บทที่ 1
บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัญหาอย่างหนึ่งในกระบวนการผลิตอาหาร คือ ปริมาณของเสียที่เกิดขึ้นซึ่งมีทั้งกากของเสียที่เป็นของแข็งและน้ำทิ้งที่เกิดจากกระบวนการผลิต ทำให้เป็นปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมและต้องเสียค่าใช้จ่ายในการบำบัด โดยกระบวนการผลิตซูริมิเป็นกรณีตัวอย่างของการผลิตอาหารที่ต้องใช้น้ำในปริมาณมาก ส่งผลให้มีน้ำทิ้งปริมาณมากตามมาด้วย

สุทธวัฒน์ เบญจกุล และ วรรณพ วิเศษสงวน (2541) ให้ความหมายของซูริมิว่าเป็นภาษาญี่ปุ่นที่ใช้เรียกเนื้อปลาบดที่ผ่านการล้างเพื่อกำจัดโปรตีนที่ละลายในน้ำ ไขมัน เลือด และสารที่ให้กลิ่นคาวแล้วบีบน้ำและคัดแยกสิ่งปลอมปน หลังจากนั้นเติมสารป้องกันการสูญเสียสภาพของโปรตีนก่อนนำไปแช่แข็ง ซูริมิใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตเป็นผลิตภัณฑ์หลายชนิดที่ให้ลักษณะเป็นเจลยืดหยุ่น เช่น คามาโบโกะ ชิกูวะ ไส้กรอก เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้ผลิตปูเทียมซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย

วัตถุดิบที่ใช้ผลิตซูริมิมักจะเป็นปลาที่ราคาถูกและมีตลอดทั้งปี เช่น Pacific whiting, Alaska pollock, Hoki และ Southern blue whiting เป็นต้น สำหรับในประเทศไทยมีการผลิตซูริมิมานานกว่า 20 ปี โดยวัตถุดิบหลักที่ใช้คือ ปลาทรายแดง ปลาตาหวาน ปลาจวด ปลาปากคม ปลาน้ำดอกไม้ ปลาช่อนทะเล เป็นต้น (สุภาพรรณ บริลเลียนเตส, 2535; อรวรรณ คงพันธุ์ และคณะ, 2545) จากการรายงานสภาวะตลาดโลกของซูริมิและปูเทียม กล่าวว่า ปริมาณซื้อขายคามาโบโกะในประเทศญี่ปุ่นแต่ละปีคิดเป็นปริมาณถึง 1 ล้านตันต่อปี ต่อมาได้มีการค้นพบการผลิตปูเทียม กุ้งเทียม และเอ็นหอยเชลล์เทียม ซึ่งเป็นที่นิยมในการบริโภคกันมากทำให้ญี่ปุ่นขาดแคลนวัตถุดิบจึงต้องหันมาสั่งเข้าซูริมิจากประเทศต่างๆ เช่น รัสเซีย นิวซีแลนด์ อาร์เจนตินา ไต้หวัน และไทย เป็นต้น (สุภาพรรณ บริลเลียนเตส และ ผ่องเพ็ญ รัตตกูล, 2533) ซึ่งทำรายได้เข้าสู่ประเทศไทยปีละหลายล้านบาท พบว่าในเดือนมกราคมถึงกันยายน พ.ศ. 2542 อุตสาหกรรมแปรรูปอาหารทะเลมีมูลค่าส่งออก 6,709.5 ล้านบาท (ศูนย์สารสนเทศเศรษฐกิจการค้า, 2542 อ้างโดย ภัควดี ธรรมเจษฎา, 2543) และในปี พ.ศ. 2545 เนื้อปลาบดแช่แข็งมีการส่งออกเพิ่มทั้งปริมาณและมูลค่าคิดเป็น 13.83% และ 17.9% ตามลำดับ (นุชจรินทร์ เกตุนิล, 2546) จากการผลิตที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปีจึงส่งผลให้มีปริมาณของเสียจากอุตสาหกรรมผลิตซูริมิเพิ่มขึ้นตามด้วย โดยเศษเหลือในรูปของแข็งมีประมาณ 40% ของน้ำหนักปลาทั้งตัว แต่สามารถนำไปแปรรูปเป็นโปรตีนไฮโดไลเสทได้ (วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร

และคณะ, 2541) และของเสียอีกส่วนหนึ่งออกมาในรูปน้ำทิ้งซึ่งยังมีโปรตีนอยู่จำนวนมากที่ควรค่าแก่การนำกลับมาใช้ประโยชน์แทนที่จะปล่อยเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อม

น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิเป็นน้ำทิ้งที่เกิดจากการล้างเนื้อปลาที่บดแล้ว และน้ำทิ้งจากการบีบน้ำส่วนเกินออกจากเนื้อปลาบดโดยใช้เครื่องสกรูเพรส ขั้นตอนของกระบวนการผลิตซูริมิ พบว่าผลิตภัณฑ์ซูริมิ 1 กิโลกรัม จะมีปริมาณน้ำทิ้งออกมาจากกระบวนการผลิตประมาณ 29 ลิตร และค่าซีโอดี (COD) ประมาณ 6,000-27,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (Lin *et al.*, 1995) มีค่าบีโอดี (BOD) อยู่ในช่วง 10,000-15,000 มิลลิกรัมต่อลิตร (Huang, 1995 อ้างโดย Benjakul *et al.*, 1996) ในขณะที่กฎหมายไทยระบุว่าน้ำทิ้งจะมีค่าซีโอดีไม่เกิน 400 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าบีโอดีไม่เกิน 60 มิลลิกรัมต่อลิตร เหตุผลของการล้างเนื้อปลาบดก็เพื่อกำจัดโปรติเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำให้ความสามารถในการเกิดเจลของซูริมิลดลง (An *et al.*, 1994) และยังพบโปรตีนที่ละลายน้ำ (Sarcoplasmic protein) ปริมาณมากในน้ำล้างครั้งแรก ส่วนในน้ำล้างครั้งสุดท้ายมักเติมเกลือเพื่อช่วยกำจัดน้ำออกจากเนื้อปลาบดซึ่งมักพบโปรตีนชนิดไมโอไฟบริลล่าร์ละลายในน้ำเกลือ (Lin and Park, 1996) วิธีการกรองจึงน่าจะเป็นวิธีที่สามารถนำโปรตีนที่ละลายอยู่ในน้ำทิ้งนี้กลับมาใช้ได้อีกและยังเป็นการลดความยุ่งยากในขั้นตอนการบำบัดน้ำเสีย

เทคโนโลยีการกรองโดยใช้เมมเบรนถือเป็นวิธีหนึ่งที่เหมาะสำหรับการเก็บเกี่ยวโปรตีนที่ละลายได้ และยังได้รับความนิยมในโรงงานแปรรูปอาหารทะเลในกระบวนการทำให้เข้มข้น (Concentration) การแยกส่วน (Fractionation) และการทำให้บริสุทธิ์ (Purification) (Afonso and Borquez, 2002) เนื่องจากเป็นกระบวนการที่ไม่ใช้ความร้อนและสารเคมี จึงไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ อีกทั้งมีข้อดีกว่าการใช้วิธีอื่นๆ คือสามารถใช้ได้กับสารละลายตัวอย่างที่มีปริมาณมาก (Ghosh and Cui, 2000b) น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิหลังจากผ่านกระบวนการกรองแล้วจะได้ผลิตภัณฑ์อยู่ในรูปของสารละลายโปรตีนเข้มข้นซึ่งยากต่อการเก็บรักษาและนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ดังนั้นการตกผลึกเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถช่วยแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์และเปลี่ยนสถานะโปรตีนให้อยู่ในรูปของแข็งซึ่งทำให้สามารถเก็บรักษาและมีความคงตัวดีกว่าโปรตีนที่อยู่ในรูปของเหลว (Cherdrungsi, 1999)

การศึกษาครั้งนี้ได้สำรวจจุดที่เกิดน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิและศึกษาลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของน้ำทิ้งในแต่ละจุด เพื่อหาแนวทางในการเก็บเกี่ยวโปรตีนโดยใช้เทคโนโลยีการกรองด้วยระบบอัลตราฟิลเตรชันและไมโครฟิลเตรชัน ซึ่งมีความแตกต่างของขนาดรูพรุนของเมมเบรนขนาดต่างกันเพื่อหาความเหมาะสมในการเก็บเกี่ยวโปรตีนที่ละลายได้ จากนั้นนำโปรตีนที่เก็บเกี่ยวได้มาตกผลึกด้วยชุดทดสอบทางการค้า (Crystallization basic kit for protein) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการนำไปศึกษาการตกผลึกโปรตีนในระดับที่ใหญ่ขึ้นต่อไป

ตรวจเอกสาร

1. อุตสาหกรรมซูริมิ

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก. 935/2533 ให้ความหมายของซูริมิ ว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำเนื้อปลาที่ผ่านการตัดหัว ควักไส้ มาผ่านกรรมวิธีแยกเนื้อปลาซึ่งจะได้เนื้อปลาบด จากนั้นนำเนื้อปลาบดมาล้างน้ำ ผ่านกรรมวิธีบีบน้ำ แล้วผสมกับวัตถุเจือปนอาหาร นวดให้เข้ากันและเหนียว ทำเป็นก้อนรูปสี่เหลี่ยมหรือรูปอื่นๆ นำไปผ่านกรรมวิธีแช่เยือกแข็ง โดยให้มีระยะเวลาการเกิดผลึกน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว แล้วจึงลดอุณหภูมิบริเวณจุดกึ่งกลางของผลิตภัณฑ์ให้ต่ำกว่า –18 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำไปเก็บรักษาโดยควบคุมอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์ไว้ที่ –18 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่าให้สม่ำเสมอตลอดเวลา

1.1 ขั้นตอนการผลิตซูริมิ (สุภาพรรณ บริลเลียนเตส, 2535)

1.1.1 วัตถุดิบ

ปลาที่ใช้ควรจะมีความสดอยู่ในช่วง 1-2 วันนับจากวันจับ ซึ่งความสดจะลดลงตามระยะเวลาและสภาพของการเก็บรักษา โดยความสดของปลามีผลไปถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ด้วย

1.1.2 การตัดหัวและควักไส้

เป็นขั้นตอนที่ส่วนมากมักอาศัยแรงงานคนแต่ก็สามารถใช้เครื่องตัดหัวและควักไส้ได้เมื่อปลามีขนาดเดียวกัน ข้อดีของการตัดหัวและควักไส้ออกมีดังนี้

- หัวและไส้ปลาเป็นส่วนที่มีไขมันมาก ซึ่งสลายตัวออกมาในระหว่างการเก็บรักษาเนื้อปลาบดทำให้ความเหนียวของเนื้อปลาบดลดลง
- ไส้ของปลาเต็มไปด้วยน้ำย่อยต่างๆ ซึ่งจะทำให้ความเหนียวของเนื้อปลาบดลดลง
- ไส้ของปลาจะทำให้เนื้อปลาบดมีสีคล้ำ

1.1.3 การแยกเนื้อปลา

ปัจจัยสำคัญในการบดเนื้อปลาเพื่อทำซูริมิคือการเลือกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูของลูกกลิ้งทรงกระบอกของเครื่องแยกเนื้อปลา (Deboner) ซึ่งมีขนาดระหว่าง 1-5 มิลลิเมตร ปลาที่ตัดหัวและควักไส้แล้วจะถูกส่งเข้าไปอยู่ในช่องระหว่างสายพานและลูกกลิ้งทรงกระบอกที่เป็นรู เนื้อจะผ่านแกนหมุนเข้ามาอยู่ส่วนในของลูกกลิ้ง ขณะที่ก้างและหนังจะติดกับสายพานออกไปอีกทาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูของลูกกลิ้งที่จัดว่าให้คุณภาพและผลผลิตสูงสุดคือ 3-4 มิลลิเมตร เพราะถ้าขนาดที่เล็กเกินไป (1-2 มิลลิเมตร) จะทำให้เกิดการสูญเสียมากในช่วงการล้าง ซึ่งตรงกันข้ามกับ

การใช้ลูกกลิ้งที่มีขนาด 4-5 มิลลิเมตร ให้เนื้อปลามีลักษณะหยาบทำให้การสูญเสียน้อยกว่า แต่สีของเนื้อปลาบดหลังการล้างจะคล้ำเนื่องจากการล้างไม่ทั่วถึง (Lee, 1986)

1.1.4 การล้างเนื้อปลา

การล้างเนื้อปลาบดจะใช้อัตราส่วนน้ำเท่ากับ 3 หรือ 4 ส่วน ต่อเนื้อปลาที่บดแล้ว 1 ส่วน ซึ่งเป็นปริมาณน้ำที่ประหยัดและเพียงพอต่อการล้าง โดยปริมาณน้ำล้างเป็นตัวกำหนดจำนวนครั้งของการล้างแต่ไม่จำเป็นต้องล้างมากกว่า 3 ครั้ง การล้างแต่ละครั้งควรใช้เวลาน้อยกว่า 10 นาที โดยมีการกวนระหว่างล้างจากนั้นปล่อยให้เนื้อปลานอนก้น ไขมัน และสิ่งแปลกปลอมอื่นๆ ที่ลอยขึ้นมาจะถูกกำจัดออก น้ำล้างครั้งสุดท้ายควรใช้น้ำเกลือที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์อยู่ในช่วง 0.1–0.2% เพื่อช่วยในการกำจัดน้ำออก (Lee, 1986) ลักษณะและคุณภาพน้ำที่ใช้ล้างควรมีลักษณะดังนี้คือ (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2536)

- อุณหภูมิของน้ำควรน้อยกว่าหรือเท่ากับ 10 องศาเซลเซียส เพื่อไม่ให้โปรตีนในเนื้อปลาสูญเสียคุณสมบัติการเกิดเจล
- น้ำที่ใช้ควรเป็นน้ำอ่อนปราศจากแคลเซียมและแมกนีเซียม ซึ่งเป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงลักษณะเนื้อสัมผัส ส่วนเหล็กและแมงกานีสเป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงสีของซูริมิ
- พีเอชของน้ำควรมีค่าใกล้เคียงกับพีเอชของเนื้อปลา (6.5-7.0) เพื่อคงรักษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากเนื้อปลา

การล้างนับเป็นขั้นตอนที่สำคัญในกระบวนการผลิตซูริมิ ทั้งนี้เนื่องจากเป็นการเพิ่มคุณสมบัติด้านความเหนียว (Gel-forming) ให้แก่ซูริมิได้ วัตถุประสงค์ในการล้างเนื้อปลาบด คือ

- ช่วยเพิ่มความเหนียวให้แก่ผลิตภัณฑ์โดยการล้างเอาโปรตีนที่ไม่ต้องการออก (ส่วนใหญ่ก็คือโปรตีนที่ละลายน้ำได้ ได้แก่ Sarcoplasmic protein)
- เพื่อช่วยกำจัดสิ่งที่ไม่ต้องการต่างๆ เช่น ไขมัน หนัง เลือด เป็นต้น
- ช่วยกำจัดกลิ่นคาวในกรณีที่ปลาไม่สดพอ
- ช่วยให้เนื้อปลาบดไม่สูญเสียคุณสมบัติในระหว่างการเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง

Adu และคณะ (1983) ศึกษาคุณค่าทางโภชนาการและลักษณะเนื้อปลาร็อคฟิชเปรียบเทียบระหว่างเนื้อปลาที่ผ่านการล้างและไม่ผ่านการล้าง พบว่าไม่มีผลต่อปริมาณกรดอะมิโนในเนื้อปลา

Lin และ Park (1996) ได้ทำการเปรียบเทียบน้ำล้างเนื้อปลาที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ต่างๆ กัน ดังนี้ 0, 0.25, 0.5, 1 และ 2% พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ 0% สามารถทำให้โปรตีนที่ละลายน้ำ ได้แก่ โปรตีนซาร์โคพลาสมิก (Sarcoplasmic protein) ละลายออกมาได้ตั้งแต่ช่วงแรกของการล้างในขณะที่โปรตีนไมโอไฟบริลล่าร์ (Myofibrillar proteins) สูญเสียมากขึ้นหลังจากล้างครั้งที่ 2 และการล้างเนื้อปลาที่นานเกินไปจะทำให้สูญเสียโปรตีน

ไมโอไฟบริลล่าร์และทำให้ความชื้นในเนื้อปลาบดเพิ่มขึ้นสำหรับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.25, 0.5 และ 1% ช่วยลดการสูญเสียของโปรตีนไมโอไฟบริลล่าร์ได้ ส่วนความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ 2% สามารถกำจัดโปรตีนที่ละลายน้ำได้น้อยและทำให้โปรตีนไมโอไฟบริลล่าร์สูญเสียมากอีกด้วย ดังนั้นควรเติมโซเดียมคลอไรด์ ในน้ำล้างเนื้อปลาบดที่ความเข้มข้น 0.25-1% เพื่อช่วยกำจัดโปรตีนซาร์โคพลาสมิกและลดการสูญเสียโปรตีนไมโอไฟบริลล่าร์ ซึ่งมีผลดีต่อคุณภาพซูริมิ

1.1.5 การกำจัดน้ำ

หลังจากล้างเนื้อปลาบดแล้วต่อมาคือการกำจัดน้ำออกจากเนื้อปลาบดซึ่งอาจจะใช้เครื่องมือชนิดธรรมดาจนถึงเครื่องมือที่มีราคาสูง เช่น เครื่องทับน้ำโดยใช้แผ่นไม้และใช้แรงอัดจากระบบไฮโดรลิก (Manual hydraulic press) เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) หรือเครื่องอัดแบบเกลียว (Screw press) ซึ่งเป็นที่นิยม เนื้อปลาบดหลังจากกำจัดน้ำออกแล้วควรมีความชื้นประมาณ 80-82%

