B., Dhulster, P. and Guillochon, D. 2000. Hydrolysis and large scale ultrafiltration study of alfalfa protein concentration enzymatic hydrolysate. Enzyme. Microb. Technol. 27 : 286-294.

A.O.A.C. 1990. Official Method of Analysis of the association of official analytical chemists 15th ed. The association of official analytical chemists, Inc. Verginia Alrington.

APHA, AWWA and WPCF. 1985. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 16th edition, American Public Health Association, Washington, DC.

Benjakul, S., Seymour, A. T., Morrissey, M.T. and An, H. 1996. Proteinase in pacific whiting surimi wash water : identification and characterization. J. Food Sci. 61(6): 1165–1170.

Bodalo, A., Gomez, J. L., Gomez, E., Bastida, J., Maximo, M. F. and Montiel, M. C. 2001. Ultrafiltration membrane reactors for enzymatic resolution of amino acids: design model and optimization. Enzyme. Microb. Technol. 28 : 355-361.

Chan, R., Chen, V. and Bucknall, M. P. 2004. Quantitative analysis of membrane fouling by protein mixtures using MALDI-MS. Biotechnol Bioeng. 85(2) : 190-201.

Davis, R. H. 1992. Ultrafiltration. *In* Membrane Handbook. (Winston Ho, W. S. and Sirkar, K. K., eds.) p.457-571. Champman&Hall. New York.

Donnelly, D., Bergin, J., Duane, T.and McNulty, N. 1998. Application of Membrane Bioseparation Processes in the Beverage and Food Industries. *In* Bioseparation and Bioprocessing. Vol 1. (Subramanian, G. ed.). p. 229-266. Wiley-VCH. New York.

Ghosh, R.and Cui, Z. F. 2000a. Simulation study of the fractionation of protein using ultrafiltration. J. Membr. Sci. 167 : 47-53.

Ghosh, R.and Cui, Z. F. 2000b. Protein purification by ultrafiltration with pre-treated membrane. J. Membr. Sci. 180 : 29-36.

Ghosh, R., Wan, Y., Cui, Z. and Hale, G. 2003. Parameter scanning ultrafiltration rapid optimisation of protein separation. Biotechnol Bioeng. 81(6) : 673-682.

Howell, J. A. 1993. Introduction. *In* Membrane in Bioprocessing Theory and Applications. 1st ed. (Howell, J. A., Sanchez, V. and Field, R. W., eds.) p.1-12. Champ & Hall. London.

Huang, L. and Morrissey, M.T. 1998. Fouling of membranes during microfiltration of surimi wash water : Roles of pore blocking and surface cake formation. J. Memb. Sci. 144 : 113-123.

Huidobro, A., Montero, P. and Borderias, A. J. 1998. Emulsifying properties of an ultrafiltration protein from minced fish wash water. Food Chem. 61(3) : 339–343.

Huisman, I. H., Pradanos, P. and Hernandez, A. 2000. The effect of protein-protein and protein-membrane interaction on membrane fouling in ultrafiltration. J. Membr. Sci. 119 : 79-90.

Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V. and Fleurence, J. N. 2003. In vitro proteolysis of myofibrillar and sarcoplasmic proteins of white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects of cathepsins B, D and L. Food Chem. 81 : 517-525.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of head bacteriophage T4. Nature. 277 : 680–685.

Lee, M. C. 1986. Surimi manufacturing and fabrication of surimi – based products. Food Technol. 40 (3) : 115–124.

Lee, H., Amy, G., Cho, J., Yoom, Y., Moon, S. and Kim, I. S. 2001. Clean strategies for flux recovery of an ultrafiltration membrane fouled by natural organic matter. Water Res. 35 (14) : 3301-3308.

le Roux, L. D. and Belyea, R. L. 1999. Effects of ultrafiltration membrane concentration and drying temperature on nutritional valve of biosolid from a milk processing plant. Bioresour. Technol. 70 : 17 –21.

Lin, T. M., Park, J. W. and Morrissey, M. T. 1995. Recovery proteins and reconditioned water from surimi processing waste. J. Food Sci. 60 (1) : 4–9.

Lin, T. M. and Park, J. W. 1996. Extraction of proteins from pacific whiting mince at various washing conditions. J. Food Sci. 61 (2) : 432–438.

Liu, C. and Wu, X. 1998. Optimization of operation parameters in ultrafiltration process. J. Biotechnol. 66 : 195-202.

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. 9 : 65-108.

Mireles Dewitt, C. A. and Morrissey, M. T. 2002a. Parameter for the recovery of proteases from surimi wash water. Bioresour. Technol. 81 : 241 –247.

Mireles Dewitt, C.A. and Morrissey, M.T. 2002b. Pilot plant of catheptic proteases from surimi wash water. Bioresour Technol. 82 : 295-301.

Mueller, J. and Davis, R. 1996. Protein fouling of surface-modified polymeric microfiltration membranes. J. Membr. Sci. 116 : 47-60.

Mulder, M. 1993. Nature of membranes. *In* Membrane in Bioprocessing Theory and Applications. 1st ed. (Howell, J. A., Sanchez, V. and Field, R. W., eds.) p.13-53. Champ & Hall, London.

Panidadas, P., and Rizvi, S. S. H. 1998. Separation of milk proteins into fractions rich in casein or whey proteins by cross flow filtration. Food Research Int. 31(4): 265-272.

Robyt, J. F and Bernard, J. W. 1987. Biochemical Techniques Theory and Practice. Brooks/Cole. California.

Shiau, C. Y. and Chai, T. 1999. Protein recovered from oyster wash water by ultrafiltration and their utilization as oyster sauce through fermentation. J. Marine Sci. Technol. 7(2) : 110-116.

Zeman, L. J. and Zydney, A. L. 1996. Microfiltration and Ultrafiltration Principles and Applications. Marcel Dekker, Inc. New York.