1.1.6 การกวนและการผสม

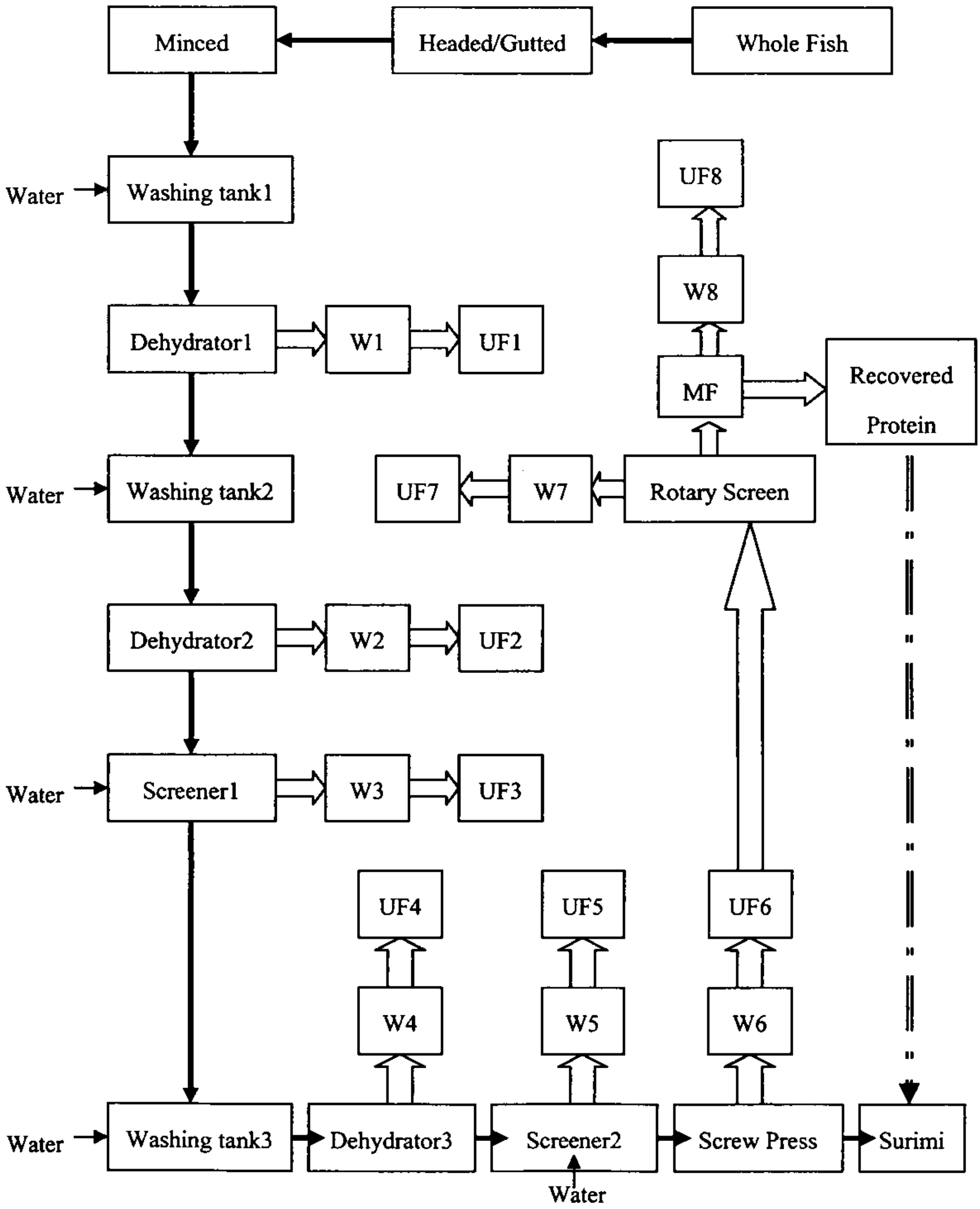
เมื่อได้เนื้อปลาบดแล้วก็นำไปกวนในเครื่องกวนเพื่อผสมกับส่วนผสมต่างๆ เช่น น้ำตาล และโพลีฟอสเฟต ซึ่งช่วยป้องกันการเปลี่ยนสภาพของโปรตีน เกลือ แป้ง สารให้กลิ่น สี และอื่นๆ หลังจากนี้จะเป็นการนำไปทำรูปร่างต่างๆ ตามต้องการ เช่น ลูกชิ้น คามาโบโกะ ปูเทียม เป็นต้น

1.1.7 การเก็บรักษา

ซูริมิที่ได้จะถูกบรรจุในถุงพลาสติกหนา (Polyethylene bag) และแช่เยือกแข็งทันทีที่ –30 องศาเซลเซียส ซึ่งทำให้สามารถลดอุณหภูมิตรงกลางแท่งซูริมิลงเหลือ –20 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 4-6 ชั่วโมง การควบคุมอุณหภูมิระหว่างการเก็บรักษาและการขนส่งเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง ถ้าอุณหภูมิไม่คงที่จะทำให้คุณสมบัติด้านความเหนียวลดลง โดยทั่วไปแล้วซูริมิที่เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส สามารถเก็บไว้ได้นาน 1 ปี

1.2 ขั้นตอนในกระบวนการผลิตซูริมิที่ก่อให้เกิดน้ำทิ้ง

Lin และคณะ (1995) ได้สำรวจน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิแต่ละขั้นตอนโดยแบ่งจุดสำรวจออกเป็น 8 จุด ดังภาพที่ 1-1 คือ น้ำทิ้งจากการล้างเนื้อปลาบด (W1 W2 W4) การแยกน้ำด้วยเครื่องแยกน้ำ (W3 W5) การบีบน้ำส่วนเกินออก (W6) น้ำที่ออกจาก Rotary screen (W7) และน้ำหลังจากออกจาก Rotary screen ที่ผ่านการกรองด้วยระบบไมโครฟิลเตรชัน (W8) และเก็บเกี่ยวโปรตีนจากน้ำทิ้งโดยการกรองด้วยระบบอัลตราฟิลเตรชัน (UF 1-8) ซึ่งทำให้ได้โปรตีนเข้มข้นที่อยู่ในรูปสารละลายและเศษเนื้อปลาบด จากการศึกษาพบว่าการแยกน้ำด้วยเครื่องแยกน้ำ (W3 W5) มีน้ำทิ้งออกมามากกว่าจุดอื่นๆ และได้สรุปว่าน้ำทิ้งจากขั้นตอนการล้างเนื้อปลาบดครั้งที่ 1 จนกระทั่งถึง



ภาพที่ 1-1 กระบวนการผลิตซูริมิและจุดเก็บตัวอย่าง : (W1-W8) จุดเก็บตัวอย่างจากน้ำทิ้ง, (UF) อัลตราฟิลเตรชัน และ (MF) ไมโครฟิลเตรชัน

Figure 1-1 Surimi processing flow and sample collection : (W1-W8) Indicate different wastewater streams, (UF) Ultrafiltration and (MF) Microfiltration.

ที่มา : Lin และคณะ (1995)

ขั้นตอนการบีบน้ำส่วนเกินออกของกระบวนการผลิตซูริมิมีปริมาณ 29.1 ± 3.5 ลิตรต่อซูริมิ 1 กิโลกรัม ซึ่งผลการสำรวจใกล้เคียงกับของ Afonso และ Borquez (2002) ได้กล่าวไว้ว่าการผลิตซูริมิ 1 ตันมีน้ำทิ้งปริมาณ 27 ลูกบาศก์เมตร หรือประมาณ 27 ลิตรต่อซูริมิ 1 กิโลกรัม นับว่าเป็นน้ำทิ้งที่มีปริมาณมากที่ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมตามมาได้ เนื่องจากปัจจุบันประเทศไทยมีการส่งออกซูริมิปีละประมาณ 100,000 ตัน โดยมีโรงงานผลิตซูริมิเกิดขึ้นแล้ว 16 แห่งในประเทศไทย (จุลสารสมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย, 2547) หากคิดอัตราส่วนปริมาณน้ำทิ้งที่เกิดขึ้นเท่ากับประมาณการข้างต้นจะมีน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิถึงปีละกว่า 2,700,000 ลูกบาศก์เมตร

1.3 ลักษณะน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิ

น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิมีค่าซีโอดี (COD) สูงถึง 6,000–27,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งขึ้นอยู่กับว่าเป็นน้ำทิ้งที่ออกมาจากขั้นตอนใด แต่การล้างเนื้อปลาครั้งแรกมีปริมาณโปรตีนในน้ำทิ้งสูงที่สุด ซึ่งในน้ำทิ้งจากการล้างเนื้อปลาครั้งที่ 2 และครั้งที่ 3 มีปริมาณโปรตีนออกมาปริมาณไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1-1 (Lin *et al.*,1995)

Adu และคณะ (1983) พบว่าการล้างเนื้อปลาร็อคฟิชทำให้มีของเสียที่อยู่ในรูปของแข็งแขวนลอยอยู่ในน้ำล้าง 37% และ Pacheco-Aguilar และคณะ (1989) ยังพบว่าในน้ำทิ้งจากการล้างเนื้อปลาแปซิฟิคไวท์ติง มีเศษเหลือในรูปของแข็งประมาณ 40-50% นอกจากนี้ Watanabe และคณะ (1982 อ้างโดย Afonso and Borquez, 2002) กล่าวว่าในน้ำทิ้งมีโปรตีนที่ละลายน้ำประมาณ 2-5 กรัมต่อลิตร โดยโปรตีนเหล่านี้สูญเสียออกมากับการล้างเนื้อปลาบดและการบีบน้ำส่วนเกินออกคิดเป็น 30% ของเนื้อปลาบด เป็นค่าที่ใกล้เคียงกับการรายงานของ Huidobro และคณะ (1998) กล่าวว่าโปรตีนสูญเสียออกมากับน้ำล้างเนื้อปลาบดประมาณ 15-30% ของโปรตีนทั้งหมดในเนื้อปลา

น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิส่วนใหญ่มาจากการล้างเนื้อปลาบดเพื่อกำจัดโปรตีนที่ละลายน้ำ ได้แก่ โปรตีนซาร์โคพลาสมิก เพราะโปรตีนเหล่านี้ไม่มีคุณสมบัติในการเกิดเจล นอกจากนี้เอนไซม์ที่มีอยู่ในกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะโปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งการย่อยสลายโปรตีนที่สำคัญคือโปรตีนไมโอไฟบริลล่าร์ เป็นองค์ประกอบที่จำเป็นในการเกิดเจลจึงทำให้ลักษณะเนื้อสัมผัสของซูริมิที่มีโปรติเอสผสมอยู่ไม่มีความเหนียวยืดหยุ่นและมีคุณภาพต่ำ (จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล, 2541) โปรติเอสส่วนใหญ่ที่พบในน้ำทิ้งของกระบวนการผลิตซูริมิจากปลาแปซิฟิกไวต์ติง มักเป็นชนิด คาเธปซินแอล (Cathepsin L) มีขนาดมวลโมเลกุลเท่ากับ 28.8 kDa มีจุดไอโซอิเลคตริก (Isoelectric point, pI) อยู่ในช่วง 4.91–4.94 นอกจากนี้ยังพบคาเธปซินบี (Cathepsin B) และคาเธปซินเอช (Cathepsin H) ปริมาณเล็กน้อย (Benjakul *et al.*,1996; Mireles DeWitt and Morrissey, 2002a)

ตารางที่ 1-1 ปริมาณและองค์ประกอบของน้ำทิ้งในแต่ละจุดจากกระบวนการผลิตซูริมิ

Table 1-1 Rate and composition of wastewaters collected at different points on surimi processing line.

Waste	Wastewater/ surimi (L/kg)	Moisture (%)	Protein (%)	Nonprotein Nitrogen (%)	Fat (%)	Ash (%)
W1	0.46^{a1}±0.08^{2}	97.10^{a}± 0.04	2.34^{a}± 0.25	0.13^{a}± 0.01	0.19^{a}± 0.01	0.41^{a}± 0.01
W2	3.75^{a}± 0.14	98.78^{b}± 0.05	0.97^{b}± 0.05	0.08^{b}± 0.00	0.11^{b}± 0.01	0.38^{a}± 0.02
W3	10.07^{b}± 1.44	98.87^{c}± 0.01	0.99^{b}± 0.14	0.04^{c}± 0.00	0.06^{cd}± 0.00	0.17^{b}± 0.01
W4	1.65^{a}± 0.49	98.98^{d}± 0.03	0.86^{b}± 0.01	0.05^{c}± 0.00	0.04^{c}± 0.00	0.21^{c}± 0.03
W5	11.02^{b}± 6.86	98.85^{bc}± 0.03	0.99^{b}± 0.01	0.04^{c}± 0.00	0.05^{c}± 0.00	0.09^{d}± 0.01
W6	2.40^{a}± 1.42	99.20^{e}± 0.03	0.89^{b}± 0.01	0.04^{c}± 0.00	0.08^{de}± 0.01	0.14^{be}± 0.00
W7	2.11^{a}± 0.88	99.20^{e}± 0.04	0.46^{c}± 0.06	0.04^{c}± 0.00	0.10^{be}± 0.01	0.12^{e}± 0.01
W8	0.03^{a}± 0.01	99.15^{e}± 0.04	0.54^{c}± 0.02	0.04^{c}± 0.00	0.09^{be}± 0.01	0.11^{de}± 0.01

[1] and [2]: Denote mean and standard deviation respectively.

a, b, c, d: Different letters in the same column indicate significant difference ($p < 0.05$).

W1-W8: Sources of wastewater as illustrated in Figure 1-1.

ที่มา : Lin และคณะ (1995)

Lin และคณะ (1995) พบว่า น้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิส่วนมากมีโปรตีน 2 จำพวกใหญ่ๆ คือพวกโปรตีนซาร์โคพลาสมิกและโปรตีนไมโอไฟบริลล่าร์ ดังภาพที่ 1-2 ซึ่งโปรตีนทั้ง 2 จำพวกนี้เป็นโปรตีนที่พบมากในเนื้อปลา สอดคล้องตามรายงานของ Suzuki (1981) กล่าวว่าโปรตีนในเนื้อปลามีอยู่ 3 ชนิด คือ

- โปรตีนไมโอไฟบริลล่าร์ (Myofibrilla protein) มีอยู่ประมาณ 70–80% ของโปรตีนทั้งหมด มีลักษณะเป็นเส้นใช้ในการยืดหดของกล้ามเนื้อประกอบด้วย แอคติน (Actin) ไมโอซิน (Myosin) โทรโปนิน (Troponin) และแอคตินิน (Actinin) สามารถสกัดได้ด้วยเกลือที่มีไอออนิกสเตรนจ์ (Ionic strength) มากกว่า 0.5

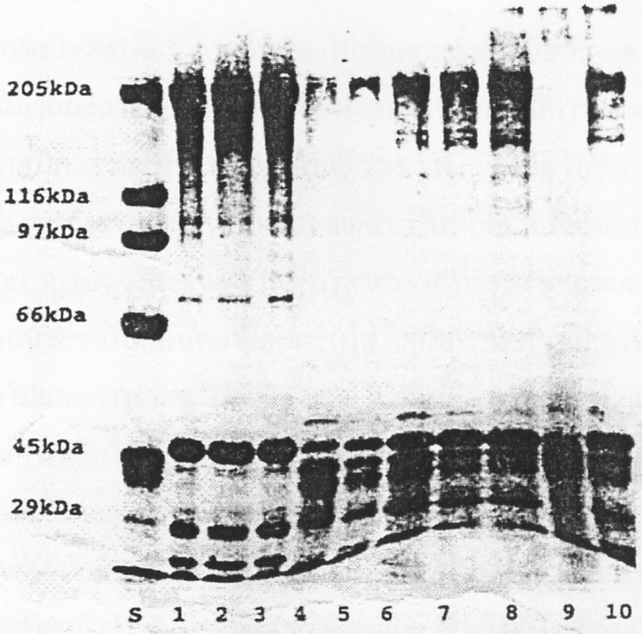
- โปรตีนซาร์โคพลาสมิก (Sarcoplasmic protein) มีอยู่ประมาณ 20–30% ของโปรตีนทั้งหมดประกอบด้วยโปรตีนที่ละลายน้ำ (Water soluble protein) หลายชนิดรวมเรียกว่าไมโอเจน (Myogen) อยู่ในส่วนของซาร์โคพลาสมา สามารถละลายในน้ำหรือสารละลายเกลือเจือจางได้ และตกตะกอนด้วยความร้อน

- สโตรมา (Stroma) เป็นส่วนของกล้ามเนื้อเกี่ยวพันประกอบด้วยคอลลาเจน (Collagen) และ อิลาสติน (Elastin) มีประมาณ 2–3% ในปลากระดูกแข็ง (Teleosts) และ 10% ในปลากระดูกอ่อน (Elasmobrach) โปรตีนชนิดนี้มีคุณสมบัติไม่ละลายในน้ำ ในสารละลายกรดหรือด่างและในน้ำเกลือ แต่ละลายได้ด้วยความร้อน โดยคอลลาเจนเปลี่ยนไปเป็นเจลาตินส่วนอิลาสตินไม่เปลี่ยนแปลง

Lin และ Park (1996) ได้จำแนกโปรตีนในน้ำล้างเนื้อปลาบดในขั้นตอนการผลิตซูริมิ พบว่าโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาด 205 kDa 44.5 kDa และ 36 kDa คือ Myosin haevy chain, Actin และ β-Tropomyosin/Troponin-T ตามลำดับ ซึ่งขนาดโปรตีนที่พบในน้ำล้างเนื้อปลานี้ใกล้เคียงกับการรายงานของ Mireles Dewitt และ Morrissey (2002b) กล่าวว่านอกจากโปรติเอสแล้วยังมีโปรตีนชนิดอื่นๆ ส่วนใหญ่มีขนาดประมาณ 35-205 kDa

1.4 แนวทางการใช้ประโยชน์โปรตีนในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิ

Mireles DeWitt และ Morrissey (2002b) กล่าวว่า ผลผลิตซูริมิที่ผลิตจากปลาแปซิฟิคไวท์ติง คิดเป็น 26% ของวัตถุดิบเท่านั้นที่เหลืออีก 74% เป็นของเสีย ของเสียที่อยู่ในสภาพของแข็งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ ได้ เช่น เป็นอาหารสัตว์ ผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเสท และปุ๋ย เป็นต้น โดยรายงานการวิจัยของ วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร และคณะ (2541) นำเศษเหลือส่วนหัวและไส้ของปลาทรายแดงจากกระบวนการผลิตซูริมิมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเสท เพื่อนำไปผสมในไส้กรอกแฟรงเฟอร์เตอร์หมูในปริมาณ 3% ของน้ำหนักเนื้อหมู พบว่าทำให้โปรตีนในไส้กรอกมีความสามารถในการอุ้มน้ำเพิ่มขึ้น ค่าความคงตัวของอิมัลชันและ ค่าแรงต้านการกดสูงขึ้น ส่วนของเสียจากกระบวนการผลิตซูริมิที่อยู่ในรูปของเหลวมักจะถูกทิ้ง ในความเป็นจริงน้ำทิ้งส่วนนี้ก็ยังคงมีสาร



ภาพที่ 1-2 SDS-PAGE ของโปรตีนในซูริมิ โปรตีนที่เก็บเกี่ยวในกระบวนการผลิตซูริมิ และโปรตีนจากน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตซูริมิ : (S) โปรตีนมาตรฐาน, (1) โปรตีนจากซูริมิ, (2) โปรตีนจาก Rotary screen, (3) โปรตีนจากการเก็บเกี่ยวโดยระบบไมโครฟิลเตรชัน, (4-10) โปรตีนจากการเก็บเกี่ยวโดยระบบอัลตราฟิลเตรชันตามขั้นตอน W1-W8

Figure 1-2 SDS-PAGE of regular surimi, recovered proteins and wastewater concentrations : (S) High molecular weight standard mixture, (1) Regular surimi, (2) The proteins collected by rotary screen, (3) The recovered proteins by microfiltration, (4-10) The UF concentrated proteins from waste streams W1-W8, respectively.

ที่มา : Lin และคณะ (1995)

ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ละลายอยู่ เช่น โปรติเอส โปรตีนซาร์โคพลาสมิก โปรตีนไมโอไฟบริลล่าร์ และสารอื่นๆ อีกมากมายซึ่งควรนำกลับมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มคุณค่าทางเศรษฐกิจแทนที่จะปล่อยน้ำเสียเป็นปัญหาสู่สิ่งแวดล้อม

Lin และคณะ (1995) ศึกษาการเก็บเกี่ยวโปรตีนจากน้ำล้างเนื้อปลาบด พบว่ามีโปรตีนขนาด 29–45 kDa เป็นจำนวนมากละลายอยู่ในน้ำล้างเนื้อปลาบดในขั้นตอนการผลิตซูริมิ โดยส่วนใหญ่เป็นโปรตีนซาร์โคพลาสมิก ส่วนโปรตีนขนาดใหญ่ 205 kDa คือ ไมโอซิน มักไม่พบในน้ำล้างครั้งแรกแต่จะมีมากขึ้นในการล้างครั้งหลังๆ จากการทดลองนำโปรตีนส่วนที่ผ่านการบีบน้ำส่วนเกินออกแล้วทำให้เข้มข้นโดยผ่าน Rotary screen และไมโครฟิลเตรชัน ที่มีรูพรุนของเมมเบรนขนาด 30 และ 50 ไมโครเมตร สามารถนำส่วนรีเทนเททมาผสมกลับใส่ในกระบวนการผลิตซูริมิได้ในปริมาณ 10% โดยที่สีและการเกิดเจลไม่แตกต่างจากซูริมิทั่วไป ส่วนโปรตีนที่ผ่านอัลตราฟิลเตรชันไม่สามารถนำกลับไปผสมในกระบวนการผลิตได้ เนื่องจากมีสีคล้ำและกลิ่นแรงแต่สามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์

Huidobro และคณะ (1998) ศึกษาการเก็บเกี่ยวโปรตีนที่ละลายน้ำจากน้ำล้างเนื้อปลาบด และทดสอบความคงตัวของอิมัลชันจากโปรตีนที่เก็บเกี่ยวได้เพื่อนำกลับมาใช้ในอาหาร พบว่าหลังจากหมุนเหวี่ยงน้ำล้างเนื้อปลาบดแล้วทำให้โปรตีนเข้มข้นด้วยอัลตราฟิลเตรชัน จากนั้นนำไปแช่แข็ง (Frozen) เปรียบเทียบกับการทำแห้ง (Freeze-dired) ผลการทดลองปรากฏว่าโปรตีนที่เก็บเกี่ยวจากอิมัลชันแล้วผ่านกระบวนการทำแห้งจะมีความคงตัวมากกว่าโปรตีนที่เก็บรักษาในรูปของอิมัลชันแช่แข็ง

Benjakul และคณะ (1996) พบว่าในน้ำล้างเนื้อปลาบดมีโปรติเอสชนิดคาเธปซินแอลอยู่จำนวนมาก ต่อมา Mireles DeWitt และ Morrissey (2002a) ได้ศึกษาการเก็บเกี่ยวโปรติเอสจากน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตซูริมิเนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจสูงและนำมาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น นำมาใช้ในกระบวนการการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท (Hydrolysate) การทำให้ใส (Clarification) การหมัก (Fermentation) และการทำให้อ่อนนุ่ม (Tenderization) เป็นต้น

1.5 การเก็บเกี่ยวโปรตีนจากน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตซูริมิ

การเก็บเกี่ยวโปรตีนที่ละลายหรือแขวนลอยอยู่ในของเหลวสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การแยกโดยหมุนเหวี่ยง (Centrifugation) การทำแห้ง (Drum drying) การตกตะกอน (Precipitation) การแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-exchange) การระเหย (Evaporation) การรวมตะกอน (Coagulation/Flocculation) และการลอยตะกอนด้วยอากาศละลาย (Dissolved air flotation:DAF) เป็นต้น (Afonso and Borquez, 2002) ซึ่งจะใช้วิธีใดก็ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมในแต่ละกรณี เนื่องจากวิธีต่างๆ มีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป เช่น การปรับพีเอชเพื่อตกตะกอนโปรตีนเป็นวิธีที่ใช้ต้นทุนต่ำและทำได้ง่ายแต่มักทำให้โปรตีนเสียสภาพ (Nishioka and Shimizu, 1983 อ้างโดย Afonso and Borquez, 2002) ส่วนวิธีแลกเปลี่ยนประจุทำให้ได้ผลิตภัณฑ์โปรตีนที่บริสุทธิ์แต่ทำได้ในปริมาณน้อย (Honer, 1986 อ้างโดย Lin *et al.*, 1995)

กระบวนการกรองโดยใช้เมมเบรนถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นิยมใช้ในการเก็บเกี่ยวโปรตีนในโรงงานอุตสาหกรรมโดยมีข้อได้เปรียบมากกว่าวิธีอื่น (Mulder, 1993; Afonso and Borquez, 2002; Afonso *et al.*, 2004) เนื่องจาก

(1) เก็บเกี่ยวโปรตีนเพื่อนำกลับมาใช้ประโยชน์สามารถทำได้หลายวิธี คือ

- การทำให้เข้มข้น (Concentration) คือการกำจัดตัวทำละลายออกทำให้ได้สารที่ต้องการเข้มข้นขึ้น
- การแยกส่วน (Fractionation) คือการแยกองค์ประกอบที่ต้องการหนึ่งชนิดหรือมากกว่าออกจากสารผสม
- การทำให้บริสุทธิ์ (Purification) คือการกำจัดสารที่ไม่ต้องการออก

(2) ส่วนเพอมิเอทที่ได้สามารถต่อเข้ากับระบบท่อน้ำเพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ในกระบวนการผลิตหรือปล่อยลงสู่ระบบบำบัดน้ำทิ้งได้เลย

(3) เป็นวิธีที่เหมาะสำหรับสารที่ไวต่อการเสียสภาพ เช่น โปรตีน เอนไซม์ ฮอร์โมน เนื่องจากวิธีนี้ไม่จำเป็นต้องใช้ความร้อนและสารเคมี

(4) สามารถใช้ในตัวอย่างที่มีปริมาณมาก ง่ายต่อการขยายระดับการทำงานให้มีขนาดเพิ่มสูงขึ้น (Scale-up)

(5) ดำเนินการได้ทั้งแบบกะ (Batch) และแบบต่อเนื่อง (Continuous)

(6) สามารถใช้ร่วมกับวิธีการอื่นได้

2. การกรองโดยใช้เมมเบรนที่ใช้ความดันเป็นแรงขับ

Howell (1993) กล่าวว่า เมมเบรน คือ ตัวกลางที่กั้นระหว่างของเหลวสองส่วนและทำหน้าที่จำกัดการผ่านของส่วนประกอบในของเหลวนั้น โดยอาศัยแรงขับดันที่ทำให้สารไหลผ่านเมมเบรนและเกิดการแยก เช่น ผลต่างของความเข้มข้น หรือผลต่างของความดัน ที่สำคัญต้องมีคุณสมบัติในการเลือกผ่านสารหนึ่งมากกว่าสารอื่น (Semi-permeable) (รัตนา จิระรัตนานนท์, 2541; Bodalo *et al.*, 2001) เทคโนโลยีการกรองด้วยเมมเบรนถือว่ามีศักยภาพสูงในการบำบัดน้ำเสียรวมถึงการทำให้เข้มข้น การแยกส่วน และทำให้บริสุทธิ์ ได้ทั้งสารที่ละลายและไม่ละลายน้ำ โดยส่วนใหญ่จะใช้งานด้านการเพิ่มคุณค่าของผลิตภัณฑ์และการบำบัดน้ำเสีย (Afonso and Borquez, 2002)

2.1 ชนิดของเมมเบรน

Mulder (1993) แบ่งชนิดของเมมเบรนตามขนาดรูพรุนเป็นชนิดมีรูและไม่มีรูพรุน ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

2.1.1 เมมเบรนแบบมีรูพรุน (Porous membranes) พิจารณาขนาดรูพรุนซึ่งหมายถึงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูหรือความกว้างของช่องเปิด โดย IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry 1985) แบ่งช่วงของขนาดรูออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

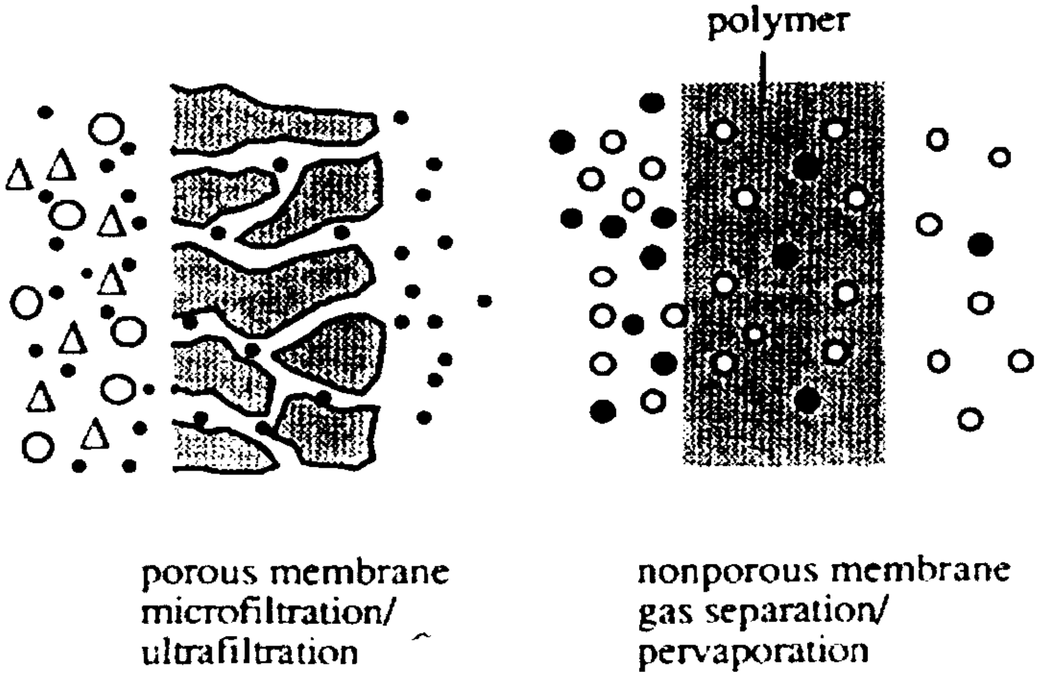
2.1.1.1 Macropores คือ กลุ่มเมมเบรนที่มีขนาดรูพรุนใหญ่กว่า 50 นาโนเมตร นำไปใช้ในกระบวนการไมโครฟิลเตรชัน (Microfiltration)

2.1.1.2 Mesopores คือ กลุ่มเมมเบรนที่มีขนาดพรุนที่อยู่ในช่วง 2-50 นาโนเมตร นำไปใช้ในกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration)

2.1.1.3 Micropores คือ กลุ่มเมมเบรนที่มีขนาดรูพรุนเล็กกว่า 2 นาโนเมตร นำไปใช้ในกระบวนการนาโนฟิลเตรชัน (Nanofiltration) และออสโมซิสผันกลับ (Reverse osmosis)

2.1.2 เมมเบรนแบบไม่มีรูพรุน (Non-porous membrane) หรือเมมเบรนแบบแน่น (Dense membrane) ใช้ในกระบวนการแยกก๊าซ (Gas separation) เพอเวปพอเรชั่น (Pervaporation) ไดอะไลซิส (Dialysis) และอิเลคโตรไดอะไลซิส (Electrodialysis)

ภาพที่ 1-3 เป็นตัวอย่างแสดงให้เห็นความแตกต่างของโครงสร้างภายในของเมมเบรนแบบมีรูพรุนและเมมเบรนไม่มีรูพรุน



ภาพที่ 1-3 แสดงสารผ่านเมมเบรนแบบมีรูพรุนและแบบไม่มีรูพรุน

Figure 1-3 Schematic drawing of a porous and non-porous membrane.

ที่มา : Mulder (1993)

2.2 ประเภทของกระบวนการแยกด้วยเมมเบรน

Donnelly และคณะ (1998), รัตนา จิระรัตนานนท์ (2541) และ ไพศาล วีรกิจ (2544) กล่าวว่ากระบวนการแยกสารตามขนาดของโมเลกุลหรืออนุภาคของตัวถูกละลายจำแนกได้ดังแสดงในภาพที่ 1-4 ดังนี้

2.2.1 ออสโมซิสผันกลับ (Reverse osmosis, RO) หรือเรียกว่า Hyperfiltration เป็นกระบวนการใช้เมมเบรนที่มีโครงสร้างแบบแน่นหรือไม่มีรูพรุน โดยใช้ผลต่างของความดันเป็นแรงขับดันมีความสามารถในการกักกันสารโมเลกุลขนาดเล็กที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 1,000 Da หรือมีขนาด 0.1-1 นาโนเมตร เช่น เกลือ น้ำตาล ออกจากสารละลายโดยยอมให้น้ำผ่านได้ และเนื่องจากสารละลายที่มีตัวถูกละลายที่มีโมเลกุลขนาดเล็กมักมีความดันออสโมติกสูง ทำให้ความดันที่ใช้ในการป้อนสารละลายต้องมีค่าสูงคือ 1-10 MPa หรือ 10-100 atm

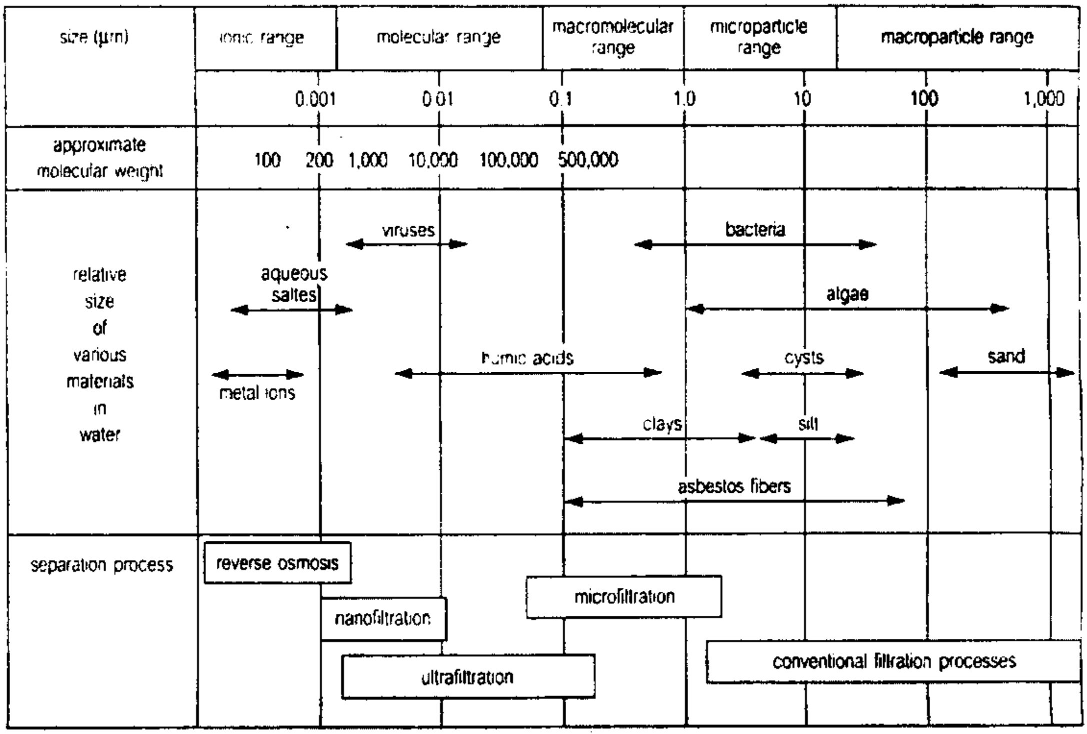
2.2.2 นาโนฟิลเตรชัน (Nanofiltration, NF) เป็นกระบวนการที่ใกล้เคียงกับออสโมซิสผันกลับ มีความสามารถในการกักกันสารโมเลกุลขนาด 1-10 นาโนเมตร ใช้ผลต่างของความดันเป็นแรงขับดันในการแยกสารอนินทรีย์ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดความกระด้างออกจากน้ำ จึงเรียกว่าเมมเบรนทำน้ำอ่อน (Softening membrane)

2.2.3 อัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration, UF) เป็นกระบวนการใช้เมมเบรนที่มีรูพรุนขนาดเล็ก ประมาณ 2-20 นาโนเมตร สำหรับแยกสารโมเลกุลใหญ่ เช่น เอนไซม์ คอลลอยด์ และโปรตีน ออกจากน้ำและสารโมเลกุลเล็ก ตัวอย่างสารละลายที่แยกหรือเพิ่มความเข้มข้นในกระบวนการนี้ ได้แก่ น้ำนม น้ำผลไม้ สารละลายเอนไซม์ สารปฏิชีวนะ และน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม โดยใช้ความดันในการป้อนสารละลายผ่านเมมเบรนประมาณ 100-800 kPa (1-8 atm) เนื่องจากกระบวนการกรองแบบ UF เป็นการแยกสารโมเลกุลใหญ่ ดังนั้นจึงบอกตัวถูกละลายเป็นน้ำหนักโมเลกุลแทนโดยใช้ Molecular weight cut-off (MWCO) เช่น เมมเบรนที่มี MWCO 4,000 Da หมายความว่า ตัวถูกละลายที่น้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 4,000 Da จะถูกกักกันมากกว่า 90% ทำให้ตัวถูกละลายที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่านี้จะผ่านเมมเบรนไปได้บ้างหรือถูกกักกันต่ำกว่า

2.2.4 ไมโครฟิลเตรชัน (Microfiltration, MF) เป็นกระบวนการใช้เมมเบรนที่มีรูพรุนค่อนข้างใหญ่ (0.1-10 ไมโครเมตร) สำหรับแยกสารโมเลกุลใหญ่ๆ สารแขวนลอย หรืออนุภาคเล็กๆ ออกจากของเหลว โดยใช้ผลต่างของความดันเป็นแรงขับดันให้ตัวถูกละลายผ่านเมมเบรนอยู่ในช่วง 100-500 kPa (1-5 atm) การใช้งานที่แพร่หลายคือ การบำบัดน้ำทิ้ง

2.3 รูปแบบการไหลของของเหลวในระบบการกรองด้วยเมมเบรน

Zeman และ Zydney (1996) และรัตนา จิระรัตนานนท์ (2541) อธิบายรูปแบบการไหลของของเหลวในระบบการกรองด้วยเมมเบรน ดังนี้



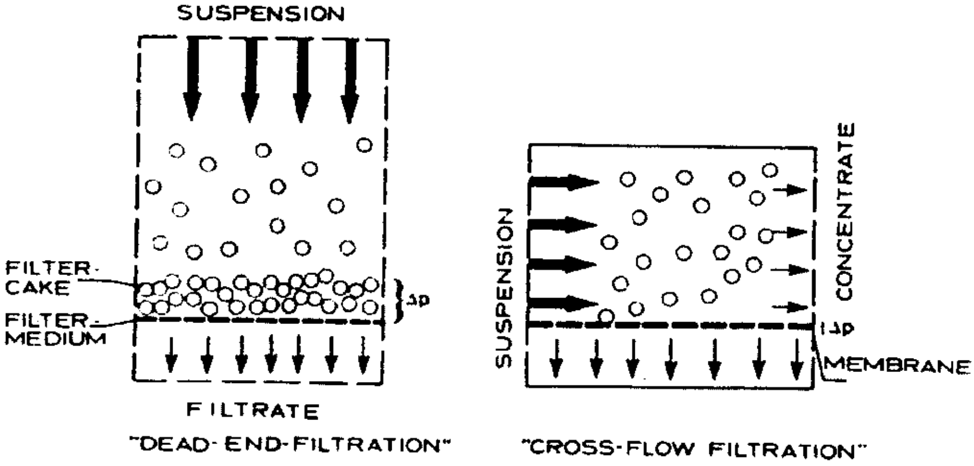
ภาพที่ 1-4 ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดสารที่ถูกกรองและประเภทการกรอง

Figure 1-4 The approximate pore size ranges of different types of synthetic membranes, compared to dimensions of some components separated by membrane process.

ที่มา : ไพศาล วีรกิจ (2544)

2.3.1 กระบวนการกรองโดยใช้ความดันแบบปิดตาย (Dead-end filtration) ซึ่งเป็นการป้อนสารละลายในทิศทางที่ตั้งฉากกับเมมเบรน ดังภาพที่ 1-5 การสะสมของอนุภาคบนผิวเมมเบรน เรียกว่าเคก (Cake) การสะสมของเคกทำให้ความต้านทานการไหลเพิ่มขึ้นตามเวลาของการกรองและทำให้อัตราการไหล (Flux) ผ่านเมมเบรนลดลงอย่างรวดเร็ว การกรองแบบปิดตายเหมาะสำหรับการกรองสารละลายที่ประกอบด้วยอนุภาคขนาดเล็ก ปริมาณน้อย มีความเข้มข้นต่ำ และดำเนินงานแบบกะ

2.3.2 กระบวนการกรองสารโดยใช้ความดันแบบไหลขวาง (Cross-flow filtration) ซึ่งเป็นการป้อนสารละลายขนานกับเมมเบรนหรือตั้งฉากกับทิศทางการไหลของเพอมิเอท ดังภาพที่ 1-5 การป้อนสารละลายแบบไหลขวางมีผลของแรงเฉือน ทำให้สารละลายที่ป้อนเข้าระบบกรองช่วยกวาดอนุภาคออกจากผิวหน้าของเมมเบรน เกิดการสะสมของเคกเพียงบางๆ เท่านั้น การลดลงของฟลักซ์เกิดขึ้นไม่มากจึงเหมาะสำหรับการกรองสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง



ภาพที่ 1-5 เปรียบเทียบการกรองแบบปิดตาย (Dead-end) และไหลขวาง (Cross-flow)

Figure 1-5 Comparison of filtration principles between dead-end and cross-flow.

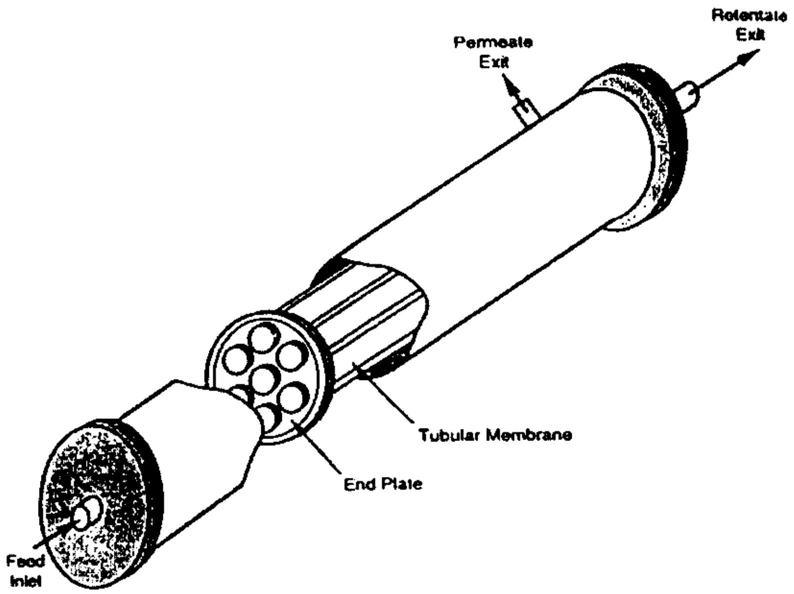
ที่มา : Kroner และคณะ (1984)

2.4 รูปแบบของเมมเบรน

Zeman และ Zydney (1996) สรุปว่าเมมเบรนที่นิยมใช้ในระบบต่างๆ มีหลายรูปแบบ ดังแสดงในภาพที่ 1-6 ถึง 1-9 ได้แก่

2.4.1 เมมเบรนแบบท่อ (Tubular module)

มีลักษณะเป็นท่อทรงกระบอก ส่วนใหญ่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในประมาณ 0.3-2.5 เซนติเมตร โดยสารละลายจะไหลผ่านภายในท่อ ผนังภายในท่อจะเป็นเมมเบรน ของเหลวสามารถซึมผ่านออกมาได้และถูกเก็บไว้ที่บริเวณรอบๆ ท่อ ดังนั้นตัวท่อเองจะต้องแข็งแรงพอหรืออาจจะต้องใช้วัสดุจากภายนอกมาเสริมเพื่อความแข็งแรงด้วย ข้อดีของเมมเบรนแบบท่อคือสามารถทำให้สารละลายเข้มข้นขึ้นหรือเพิ่มความหนืดมากขึ้นได้ โดยไม่ทำให้เมมเบรนอุดตันหรือสามารถทำความสะอาดได้ง่ายเนื่องจากเป็นการไหลภายในช่องกลมที่มีขนาดไม่เล็กมาก ทั้งยังสามารถตรวจสอบและดูแลได้ง่ายด้วย แต่มีข้อเสียคือมีพื้นที่ส่วนที่เป็นเมมเบรนน้อยเมื่อเทียบกับพื้นที่ทั้งหมด และอาจต้องเสียค่าใช้จ่ายมากขึ้นในส่วนของวัสดุที่นำมาเสริมความแข็งแรงให้เมมเบรน



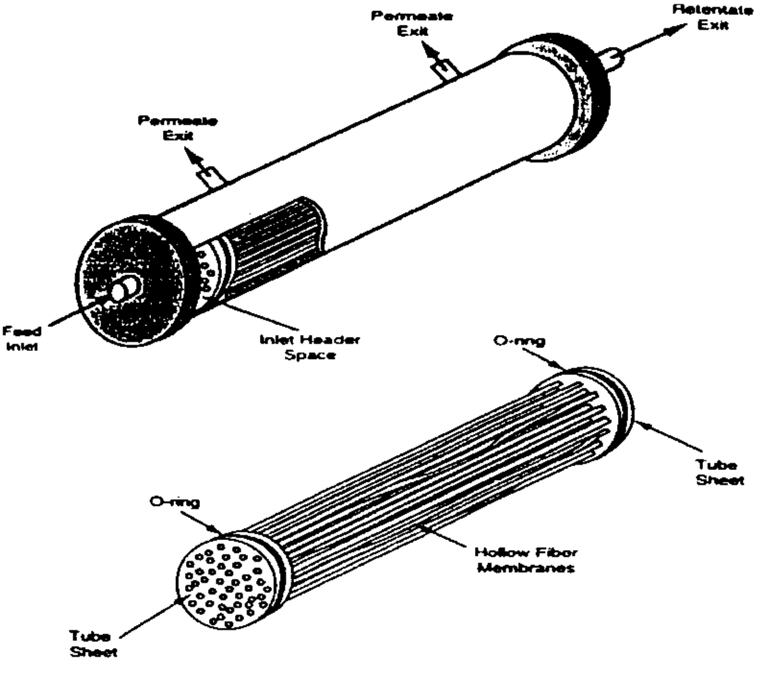
ภาพที่ 1-6 เมมเบรนแบบท่อ

Figure 1-6 Schematic representation of the tubular membrane module.

ที่มา : Zeman และ Zydney (1996)

2.4.2 เมมเบรนแบบเส้นใยกลวง (Hollow fiber module)

เป็นแบบที่มีความแข็งแรงและทนต่อแรงดันได้ดีพอสมควร มีลักษณะเป็นท่อขนาดเล็กที่ทำด้วยไฟเบอร์เป็นจำนวนมากเรียงตัวขนานกันอยู่และบรรจุอยู่ในท่อที่ทำด้วยเรซิน (Resin) มีการป้อนสารเข้าที่ปลายด้านหนึ่งและสารละลายเข้มข้นจะไหลออกทางด้านตรงกันข้าม สามารถใช้ได้กับระบบไมโครฟิลเตรชันและอัลตราฟิลเตรชัน โดยสารละลายจะไหลภายใต้ความดันไปในช่องที่เจาะไว้ ส่วนที่ซึมผ่านได้จะถูกแยกออกมาข้างนอก เส้นผ่านศูนย์กลางภายในของแต่ละท่อมีขนาดประมาณ 200-500 ไมโครเมตร ความหนาของเส้นใยอยู่ระหว่าง 200 ไมโครเมตร ถ้าใช้เส้นใยที่มีขนาดใหญ่ขึ้น คือมีเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.5-1.0 มิลลิเมตร จะเรียกว่าแบบคาพิลารี (Capillary) การนำแผ่นเมมเบรนแบบนี้ไปใช้อาจต้องมีการปรับสภาพของสารละลายก่อนนำเข้าไปกรอง เนื่องจากเมมเบรนแบบนี้ไวต่อการอุดตันมาก ข้อดีคือสามารถทำความสะอาดได้โดยการผ่านน้ำเข้าไปช่วยขับสิ่งสกปรกต่างๆ ที่ติดอยู่บนไฟเบอร์ของเมมเบรนออกไป ข้อเสียคือเส้นใยมักจะแตกง่าย



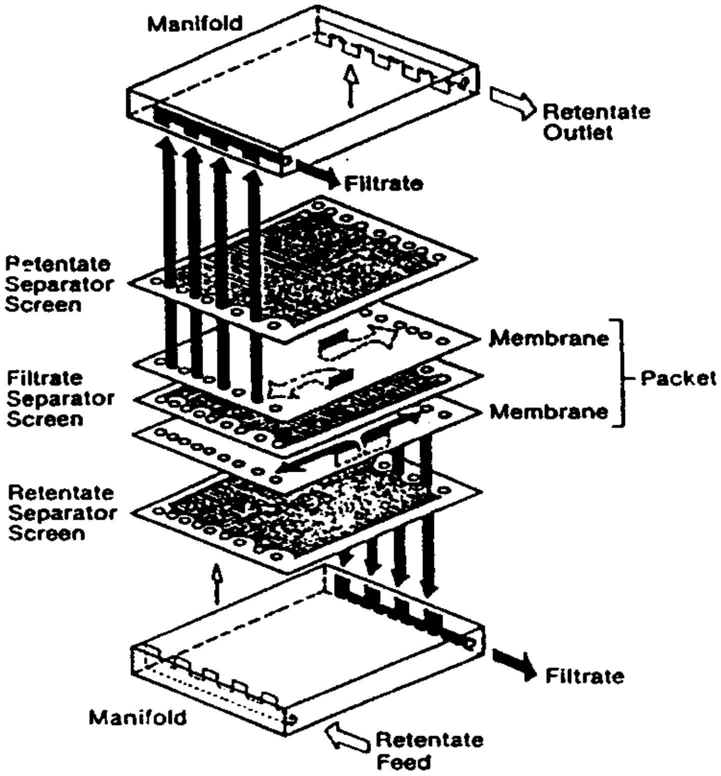
ภาพที่ 1-7 เมมเบรนแบบเส้นใยกลวง

Figure 1-7 Schematic representation of the hollow fiber membrane module.

ที่มา : Zeman และ Zydney (1996)

2.4.3 เมมเบรนแบบแผ่นและมีกรอบ (Plate and frame module)

มีลักษณะเป็นแผ่นแบนวางอยู่ระหว่างแผ่นโครงที่ใช้เป็นช่องทางให้สารละลายไหลผ่าน ช่องนี้มีความสูงประมาณ 0.03-0.1 เซนติเมตร เมมเบรนและวัสดุที่เสริมเพื่อให้ความแข็งแรงจะประกบติดกัน การที่ต้องใช้วัสดุเพิ่มความแข็งแรงเนื่องจากในกระบวนการทำงานต้องใช้ความดันสูง ข้อดีคือสามารถเปลี่ยนเมมเบรนได้ง่าย ข้อเสียคือใช้แรงมากในการทำความสะอาดและการเคลื่อนย้าย



ภาพที่ 1-8 เมมเบรนแบบแผ่นและมีกรอบ

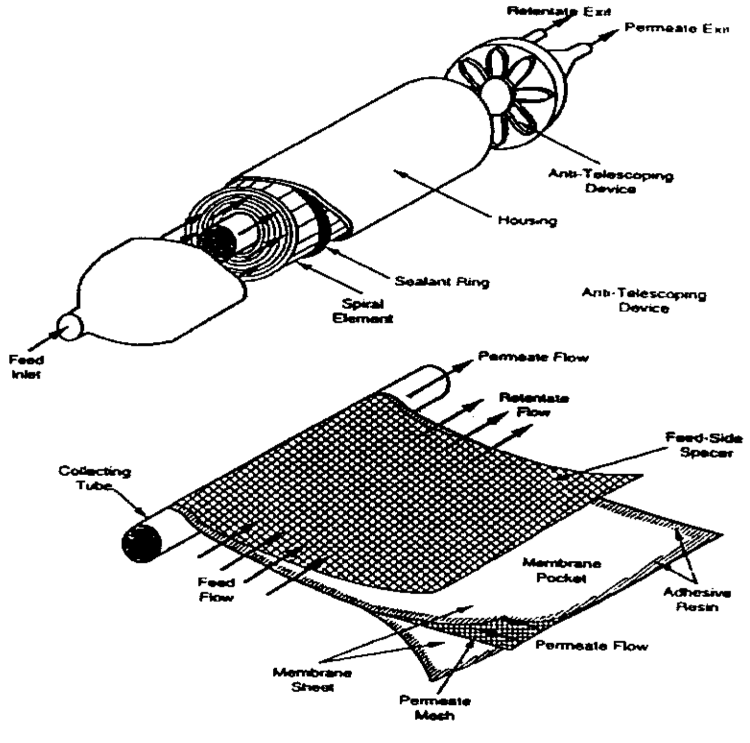
Figure 1-8 Schematic representation of the plate-and-frame module.

ที่มา : Zeman และ Zydney (1996)

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

2.4.4 เมมเบรนแบบท่อม้วน (Spiral wounded module)

มีลักษณะคล้ายท่อโดยมีเมมเบรนหุ้มอยู่เป็นชั้นๆ รอบๆ ของเหลวจะไหลผ่านท่อที่อยู่ตรงกลางแล้วจะซึมผ่านชั้นของเมมเบรนทำให้เกิดการแยก ในระบบอัลตราฟิลเตรชันนั้นเมมเบรนจะมีความหนาประมาณ 0.0075-0.015 เซนติเมตร ข้อดีคือเมมเบรนแบบนี้มีความแข็งแรงสามารถใช้กับกระบวนการที่ต้องการความดันสูงๆ ได้และง่ายต่อการเปลี่ยนเมมเบรน ข้อเสียคือถ้าใช้สารละลายที่มีอนุภาคแขวนลอยจะเกิดการอุดตันของระบบได้ง่าย เนื่องจากอนุภาคของแข็งไปอุดตันทำให้การไหลเกิดได้ยากขึ้น



ภาพที่ 1-9 เมมเบรนแบบท่อม้วน

Figure 1-9 Schematic representation of the spiral wound module.

ที่มา : Zeman และ Zydney (1996)

2.5 ข้อดีของกระบวนการกรองด้วยเมมเบรน

รัตนา จิระรัตนานนท์ (2541) สรุปข้อดีของการกรองด้วยเมมเบรนไว้ดังนี้

2.5.1 เป็นกระบวนการแยกตามขนาดโมเลกุล (หรือรูปร่าง ชนิดของประจุ) ซึ่งสามารถทำให้ดำเนินการที่อุณหภูมิปกติ จึงเหมาะสำหรับการแยกสารที่อาจเสื่อมสภาพเพราะความร้อนได้

2.5.2 กระบวนการกรองด้วยเมมเบรนส่วนใหญ่ใช้พลังงานค่อนข้างต่ำ เพราะสามารถแยกได้โดยไม่ต้องเปลี่ยนเฟส เช่น กระบวนการแยกเกลือจากน้ำกร่อยหรือน้ำทะเล ถ้าใช้ออสโมซิสแบบผันกลับจะมีข้อได้เปรียบทางด้านพลังงานที่ต้องการต่ำกว่าการกลั่นหรือการต้มระเหย

2.5.3 ไม่ก่อให้เกิดของเหลือทิ้งเพราะผลิตภัณฑ์ที่แยกได้สามารถใช้ประโยชน์ได้ทั้งส่วนเพอมิเอท และรีเทนเทท ตัวอย่างเช่น การผลิตน้ำสะอาดจากน้ำทะเล ได้เพอมิเอท คือ น้ำจืด ส่วนสารละลายเกลือเข้มข้นสามารถนำไปต้มระเหย ตกผลึก เพื่อผลิตเกลือ หรือในการบำบัดน้ำทิ้งบางชนิดได้น้ำสะอาดกลับไปใช้ในกระบวนการ และได้ผลิตภัณฑ์เข้มข้นซึ่งใช้ประโยชน์ต่อไปได้

2.5.4 สามารถขยายขนาดจากระดับต้นแบบให้เป็นระดับอุตสาหกรรมได้ไม่ยาก เนื่องจากเมมเบรนมีลักษณะเป็นชุด (Modular) หรือหน่วย และสามารถนำหน่วยย่อยๆ มาต่อกันเพื่อเพิ่มพื้นที่ในการแยก

2.5.5 สามารถดำเนินการแบบกะ (Batch) หรือแบบต่อเนื่อง (Continuous) ตลอดจนติดตั้งระบบควบคุมการทำงานอัตโนมัติได้ไม่ยาก

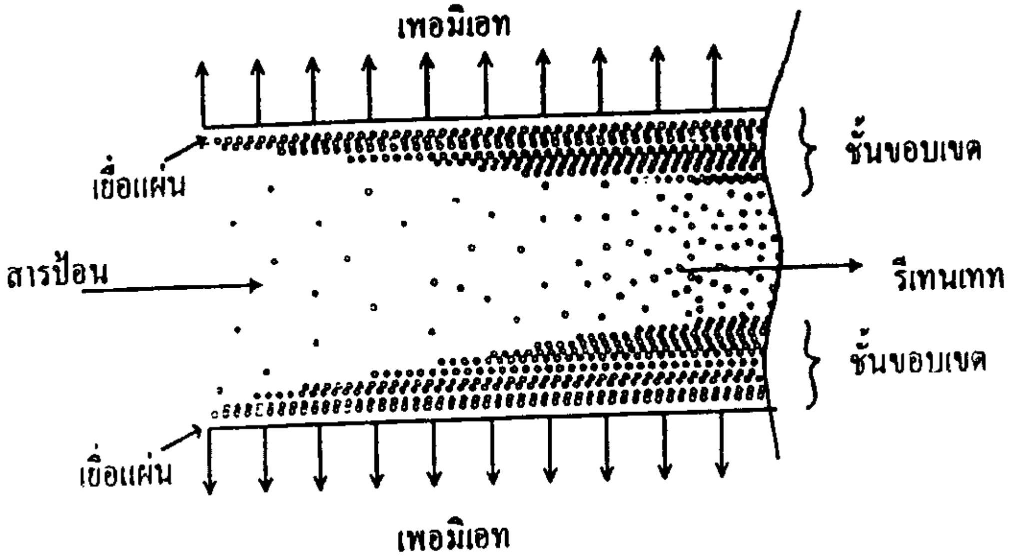
2.5.6 มีขนาดกะทัดรัดไม่เปลืองพื้นที่เพราะชุดอุปกรณ์มีการออกแบบให้มีพื้นที่ในการกรองต่อหน่วยปริมาตรของอุปกรณ์สูง

2.6 ข้อจำกัดของกระบวนการกรองด้วยเมมเบรน

แม้ว่าการกรองด้วยเมมเบรนจะมีข้อดีหลายประการแต่ก็มีข้อจำกัดในการใช้งาน ข้อจำกัดเหล่านั้นได้แก่ (Donnelly *et al.*, 1998; รัตนา จิระรัตนานนท์, 2541)

2.6.1 ความคงตัวของเมมเบรน ส่วนใหญ่เมมเบรนที่ผลิตจากโพลิเมอร์มีความคงตัวจำกัด เช่น เมมเบรนจำพวกเซลลูโลส (Cellulosics) คงตัวช่วงพีเอช 4-8 ส่วนโพลีซัลโฟน (Polysulfone) สามารถใช้งานในช่วงกว้างกว่า คือพีเอช 1-13 นอกจากนี้อุณหภูมิก็มีผลต่อเมมเบรน ในปัจจุบันมีการพัฒนาเมมเบรนโพลิเมอร์ที่ทนอุณหภูมิได้สูง 60-80 องศาเซลเซียส เมมเบรนบางชนิดไม่ทนต่อคลอรีนหรือตัวทำละลายอินทรีย์ ส่วนเมมเบรนที่ทำจากเซรามิกส์ (Ceramics) มีความคงตัวต่ออุณหภูมิและสารเคมีดีมากสามารถฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำได้ ทนต่อจุลินทรีย์ แต่ความสามารถในการแยกสารด้อยกว่าเมมเบรนที่ทำจากโพลิเมอร์ การพัฒนายังค่อนข้างจำกัดและราคาแพง

2.6.2 คอนเซนเตรชันโพลาไรเซชัน (Concentration polarization, *CP*) หมายถึง การสะสมของโมเลกุลหรืออนุภาคของตัวถูกละลายที่ไม่สามารถผ่านเมมเบรนได้ทำให้ความเข้มข้นของบริเวณผิวหน้าเมมเบรนสูงกว่าในสารละลายบริเวณที่อยู่ห่างออกไป (Bulk solution) ดังภาพที่ 1-10 ซึ่งความเข้มข้นของคอนเซนเตรชันโพลาไรเซชันจะทำให้ลดสมรรถนะของการแยกทั้งในแง่ของฟลักซ์และการกักกัน เพราะส่งผล (ต่อเนื่อง) ให้เกิดฟาวลิ่ง การลดคอนเซนเตรชันโพลาไรเซชันในระดับหนึ่งทำได้โดยการออกแบบอุปกรณ์ให้มีการป้อนสารผ่านเมมเบรนแบบไหลขวางด้วยความเร็วสูงซึ่งจะช่วยให้ตัวถูกละลายที่สะสมบริเวณผิวหน้าเมมเบรนเกิดการแพร่กลับไปยังสารละลายบริเวณที่อยู่ห่างออกไป



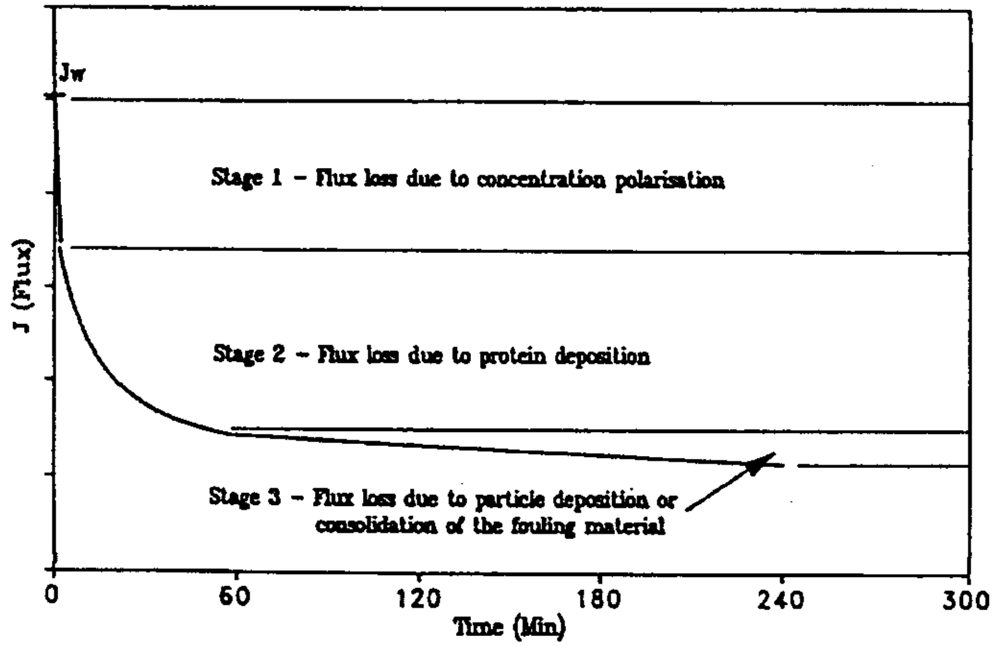
ภาพที่ 1-10 แสดงการเกิดคอนเซนเตรชันโพลาไรเซชัน

Figure 1-10 Concentration polarization.

ที่มา : รัตนา จิระรัตนานนท์ (2541)

2.6.3 ฟาวลิ่ง (Fouling) หมายถึง การสะสม/อุดตันของตัวถูกละลาย ทั้งบนผิวหน้าเมมเบรนและภายในรูพรุน ซึ่งทำให้ฟลักซ์ลดลงและการกักกันโมเลกุลเปลี่ยนแปลง (อาจลดลงหรือเพิ่มขึ้น) ฟาวลิ่งเกิดด้วยกลไกที่ซับซ้อนขึ้นอยู่กับลักษณะของเมมเบรนและสารละลาย สิ่งสะสมและอุดตันจะไม่สามารถล้างออกได้ด้วยน้ำ ต้องล้างทำความสะอาดด้วยสารเคมีที่เหมาะสม การเกิดฟาวลิ่งมีผลต่อสมรรถนะของกระบวนการกรองด้วยเมมเบรนจึงมีนักวิจัยศึกษาเรื่องนี้กันมาก

Hallstrom และคณะ (1989 อ้างโดย Marshall *et al.*, 1993) กล่าวว่าจากกราฟภาพที่ 1-11 เป็นค่าฟลักซ์ของการเกิดฟาวลิ่ง เนื่องจากโปรตีน แบ่งออกได้เป็น 3 ระยะ คือ (1) สารละลายโปรตีนรวมเป็นตะกอนและไหลเข้าไปอุดในรูพรุนทำให้ลดขนาดของรูพรุนของเมมเบรน เกิดความต้านทานการไหลอย่างรวดเร็ว ค่าฟลักซ์จึงลดลงทันทีตั้งแต่นาทีแรกของการกรอง (2) เกิดการรวมตะกอนขึ้นทับบนตะกอนที่เกิดจากระยะที่ 1 ทำให้เกิดความต้านทานการไหลของเมมเบรนขึ้นอย่างช้าๆ ในช่วงแรกของกระบวนการกรอง ค่าฟลักซ์จึงลดลงต่อเนื่องอย่างชัดเจน และ (3) ในระยะสุดท้ายเมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้น การอุดตันในรูพรุนเกิดขึ้นต่อเนื่องและการสะสมของโปรตีนบนผิวของเมมเบรนอย่างสมบูรณ์ ค่าฟลักซ์จึงค่อนข้างคงที่



ภาพที่ 1-11 แสดงการลดลงของฟลักซ์ในขณะกรองสารละลายโปรตีน

Figure 1-11 Various stages of flux decline during protein filtration.

ที่มา : Marshall และคณะ (1993)

2.7 การล้างและทำความสะอาดเมมเบรน

Zeman และ Zydney (1996) และ รัตนา จิระรัตนานนท์ (2541) กล่าวว่าการนำเมมเบรนไปใช้งานในการแยกสารละลาย เช่น กระบวนการออสโมซิสแบบผันกลับ อัลตราฟิลเตรชัน และไมโครฟิลเตรชัน ถึงแม้จะมีการบำบัดเบื้องต้น (Pretreatment) เพื่อแยกองค์ประกอบที่อาจก่อให้เกิดความเสียหายต่อเมมเบรนและมีการออกแบบหน่วยอุปกรณ์ตลอดจนเลือกสภาวะดำเนินการที่ลดการเกิดคอนเซนเตรชันโพลาไรเซชัน ก็ยังพบว่ามีการเกิดฟาวลิ่ง ดังนั้นจึงต้องมีความจำเป็นต้องทำความสะอาดเมมเบรนด้วยวิธีที่เหมาะสมเป็นระยะๆ เพื่อให้เมมเบรนมีสภาพใกล้เคียงเมมเบรนใหม่มากที่สุดและยืดอายุการใช้งาน ดังนั้นหลังทำการทดลองทุกครั้งจะต้องล้างทำความสะอาดเมมเบรน Mohammadi และคณะ (2002) ศึกษาการล้างเมมเบรน พบว่าหลังจากการใช้เมมเบรนโพลีซัลโฟน กรองโปรตีนนมแล้วล้างด้วยน้ำสะอาดเป็นเวลานาน 20 นาที ก็เพียงพอแล้ว ต่อจากนั้นทำการล้างด้วยสารเคมีที่ใช้ในการทำความสะอาด ซึ่งควรล้างด้วยสารละลายด่างก่อนแล้วจึงล้างด้วยสารละลายกรดอีกครั้งหนึ่ง

การเลือกวิธีการล้างและทำความสะอาดเมมเบรนต้องพิจารณาชนิดของสารอุดตัน (Foulant) วัสดุที่ผลิตเป็นเมมเบรน และแบบของอุปกรณ์ตลอดจนค่าใช้จ่ายและระยะเวลาในการล้าง ประกอบด้วยวิธีทำความสะอาดแบ่งออกเป็น 2 วิธีหลัก ได้แก่ วิธีกายภาพและวิธีเคมี

2.7.1 วิธีกายภาพ (Physical methods) หมายถึง การทำความสะอาดที่ใช้ การเปลี่ยนแปลงสภาวะการทำงานเป็นหลัก เช่น การเพิ่มอัตราการไหล ซึ่งจะเพิ่มแรงเฉือนที่ผิวหน้าเมมเบรน แต่ก็ลดการสะสมหรืออุดตันได้ระดับหนึ่งเท่านั้น วิธีที่อ้างถึงกันอยู่เสมอ คือ การขูดชั้นที่สะสมออกจากผิวหน้าเมมเบรนด้วยฟองน้ำที่ทำให้มีลักษณะเป็นลูกกลมๆ (Sponge balls) ใช้กับเมมเบรนแบบท่อโดยการใส่ก้อนฟองน้ำที่มีขนาดพอๆ กับเส้นผ่านศูนย์กลางของท่อเข้าไปในน้ำหรือสารละลายที่ปล่อยให้ไหลผ่านเมมเบรนเพื่อให้ก้อนฟองน้ำขูดชั้นเคกที่สะสมออก แต่ปัจจุบันวิธีดังกล่าวไม่มีการใช้กันเลย เนื่องจากต้องใช้แรงดันสูงและสร้างความเสียหายให้แก่เมมเบรนได้ง่าย

2.7.2 วิธีเคมี (Chemical methods) การทำความสะอาดเมมเบรนด้วยวิธีเคมี สารเคมีอาจช่วยให้มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพโดยสารเคมีอาจทำให้สารอุดตันพองตัว หดตัว ละลาย เกิดการหลุดออก (Desorption) หรือสารเคมีที่ใช้อาจทำปฏิกริยากับสารอุดตัน เช่น ทำให้เกิดไฮโดรไลซิส การย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีน และการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน เป็นต้น สารเคมีที่ใช้ควรมีคุณสมบัติดังนี้

- สามารถละลายสารอุดตันหรือทำให้สารอุดตันเกาะตัวกันน้อยลงด้วยกลไกทางกายภาพหรือทางเคมี
- รักษาสภาพการกระจายตัวของสารอุดตันไม่ให้กลับไปสะสมอีก
- ไม่เป็นสารที่ก่อให้เกิดการอุดตันเสียเอง
- ไม่ทำให้เมมเบรนเสื่อมสภาพ

การล้างบางครั้งต้องใช้เวลานานทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะของสารละลายและเมมเบรน อาจมีความจำเป็นจะต้องใช้สารทำความสะอาดมากกว่า 1 ชนิด เช่นถ้าสารอุดตันมีทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์ก็ควรล้างด้วยทั้งกรดและด่าง และอาจจำเป็นต้องล้างมากกว่า 1 รอบ เพื่อให้เมมเบรนมีสมรรถนะกลับไปใกล้เคียงกับก่อนเริ่มการใช้งานมากที่สุดจึงจำเป็นต้องศึกษาเป็นแต่ละกรณีไป วิธีปฏิบัติให้ใช้ค่าฟลักซ์ของน้ำที่สภาวะหนึ่งๆ เป็นค่าอ้างอิง เมื่อทราบฟลักซ์ของเมมเบรนใหม่แล้ว หลังจากผ่านขั้นตอนการล้างแล้วจึงจำเป็นต้องทดสอบฟลักซ์ของน้ำหลังจากการล้าง ค่าฟลักซ์ของน้ำควรมีค่าสูงกว่า 85% ของค่าเริ่มต้น ขั้นตอนการล้างที่ปฏิบัติโดยทั่วไปมีดังนี้

1. นำสารละลายออกจากระบบ
2. ล้างทิ้ง (Rinse) ด้วยน้ำสะอาด
3. ล้างด้วยสารทำความสะอาดในลักษณะไหลวนอยู่ในระบบ ถ้าใช้สารทำความสะอาดมากกว่า 1 ชนิดต้องทำซ้ำในขั้นตอนนี้
4. ล้างทิ้งด้วยน้ำเพื่อกำจัดสารทำความสะอาด ทดสอบฟลักซ์ของน้ำถ้ายังไม่ได้ค่าที่พอใจ (เช่น 85% ของค่าเริ่มต้น) ให้ทำซ้ำข้อ 3-4

นอกจากขั้นตอนการล้างเมมเบรนแล้วยังต้องพิจารณาเวลาในการล้างของแต่ละขั้นตอน ซึ่งสามารถสังเกตได้จากสารละลายหรือน้ำในขณะที่ล้างทิ้งหรือล้างแบบไหลวนว่ามีความขุ่น-ใสเป็นอย่างไร เพราะความขุ่น-ใส ช่วยบอกให้ทราบว่ากระบวนการล้างสามารถแยกสารอุดตันออกได้เพียงใด นอกจากนี้สภาวะในการล้างซึ่งหมายถึงความเร็วในการป้อนสารทำความสะอาดผ่านเมมเบรน ความดันในการป้อนสารทำความสะอาดตลอดจนอุณหภูมิก็มีความสำคัญ การล้างที่ความเร็วสูงความดันต่ำให้ประสิทธิภาพในการล้างดีกว่าเพราะที่ความเร็วสูงแรงเฉือนระหว่างสารละลายและเมมเบรนช่วยให้สารอุดตันหลุดออก ที่ความดันต่ำช่วยไม่ให้เกิดการอัดตัวแน่นของสารอุดตันหรือการสะสมกลับเข้าไปในเมมเบรน การล้างที่อุณหภูมิสูงช่วยให้ละลายสารอุดตันได้ดีขึ้นโดยต้องพิจารณาความคงทนต่ออุณหภูมิของเมมเบรน

ตัวอย่างขั้นตอนการทำความสะอาดเมมเบรนชนิดโพลิซัลโฟนที่ใช้เพิ่มความเข้มข้นโปรตีนในน้ำนมที่ใช้ในโรงงานแห่งหนึ่งมีดังนี้

- ล้างด้วยน้ำที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
- ล้างโดยใช้สารละลายด่างไหลวนที่ 60-75 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 30-60 นาที
- ล้างทิ้งด้วยน้ำ 10 นาที
- ล้างด้วยสารละลายกรดที่ 50-60 องศาเซลเซียส นาน 20-60 นาที
- ล้างทิ้งด้วยน้ำ 10 นาที
- ล้างด้วยสารละลายด่างไหลวน ที่ 60-75 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 15-30 นาที
- ล้างทิ้งด้วยน้ำ 10 นาที

เนื่องจากกระบวนการกรองด้วยเมมเบรนส่วนใหญ่ใช้เพกสารละลายที่มีน้ำเป็นองค์ประกอบและต้องใช้น้ำปริมาณมากในการล้างตลอดจนการเก็บรักษา ดังนั้นคุณภาพของน้ำจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง ซึ่งถ้าจะให้เหมาะสมและป้องกันการเกิดฟาวลิ่งเนื่องจากสิ่งเจือปนในน้ำ การล้างจึงควรใช้น้ำกลั่นหรือน้ำที่ผ่านกระบวนการออสโมซิสแบบผันกลับเท่านั้น นอกจากนี้คอลลอยด์และแบคทีเรียจำนวนเล็กน้อยในน้ำยังสามารถทำให้ค่าการซึมผ่านของเมมเบรนลดลง ฟลักซ์ของน้ำจึงลดลงเมื่อเทียบกับเวลา ตัวอย่างเช่น การใช้น้ำกลั่นมาตรฐานทำให้ฟลักซ์ของน้ำลดลง 10% คุณภาพของน้ำที่เหมาะสมที่เสนอโดย DDS (ผู้ผลิตและจำหน่ายออสโมซิสแบบผันกลับและอัลตราฟิลเตรชันประเทศเดนมาร์ก) มีส่วนประกอบดังนี้

เหล็ก	<	0.05 ppm
แมงกานีส	<	0.02 ppm
ซิลิก้า	<	5 ppm
ความกระด้าง	<	20 (German degree)
อนุภาค	<	25 μm
Plate count	<	1000 ต่อ 1 ml
Coli count		0 ต่อ 100 ml

การล้างทำความสะอาดเมมเบรนเป็นสิ่งสำคัญมากที่ผู้จำหน่ายและผู้ใช้ต้องมีความรู้ความเข้าใจอย่างดี มิฉะนั้นจะทำให้กระบวนการใช้เมมเบรนมีสมรรถนะต่ำและไม่คุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์

2.8 การประยุกต์ใช้การกรองด้วยเมมเบรนในการเก็บเกี่ยวโปรตีน

อัลตราฟิลเตรชันและไมโครฟิลเตรชันเป็นกระบวนการที่นิยมใช้ในการเก็บเกี่ยวโปรตีนหรือเพื่อทำให้สารละลายเข้มข้นมากขึ้น การแยกส่วน และทำให้บริสุทธิ์ มีงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้เทคโนโลยีการกรองในโรงงานอุตสาหกรรมเป็นจำนวนมากส่วนใหญ่เกี่ยวกับอาหาร เช่น อุตสาหกรรมนมอาหารทะเล เครื่องดื่ม น้ำผลไม้ เพื่อช่วยลดต้นทุนและปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์ อีกทั้งยังสามารถใช้ร่วมกับวิธีอื่นๆ ได้ด้วย (Donnelly *et al.*, 1998)

อัลตราฟิลเตรชันและไมโครฟิลเตรชัน ยังสามารถประยุกต์ใช้กับระบบบำบัดน้ำทิ้ง เช่น Lin และคณะ (1995) ศึกษาการเก็บเกี่ยวโปรตีนจากน้ำทิ้งของกระบวนการผลิตซูริมิโดยใช้ไมโครฟิลเตรชันและอัลตราฟิลเตรชัน โปรตีนจะถูกทำให้เข้มข้นในส่วนรีเทนเททเพื่อนำกลับไปผสมในซูริมิและน้ำที่ผ่านการกรองมีค่าซีโอดีลดลง 89-94% ทำให้สามารถนำกลับไปใช้ในกระบวนการผลิตได้

Mireles Dewitt และ Morrissey (2001b) เก็บเกี่ยวโปรติเอสและทำให้บริสุทธิ์โดยกำจัดโปรตีนชนิดอื่นๆ ซึ่งส่วนใหญ่มีขนาดประมาณ 35-205 kDa ที่มีในน้ำทิ้งออก โดยการใช้

ความร้อนและกรดที่ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 ทำให้โปรตีนบางส่วนตกตะกอนแล้วแยกออก โดยการหมุนเหวี่ยงและใช้อัลตราฟิลเตรชันเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรติเอส ผลปรากฏว่าสามารถเพิ่มความเข้มข้นได้ถึง 100 เท่า และเก็บเกี่ยวโปรติเอสได้ประมาณ 80%

Torres และคณะ (2002) ใช้อัลตราฟิลเตรชันเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนในพลาสมาจากเลือดไก่ พบว่าสามารถเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนจาก 0.0046 กรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 0.0908 กรัมต่อมิลลิลิตร และมีความบริสุทธิ์ถึง 85-91%

Lo และคณะ (2005) เก็บเกี่ยวโปรตีนจากอุตสาหกรรมสัตว์ปีกด้วยอัลตราฟิลเตรชันขนาด 30 kDa ผลคือได้โปรตีนเข้มข้นขึ้นจาก 110 เป็น 390 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถกักโปรตีนได้ทั้งหมดเพราะในส่วนเพอมิเอทตรวจไม่พบโปรตีน และสามารถลดซีโอดีจาก 858 เหลือ 353 มิลลิกรัมต่อลิตร

Zydney (1998) กล่าวว่า การใช้เทคโนโลยีเมมเบรนในอุตสาหกรรมนมถือว่าประสบความสำเร็จอย่างมาก เช่น ใช้ไมโครฟิลเตรชันช่วยกำจัดจุลินทรีย์ออกจากนมโดยไม่ต้องใช้ความร้อนสูงในการทำพลาสเจอร์ไรซ์ และใช้อัลตราฟิลเตรชันกำจัดแลคโตสออกจากหางนม นอกจากนี้ยังใช้ในการแยกส่วนโปรตีนในนมได้ด้วย

Punidadas และ Rizvi (1998) ทดลองการแยกส่วนเคซีน (Casein) ออกจากนม โดยใช้เมมเบรน ขนาด 0.05 ไมโครเมตร สามารถกักกันเคซีนได้ทั้งหมดและยอมให้สารโมเลกุลเล็กอื่นๆ ผ่านเมมบรนออกมาแต่เมื่อใช้เมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตร สามารถกักกันเคซีนไว้ได้บางส่วนเท่านั้น และได้สรุปข้อดีของการใช้เมมเบรนแยกเคซีนออกจากนม คือ (1) สามารถเก็บเกี่ยวเคซีนและทำให้เข้มข้นเพื่อนำไปผลิตเป็นเนยแข็งส่งผลให้ลดปริมาณของเสียจากโรงงานได้ (2) ส่วนเพอมิเอทที่ได้เป็นหางนมที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ และ (3) โปรตีนที่ได้เป็นโปรตีนที่อยู่ในสภาพธรรมชาติและมีคุณภาพดี

Ghosh และ Cui (2000a) ใช้อัลตราฟิลเตรชันขนาด MWCO 50 kDa ศึกษาการแยกไลโซไซม์ (Lysozyme) จากไข่ขาวซึ่งประกอบด้วยโปรตีนอื่นอีกเช่นโอวัลบูมิน (Ovalbumin) และโคนัลบูมิน (Conalbumin) พบว่าสภาวะการดำเนินงานมีผลต่อความบริสุทธิ์ของไลโซไซม์ที่แยกได้

Cheang และ Zydney (2004) ศึกษาการแยกส่วนโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใกล้เคียงกัน คือ α-Lactalbumin (14 kDa) และ β-Lactoglobulin (18 kDa) โดยการกรองผ่านเมมเบรน 2 ขั้นตอน โดยเปรียบเทียบระหว่างกรองผ่านเมมเบรนขนาด 100 ก่อน 30 kDa และ 30 ก่อน 100 kDa ผลคือทำให้ได้ α-Lactalbumin บริสุทธิ์และเข้มข้นขึ้น 10 เท่า เหมือนกันไม่ว่าจะใช้เมมเบรนขนาดใดก่อน

Huang และ Morrissey (1998) กล่าวถึงเหตุผลที่ควรนำเทคโนโลยีการกรองมาใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมซูริมิมีดังนี้ (1) สามารถแยกของแข็งที่มีอนุภาคใหญ่ (2) สามารถใช้เก็บเกี่ยวสารละลายโปรตีนจากปลาที่มีประโยชน์เพื่อเป็นการเพิ่มคุณค่า และ (3) สามารถนำน้ำที่ได้กลับไปใช้ใหม่

Gracomo และคณะ (1996) ศึกษาการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมนม โดยใช้การกรองแบบอัลตราฟิลเตรชันร่วมกับออสโมซิสแบบผันกลับ สามารถลดค่าบีโอดีและนำน้ำกลับไปใช้ในกระบวนการผลิต นอกจากนี้ยังทำให้ได้โปรตีนที่ละลายในส่วนรีเทนเททเข้มข้นขึ้นโดยอัลตราฟิลเตรชัน และได้แลคโตสเข้มข้นในส่วนรีเทนเททจากออสโมซิสแบบผันกลับ

Fabiani และคณะ (1996) กล่าวว่ากระบวนการล้างสารเหนียวของเส้นไหม ทำให้มีน้ำทิ้งซึ่งประกอบด้วยโปรตีนและมีค่าซีโอดี 6,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้อัลตราฟิลเตรชันพบว่าในส่วนรีเทนเททเก็บเกี่ยวโปรตีนได้ 97% ทำให้ค่าซีโอดีในส่วนเพอมิเอทเหลือ 800 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อนำส่วนเพอมิเอทไปกรองต่อโดยใช้การกรองแบบออสโมซิสผันกลับ ทำให้ลดซีโอดีเหลือ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถนำน้ำส่วนนี้กลับไปใช้ในกระบวนการผลิตได้อีก

Shiau และ Chai (1999) กล่าวว่าการใช้เทคโนโลยีการกรองด้วยเมมเบรนเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยากและไม่ต้องใช้ความร้อน สามารถประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมอาหารได้หลายอย่าง เช่น นม น้ำผลไม้ โปรตีน เอนไซม์ และได้ใช้อัลตราฟิลเตรชันเก็บเกี่ยวโปรตีนจากน้ำล้างหอยนางรม ทำให้ได้โปรตีนเข้มข้นขึ้น 18 เท่า และลดซีโอดีได้ 47%

Abdessemed และคณะ (1999) ศึกษาการบำบัดน้ำเสียจากชุมชนของประเทศแอลจีเรีย โดยใช้อัลตราฟิลเตรชันขนาด 50 kDa พบว่าสามารถกำจัดแบคทีเรียซึ่งอยู่ในรูปสารแขวนลอยออกได้ ทำให้ในส่วนเพอมิเอทมีค่าซีโอดีเหลือ 12 มิลลิกรัมต่อลิตร และบีโอดีเหลือ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร นับว่าเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ได้ผลดี

3. การตกผลึกโปรตีน

การตกผลึกเป็นวิธีที่ใช้ทั่วไปสำหรับทำให้สารบริสุทธิ์ซึ่งมีมานานแล้ว โดยผลึกเกิดจากการก่อตัวเป็นอนุภาคของแข็งจากสถานะของเหลว (Belter *et al.*, 1998) จึงเป็นเทคนิคที่มีความสามารถในการแยกและถือว่าเป็นขั้นตอนสุดท้ายของการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ (McPherson, 1982)

3.1 ความหมายของการตกผลึก

สสารสามารถแบ่งได้เป็น 3 สถานะ คือของแข็ง ของเหลว และก๊าซ ในสถานะของแข็ง อาจแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะการจัดเรียงตัว คือ (1) กลุ่มที่มีการจัดเรียงตัวภายในของอะตอม ไอออน หรือโมเลกุล ซึ่งเป็นโครงสร้างภายในของของแข็ง เป็นไปอย่างเดาสุ่มหรือไม่มีระเบียบเรียกว่า อสัณฐาน (Amorphous) หรือตะกอนซึ่งตรงข้ามกับอีกกลุ่มหนึ่งคือ (2) กลุ่มที่มีการจัดเรียงตัวของอะตอม ไอออน หรือโมเลกุล อย่างเป็นระเบียบซ้ำๆ กัน เรียกว่าผลึก (Crystal) (จินตนา สิริพิทยานานนท์, 2537) หรือกล่าวได้ว่า ผลึก คือของแข็งที่มีผิวหน้าเรียบและผิวแต่ละด้าน

ทำมุมกันแน่นอน ผลึกของสารชนิดเดียวกัน ผิวหน้าแต่ละด้านจะทำมุมเท่ากัน ที่เป็นแบบนี้เพราะว่าอะตอมของสารชนิดเดียวกันมีการเรียงตัวในรูปแบบที่เหมือนกัน ในบางครั้งเราสามารถจำแนกแร่ธาตุต่างๆ ได้จากลักษณะรูปทรงของผลึก (Mullin, 1992)

การตกผลึกโปรตีน (Protein crystallization) คือปรากฏการณ์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงระบบของสารละลายโปรตีนอย่างช้าๆ เพื่อให้ความสามารถของการละลายโปรตีนต่ำลงมากที่สุดจนกระทั่งเกิดเป็นสารละลายอิ่มตัวยิ่งยวด (Supersaturation) ต่อจากนั้นสารละลาย จะไม่สามารถดำรงอยู่เป็นเนื้อเดียวกันได้จึงเกิดสถานะใหม่ขึ้นมาเป็นผลึก (McPherson, 1982) ซึ่งโปรตีนแต่ละชนิดสามารถเกิดเป็นผลึกที่บริสุทธิ์ได้ในสารละลายที่มีโปรตีนผสมอยู่หลายชนิด เนื่องจากความจำเพาะในการจัดเรียงตัวซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญในการเกิดรูปผลึก นอกจากนี้สภาวะที่เหมาะสมในการเกิดผลึกของโปรตีนแต่ละชนิดยังมีความแตกต่างกัน ดังนั้นในสารละลายที่มีโปรตีนอยู่หลายชนิดที่สภาวะหนึ่งจะมีโปรตีนเพียงชนิดเดียวที่เกิดเป็นสารละลายอิ่มตัวยิ่งยวดและรวมกันเป็นผลึกได้โดยที่โปรตีนชนิดอื่นๆ ไม่ได้อยู่ในสถานะอิ่มตัวยิ่งยวดด้วย (Scopes, 1987)

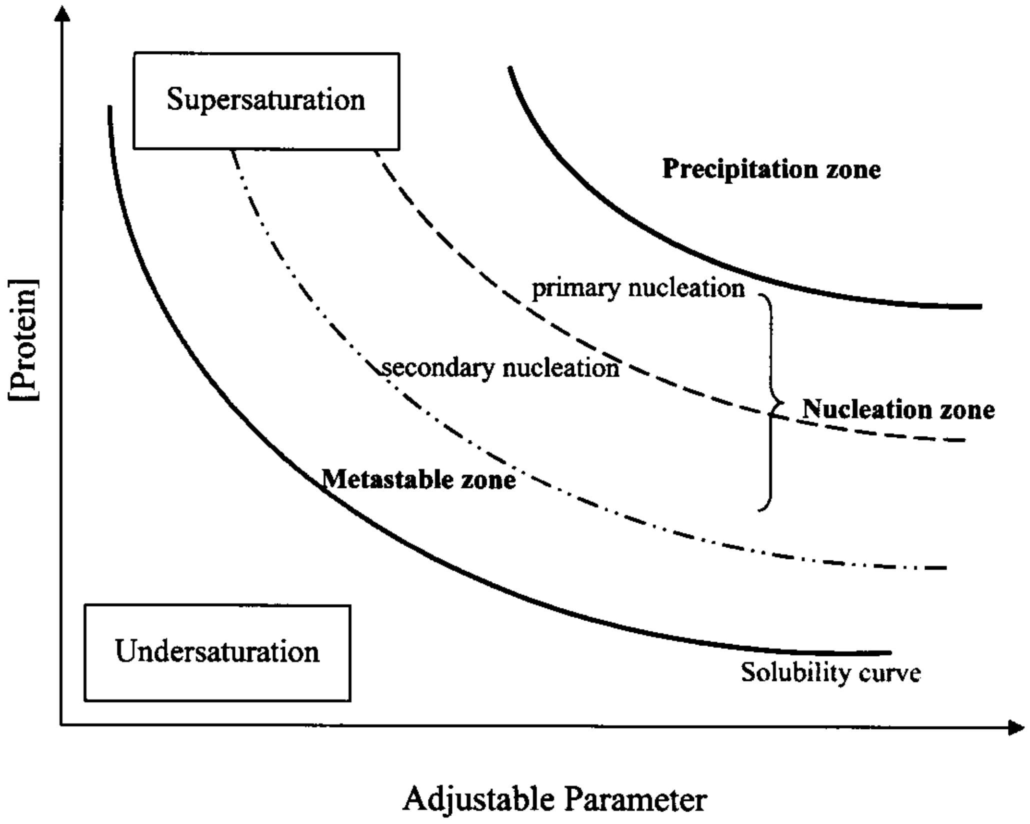
3.2 ทฤษฎีการตกผลึก

3.2.1 สภาพอิ่มตัวยิ่งยวด (Supersaturation)

ผลึกเกิดโดยการก่อตัวขึ้นของตัวถูกละลายที่มีอยู่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นมากกว่าความเข้มข้นที่สภาวะสมดุลการละลาย เรียกสภาวะนี้ว่า สภาพอิ่มตัวยิ่งยวด ซึ่งจะเป็นแรงขับในการสร้างนิวเคลียสและการโตของผลึก (Papanikolau *et al*., 2001; Asherie, 2004) โดยปกติในสารละลายที่มีความเสถียรมักมีความเข้มข้นของโปรตีนในระดับที่ต่ำกว่าสภาวะสมดุลการละลายหรืออยู่ในสภาพไม่อิ่มตัว ถ้าเปลี่ยนสภาวะของสารละลายนั้นให้ค่าสมดุลการละลายลดลงหรือลดความสามารถละลายได้ให้มีค่าต่ำลงจะทำให้สารละลายเข้าสู่สภาพอิ่มตัวยิ่งยวดได้ ซึ่งเป็นหลักการการทำงานที่สามารถนำมาใช้กับสารละลายโปรตีนได้ดังแสดงในภาพที่ 1-12 ซึ่งแสดงขอบเขตที่กำหนดสถานะของโปรตีนว่าอยู่ในรูปของสารละลาย ผลึก หรือตะกอน โดยใช้เส้นกราฟค่าการละลาย (Solubility curve) แบ่งเป็น 2 ส่วน ดังนี้ (Rosenberger, 1996; Jacobsen *et al*., 1998; Cherdrungsi, 1999; Asherie, 2004; Chayen, 2005)

(1) พื้นที่อยู่ใต้เส้นกราฟค่าการละลาย (Undersaturation zone) เป็นส่วนที่ไม่มีผลึกเกิดขึ้น โปรตีนทั้งหมดสามารถละลายได้ในตัวทำละลาย

(2) พื้นที่อยู่เหนือเส้นกราฟค่าการละลาย (Supersaturation zone) สามารถแบ่งเป็น 3 ส่วนย่อย คือ
- ส่วนที่ผลึกโตขึ้นโดยไม่เกิดนิวเคลียสใหม่ (Metastable zone)
- ส่วนที่เกิดนิวเคลียสของผลึก (Nucleation zone or Labile zone)
- ส่วนที่เกิดเป็นตะกอน (Precipitation zone)



ภาพที่ 1-12 แผนผังแสดงการตกผลึกโปรตีน

Figure1-12 Schematic illustration of protein crystallization phase diagram.

ที่มา : ดัดแปลงจาก Cherdrungsi (1999) และ Chayen (2005)

McPherson (2004) กล่าวว่าการเปลี่ยนสมบัติของสารละลายโปรตีนสามารถทำให้เกิดขึ้นได้หลายวิธี ได้แก่

(1) การเปลี่ยนสมบัติของโปรตีนเอง เช่นปรับพีเอชทำให้ประจุของกรดอะมิโนเปลี่ยนไป

(2) การเปลี่ยนความสามารถของโปรตีนในการจับกับโมเลกุลของสารอื่น เช่น ปรับพีเอช

(3) การเปลี่ยนสมบัติของโปรตีนในการทำปฏิกริยากับตัวทำละลาย เช่น เติมโพลิเมอร์

(4) การเปลี่ยนกิจกรรมทางเคมีของน้ำ (ซึ่งเป็นตัวทำละลาย) เช่น การเติมเกลือ

อาภัสสรา ชมิดท์ (2537) กล่าวว่า การละลายของโปรตีนในสารละลายขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเกลือที่อยู่ในสารละลาย การเติมสารละลายเกลือเข้มข้นจึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยอาศัยหลักการของ Salting-in และ Salting-out

Salting-in เป็นปรากฏการณ์ที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือให้สูงขึ้น การละลายของโปรตีนในสารละลายที่มีไอออนิกสเตรนจ์ (Ionic strength) ต่ำจะเพิ่มขึ้น การที่เป็นเช่นนี้เพราะประจุของไอออนของเกลือสามารถไปเพิ่มหรือไปบังประจุบนโมเลกุลของโปรตีน ทำให้เกิดการผลักกันระหว่างโมเลกุลของโปรตีน โอกาสที่โมเลกุลของโปรตีนจะไปจับกับโมเลกุลของน้ำก็มากขึ้นทำให้การละลายของโปรตีนเพิ่มขึ้น (Cherdrungsi, 1999)

Salting-out เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือให้สูงมากขึ้นหรือทำให้สารละลายมีไอออนิกสเตรนจ์สูงขึ้นการละลายของโปรตีนกลับลดลงทั้งนี้เนื่องจากเกิดการแย่งโมเลกุลของน้ำหรือตัวทำละลายระหว่างไอออนของเกลือที่เติมลงไปในสารละลายกับตัวถูกละลายอื่นๆ ไอออนของเกลือจะจับกับโมเลกุลของน้ำหรือตัวทำละลายเพื่อมาละลายได้ดีกว่า จึงทำให้โปรตีนละลายได้น้อยลงหรืออยู่ในสภาพอิ่มตัวยิ่งยวด ทำให้โปรตีนตกตะกอนถ้าระบบเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว หรือโปรตีนเกิดเป็นผลึกถ้าควบคุมระบบให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมและเปลี่ยนแปลงอย่างช้าๆ (Mullin, 1992)

3.2.2 ขั้นตอนการเกิดผลึกโปรตีน (Stage of crystallization)

การตกผลึกโปรตีนประกอบด้วยกระบวนการ 3 ขั้นตอน คือ (Mullin, 1992; Berry, 1995; Judge *et al.*, 1995; Cherdrungsi, 1999; Juarez-Martinez *et al.*, 2001; Kierzek and Zielenkiewicz, 2001)

3.2.2.1 การเกิดนิวเคลียส (Nucleation)

การเกิดนิวเคลียสซึ่งเป็นอนุภาคขนาดเล็กเกิดขึ้นจากการรวมตัวกันของตัวถูกละลายในสารละลายอิ่มตัวยิ่งยวด ถือเป็นจุดกำเนิดของผลึกเนื่องจากเป็นตัวกำหนดว่าโมเลกุลของโปรตีนในสารละลายจะเกิดเป็นตะกอนหรือผลึกขึ้นอยู่กับระดับของสภาพอิ่มตัวยิ่งยวด โดยในสภาพอิ่มตัวยิ่งยวดสารละลายพยายามปรับระบบให้อยู่ในสภาพสมดุล ทำให้โมเลกุลอิสระของตัวถูกละลายที่มีมากเกินพอในสารละลายมารวมกันอยู่ในรูปนิวเคลียส เป็นกระบวนการที่ใช้พลังงานต่ำ (โปรตีน

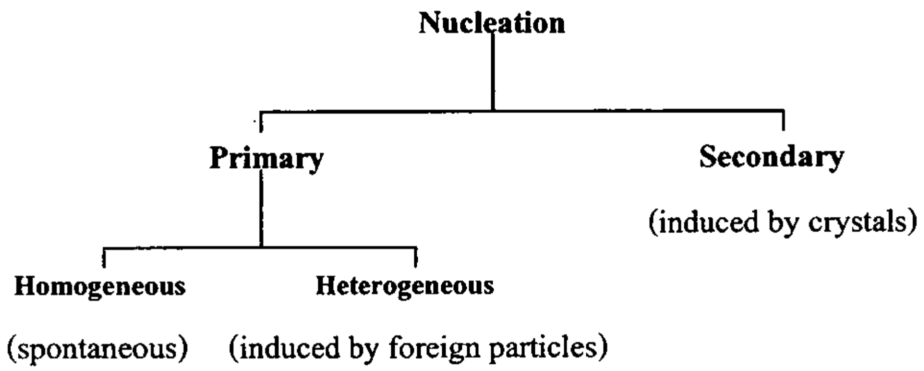
ประมาณ 3-6 kcal/mole) สารมารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติหรือเกิดจากการได้รับการกระตุ้น แบ่งออกเป็น 2 ประเภท (ดังภาพที่1-13) คือ

(1) การเกิดนิวเคลียสปฐมภูมิ (Primary nucleation) คือ การเกิดนิวเคลียสจากสารละลายที่ไม่มีผลึกของตัวถูกละลายอยู่ แบ่งย่อยเป็น

- การเกิดนิวเคลียสเป็นเนื้อเดียว (Homogeneous) เกิดได้ตามธรรมชาติจากสารละลายที่ปราศจากอนุภาคต่างๆ

- การเกิดนิวเคลียสที่เป็นเนื้อผสม (Heterogeneous) เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดโดยการเหนี่ยวนำด้วยอนุภาคอื่นหรือเกิดบนพื้นผิวภาชนะ อันเนื่องจากมีความต้องการพลังงานต่ำกว่าแบบแรก

(2) การเกิดนิวเคลียสทุติยภูมิ (Secondary nucleation) เป็นปรากฏการณ์เกิดในสารละลายอิ่มตัวยิ่งยวดที่มีผลึกของตัวถูกละลายอยู่ อาจเกิดจากการชนกันเองหรือชนผนังภาชนะบรรจุของผลึก ทำให้ได้เป็นนิวเคลียสใหม่ ซึ่งมักเกิดที่ระดับการอิ่มตัวยิ่งยวดต่ำกว่าการเกิดนิวเคลียสแบบปฐมภูมิ



ภาพที่ 1-13 แผนผังแสดงการแบ่งประเภทของนิวเคลียส

Figure 1-13 Classification of nucleation.

ที่มา : Mullin (1992)

3.2.2.2 การโตของผลึก (Crystal growth)

เป็นขั้นตอนที่เกิดขึ้นหลังจากการเกิดนิวเคลียส โดยที่สารละลายยังมีความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่มีค่ามากพอสำหรับการเพิ่มขนาดของผลึกอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจะต้องมีความเข้มข้นของตัวถูกละลายมากกว่าสภาพสมดุล (Saturation) อัตราการโตของผลึกถูกกำหนดโดยกลไก 2 อย่าง คือ ปฏิกริยาที่ผิวหน้าของผลึกและอัตราการแพร่ของสารละลายรอบๆ ผลึกโปรตีนที่กำลังโตขึ้น

3.2.2.3 การหยุดโตของผลึก (Cessation of growth)

การหยุดโตของผลึกเกิดจากเหตุผลหลายประการ ซึ่งสาเหตุหลักเพราะเมื่อตัวถูกละลายกลายเป็นผลึกทำให้ความเข้มข้นลดลงจนกระทั่งสารละลายเกิดสมดุลระหว่างสถานะของแข็งและสารละลาย ทำให้ตัวถูกละลายไม่มีการเปลี่ยนสถานะอีกต่อไป อย่างไรก็ดีการเติมตัวถูกละลายเพิ่มในช่วงนี้ทำให้ผลึกสามารถโตขึ้นต่อไปได้ นอกจากนี้อาจเกิดจากความไม่บริสุทธิ์หรือการเสียสภาพที่ผิวของผลึก

3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดผลึกโปรตีน

การเติมสารที่เหมาะสมลงในสารละลายหรือการปรับสภาวะของสารละลายโปรตีนสามารถทำให้สารละลายโปรตีนอยู่ในสภาพอิ่มตัวยิ่งยวดเป็นผลให้เกิดผลึกได้ ซึ่งโปรตีนแต่ละชนิดมีสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดผลึกแตกต่างกัน โดยขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย คือ

3.3.1 อุณหภูมิ

สารละลายโปรตีนสามารถเกิดเป็นผลึกได้ในช่วงอุณหภูมิ 0-40 องศาเซลเซียส แต่นิยมที่อุณหภูมิต่ำเพื่อป้องกันการเสียสภาพของโปรตีนหรือที่อุณหภูมิห้องเพื่อไม่ต้องลงทุนสูงในการติดตั้งเครื่องทำความเย็นสำหรับการค้าเป็นงานในระดับอุตสาหกรรม (McPherson, 1982)

3.3.2 เวลา

การก่อตัวเป็นผลึกของโปรตีนแต่ละชนิดต้องการใช้เวลาแตกต่างกัน อาจเกิดภายในชั่วโมงหรือเป็นเวลานับเดือนซึ่งขึ้นอยู่กับสภาวะอื่นๆ ด้วย โดยถ้าเติมสารช่วยตกผลึก เช่น สารละลายเกลือเข้มข้นสามารถช่วยให้การตกผลึกใช้เวลาน้อยลง (McPherson, 1982)

3.3.3 แรงสั่นสะเทือนและเสียง

แรงสั่นสะเทือนและเสียงเป็นตัวการที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาวะโดยรอบได้ในสภาวะเริ่มต้นก่อนที่ผลึกจะเกิด การกวนโดยตรงในสารละลายสามารถทำให้เพิ่มจำนวนนิวเคลียสแต่อาจทำให้นิวเคลียสที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็กและการกวนยังสามารถใช้ในการเลี้ยงผลึกให้มีขนาดเพิ่มขึ้นได้ (McPherson, 1982)

3.3.4 พีเอช

นับว่าเป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดสภาวะการเกิดผลึกโปรตีน โดยที่พีเอชต่างกันทำให้ประจุสุทธิของกรดอะมิโนมีค่าเปลี่ยนไป ซึ่งส่งผลต่อความสามารถในการละลายของโปรตีนในบางกรณีนิยมตกผลึกที่พีเอชเท่ากับค่าของจุดไอโซอิเลคตริก (Isoelectric point, pI) ทำให้ประจุสุทธิมีค่าเป็นศูนย์และเป็นช่วงที่โปรตีนละลายได้น้อยที่สุด แต่ในบางกรณีใช้ค่าพีเอชไม่เท่ากับจุดไอโซอิเลคตริกก็สามารถตกผลึกโปรตีนได้โดยอาศัยประจุของเกลือเพื่อช่วยปรับการละลายของโปรตีนให้อยู่ในสภาพอิ่มตัวยิ่งยวด (Berry, 1995; Rosenberger, 1996)

3.3.5 สารละลายโปรตีน

ความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายก่อนนำมาตกผลึกควรมีค่าสูงที่สุดเท่าที่จะทำได้ อาจนำไปผ่านขั้นตอนการกรองก่อนเพื่อเพิ่มความเข้มข้นให้อยู่ในช่วงประมาณ 5-30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ขึ้นอยู่กับชนิดและความสามารถในการละลายได้ของโปรตีน (McPherson, 1982)

3.3.6 สารที่ใช้เติมเพื่อการตกผลึก

สามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ตามกลไกการตกผลึก ดังนี้ (McPherson, 1982, 2004; Berry, 1995)

3.3.6.1 เกลือ

เกลือแต่ละชนิดมีความสามารถในการตกผลึกโปรตีนแตกต่างกัน ดังแสดงใน Hofmeister series ซึ่งสรุปว่าในกลุ่มของแอนไอออนเกลือฟอสเฟตมีความสามารถในการตกผลึกได้ดีที่สุด และเกลือไธโอไซยาไนด์มีความสามารถในการตกผลึกได้น้อยที่สุด ส่วนกลุ่มของแคทไอออนเกลือแอมโมเนียมมีความสามารถในการตกผลึกได้ดีที่สุด และเกลือลิเธียมมีความสามารถในการตกผลึกได้น้อยที่สุด

$$PO_4^{3-} > HPO_4^{2-} = SO_4^{2-} > \text{citrate} > CH_3CO_2^- > Cl^- > Br^- > NO^{3-} > ClO_4^- > SCN^-$$

and

$$NH_4^+ > K^+ > Na^+ > Li^+$$

เกลือเป็นสารที่นิยมใช้มากเพื่อทำให้สารละลายอยู่ในสภาพอิ่มตัวยิ่งยวด โดยใช้หลักการ Salting-out เนื่องจากการละลายของโปรตีนในสารละลายเกลือเข้มข้นสูงทำให้เกิดการแข่งขันระหว่างโมเลกุลของโปรตีนและไอออนของเกลือในการจับกับโมเลกุลของน้ำ ส่งผลให้โปรตีนเกิดได้ทั้งในรูปของผลึกหรือตะกอน สำหรับการตกผลึกมักใช้เกลือปริมาณเล็กน้อยที่ความเข้มข้นต่ำกว่าการตกตะกอน เพื่อไม่ให้เกิดสภาพการอิ่มตัวยิ่งยวดของสารละลายโปรตีนสูงเกินไป

3.3.6.2 ตัวทำละลายอินทรีย์

ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้ตกผลึก ได้แก่ เอธานอล เมธานอล อะซิโตน เป็นต้น ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์มีค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (Dielectric constant) ที่ต่ำกว่าน้ำ เมื่อใส่สารละลายอินทรีย์ลงไปในสารละลายโปรตีนจะทำให้ค่าคงที่ไดอิเล็กทริคของสารละลายลดลง ความสามารถในการทำหน้าที่เป็นตัวทำละลายของน้ำมีค่าลดลง มีผลทำให้เพิ่มการจับกันระหว่างโมเลกุลของโปรตีนและลดการละลายของโปรตีนส่งผลให้เข้าสู่สภาพอิ่มตัวยิ่งยวด และถ้าเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย

อินทรีย์การจับกันระหว่างโมเลกุลของโปรตีนยิ่งเพิ่มขึ้น ข้อควรระวังของการใช้สารละลายอินทรีย์มักทำที่อุณหภูมิต่ำเพื่อป้องกันการเสียสภาพของโปรตีน

3.3.6.3 โพลิเมอร์

นิยมใช้ Polyethylene glycol (PEG) อย่างแพร่หลายเช่นเดียวกับการใช้เกลือสามารถใช้ได้ในสภาวะที่มีค่าพีเอชและอุณหภูมิในช่วงกว้าง โดย PEG ทำหน้าที่ในการกีดกันการจับระหว่างโมเลกุลของโปรตีนและน้ำ ทำให้โปรตีนเกาะรวมกันแยกตัวออกมาในรูปของแข็ง เนื่องจากโครงสร้างของ PEG ต่างจากโปรตีนตรงที่มีโครงสร้างไม่คงที่ทำให้การบิดม้วนโครงสร้างจับกับสารละลายเป็นไปอย่างเดาสุ่มจึงยึดพื้นที่ในการละลายได้ดีกว่าโปรตีน โปรตีนจึงถูกแยกออกมารวมกันเป็นผลึกได้

3.4 วิธีการตกผลึกโปรตีน

การเลี้ยงผลึกให้ได้ผลึกที่สมบูรณ์นั้นเป็นกระบวนการที่ต้องการให้ผลึกโตขึ้นอย่างช้าๆ และสม่ำเสมอ อาจควบคุมได้โดยการเตรียมผลึกภายใต้การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายที่เป็นไปอย่างช้าๆ เงื่อนไขเหล่านี้พบจากการสังเกตการโตของผลึกในธรรมชาติ ในการทดลองส่วนใหญ่จึงได้สร้างวิธีการทดลองที่เลียนแบบธรรมชาติ นับตั้งแต่การเตรียมผลึกจากสารละลายอิ่มตัว (Preparation of crystals from saturated solution)

สารละลายอิ่มตัวเป็นสารละลายที่มีสมดุลระหว่างตัวถูกละลายที่ละลายอยู่ในสารละลายและที่ตกเป็นผลึกออกมาแล้ว หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าเมื่อสารละลายถึงจุดอิ่มตัว ตัวทำละลายไม่สามารถละลายตัวถูกละลายได้มากกว่านั้นอีกแล้ว จากความหมายนี้ค่าการละลายจึงสามารถใช้เป็นปัจจัยในการเตรียมผลึก โดยเริ่มจากการเตรียมสารละลายอิ่มตัวขึ้นก่อนแล้วจึงทำการลดความสามารถในการละลายของตัวถูกละลาย เช่น การเปลี่ยนแปลงพีเอชหรือไอออนิกสเตรนจ์ การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของตัวทำละลายผสม เป็นต้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารในสภาวะต่างๆ ซึ่งต้องควบคุมการเปลี่ยนแปลงให้เป็นไปอย่างช้าๆ ถ้าขั้นตอนนี้เกิดเร็วจะเกิดเป็นตะกอนแทน การตกผลึกวิธีนี้นิยมใช้มากกับสารละลายอินทรีย์ เช่นโปรตีน นอกจากนี้ยังสามารถเติมผลึกเล็กๆ (Seed crystal) เพื่อเป็นนิวเคลียสให้อะตอม ไอออน หรือโมเลกุลอื่นๆ ของตัวถูกละลายแยกตัวลงมาเกาะจนเติบโตเป็นผลึกเดี่ยว (Single crystal) ที่มีขนาดใหญ่ได้ (จินตนา สิริพิทยานานนท์, 2537)

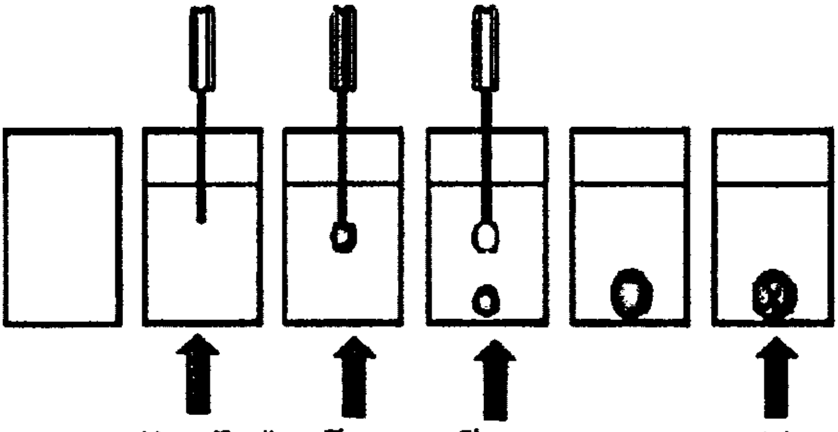
เทคนิคที่นิยมใช้สำหรับตกผลึกโปรตีนจากสภาพอิ่มตัวยิ่งยวดมี 4 วิธี ดังแสดงในภาพที่ 1-14 ถึง 1-17 (McPherson, 1982; Berry, 1995; Chayen, 1999)

3.4.1 การตกผลึกแบบกะ (Batch crystallization)

เป็นวิธีเก่าแก่ที่ทำได้ง่าย โดยเมื่อนำสารละลายโปรตีนเข้มข้นมาผสมกับสารช่วยตกผลึกทำให้สารละลายอยู่ในสภาพอิ่มตัวยิ่งยวดทันทีนำไปสู่การเกิดผลึกขึ้น ข้อดีของวิธีนี้คือ ลดโอกาส

การปนเปื้อนของสารอื่นบนผิวผลึก และสามารถทำได้ในปริมาณตามต้องการแต่ไม่เหมาะสำหรับการใช้คัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมของการตกผลึกเนื่องจากเป็นการสิ้นเปลืองสารตัวอย่างและสารเคมี

การใช้เทคนิคนี้ในระดับเล็กลง (Microbatch technique) สามารถลดการสิ้นเปลืองสารตัวอย่างและสารเคมีให้เหลือปริมาตร 1-2 ไมโครลิตร ทำได้โดยหยดสารละลายโปรตีนเข้มข้นผสมกับสารที่ช่วยตกผลึกภายใต้น้ำมันพาราฟิน (Paraffin oil) ดังภาพที่ 1-14 สารละลายโปรตีนและสารช่วยตกผลึกจะผสมกันในระบบปิดที่มีน้ำมันล้อมรอบ



ภาพที่ 1-14 การตกผลึกโปรตีนโดยการตกผลึกแบบกะในระดับเล็ก

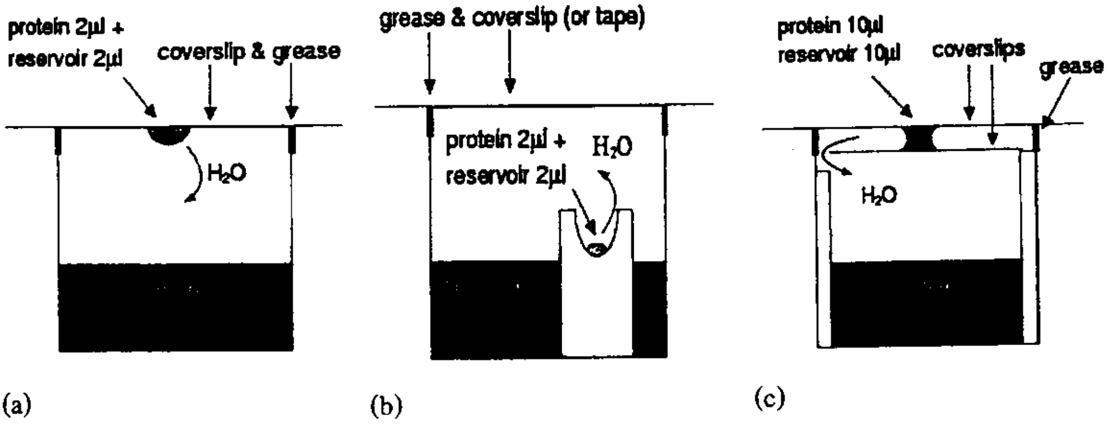
Figure 1-14 Microbatch technique for protein crystallization.

ที่มา : D'Arcy และคณะ (2004)

3.4.2 การแพร่ของไอ (Vapor diffusion)

เป็นวิธีที่เหมาะสำหรับการคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมของการตกผลึกที่ต้องทำการทดลองจำนวนหลายสภาวะหรือในกรณีที่สารตัวอย่างมีจำนวนจำกัด โดยใช้สารละลายโปรตีนเข้มข้นที่ผสมกับสารที่ใช้ตกผลึกในปริมาณ 2-40 ไมโครลิตร ลอยอยู่บนสารที่ใช้ตกผลึกปริมาณ 1-25 มิลลิลิตร ในระบบปิดเพื่อให้น้ำหรือตัวทำละลายในหยดของสารละลายโปรตีนระเหยออกมาในสารที่ช่วยตกผลึก สามารถทำได้ 3 แบบ ซึ่งแตกต่างกันตามวิธีการจัดวางตำแหน่งของหยดสารละลายโปรตีนที่รวมกับสารช่วยตกผลึก ดังภาพที่ 1-15 คือ Hanging Drop, Sitting Drop และ Sandwich Drop

สำหรับ Hanging Drop นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสภาวะที่ทำให้โปรตีนตกผลึก สามารถทำโดยหยดสารละลายโปรตีนผสมกับสารช่วยตกผลึกลงบนกระจกปิดสไลด์จากนั้นนำไปปิดคว่ำบนหลุมซึ่งบรรจุสารช่วยตกผลึกชนิดเดียวกัน น้ำหรือตัวทำละลายจากหยดโปรตีนจะค่อยๆ ระเหยออกมาจนกระทั่งโปรตีนมีความเข้มข้นสูงถึงสภาพอิ่มตัวยิ่งยวดและอาจเกิดเป็นตะกอนหรือผลึก (Mueller *et al.*, 2001)



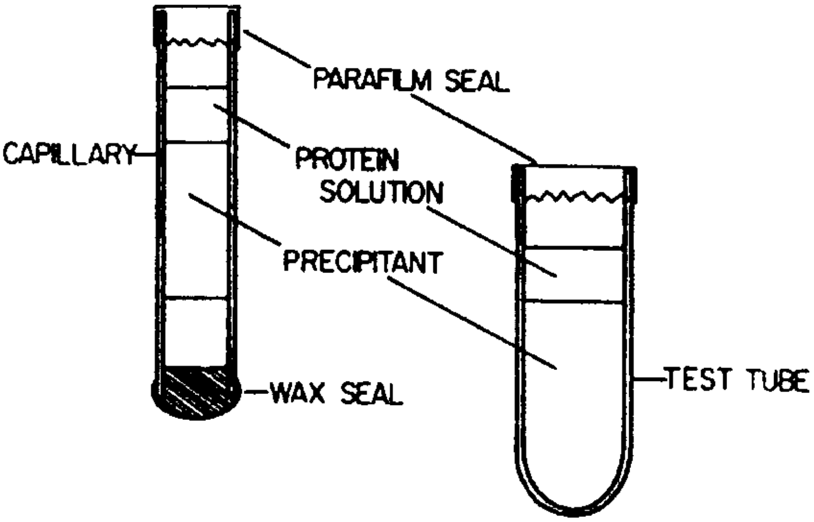
ภาพที่ 1-15 การตกผลึกโปรตีนโดยวิธีการแพร่ของไอ: (a) Hanging Drop, (b) Sitting Drop และ (c) Sandwich Drop

Figure 1-15 Vapor diffusion experiment for protein crystallization: (a) Hanging Drop, (b) Sitting Drop and (c) Sandwich Drop.

ที่มา : http://perch.cimr.ac.uk/Course/Crystals/Theory/methods.html (2003)

3.4.3 การแพร่ของของเหลว (Liquid/liquid diffusion or Free interface diffusion)

วิธีนี้เหมาะสำหรับตกผลึกจากสารละลายโปรตีนที่มีความเข้มข้นมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับสารช่วยตกผลึกประเภทสารละลายเกลือหรือตัวทำละลายอินทรีย์และมีปริมาณพอเพียง เนื่องจากการทดลองแต่ละครั้งใช้สารละลายมากกว่า 10 ไมโครลิตร โดยบรรจุสารละลายโปรตีนและสารช่วยตกผลึกอยู่คนละด้านของหลอดทดลองหรือแคปิลารี่ (Capillary) และปิดปลายทั้ง 2 ด้านของหลอดเพื่อให้การทดลองเป็นระบบปิด ดังภาพ 1-16 ซึ่งผิวหน้าของสารทั้ง 2 ชนิดสัมผัสกัน แล้วเกิดการแพร่ระหว่างสารละลายโปรตีน และสารช่วยตกผลึกทำให้เกิดลำดับความเข้มข้นแตกต่างกันอย่างต่อเนื่อง และในจุดที่ความเข้มข้นเหมาะสม สารละลายอยู่ในสภาพอิ่มตัวยิ่งยวด ผลึกหรือตะกอนจะเกิดในบริเวณนั้น



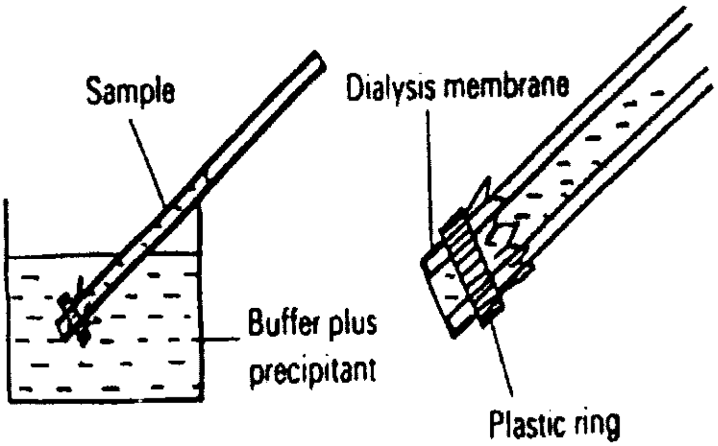
ภาพที่ 1-16 การตกผลึกโปรตีนโดยวิธีการแพร่ของของเหลว

Figure 1-16 Liquid/liquid diffusion experiment for protein crystallization.

ที่มา : McPherson (1982)

3.4.4 ไดอะไลซิส (Dialysis)

ทำโดยการบรรจุสารละลายโปรตีนในท่อขนาดเล็กและนำไดอะไลซิสเมมเบรนห่อหุ้มไว้ที่ปลายท่อ ดังภาพที่ 1-17 จากสมบัติการเลือกผ่านสาร (Semipermeable membrane) ของไดอะไลซิสเมมเบรนทำให้สารช่วยตกผลึกสามารถผ่านไดอะไลซิสเมมเบรนเข้าไปได้และผสมกับสารละลายโปรตีนอย่างช้าๆ ในขณะที่สารละลายโปรตีนไม่สามารถผ่านไดอะไลซิสเมมเบรนออกมาได้ เมื่อสภาวะเหมาะสมสารละลายโปรตีนจะมีสภาพอิ่มตัวยิ่งยวดจึงสามารถเกิดผลึกหรือตะกอน วิธีนี้ใช้สารตัวอย่างประมาณ 5 ไมโครลิตร และมีข้อดี คือสามารถนำชุดอุปกรณ์ที่บรรจุสารละลายโปรตีนเดิมใช้ซ้ำในการจุ่มในสารช่วยตกผลึกชนิดอื่นเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมได้



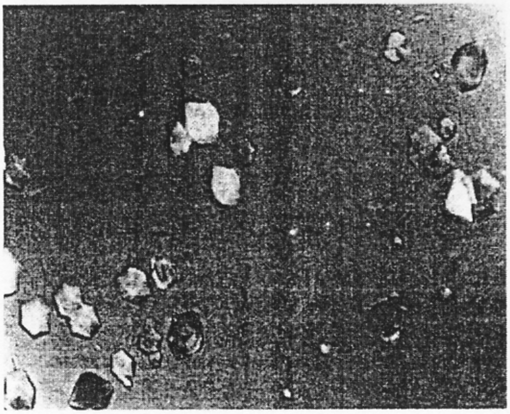
ภาพที่ 1-17 การตกผลึกโปรตีนโดยวิธีไดอะไลซิส

Figure 1-17 Dialysis experiment for protein crystallization.

ที่มา : Scope (1987)

3.5 การเก็บเกี่ยวโปรตีนโดยวิธีการตกผลึก

การตกผลึกเป็นวิธีที่สามารถเก็บเกี่ยวโปรตีนที่บริสุทธิ์ได้ในระดับอุตสาหกรรม จากการศึกษาของ Jacobsen และคณะ (1998) พบว่าสามารถตกผลึกไลเปสที่ผลิตโดยเชื้อราในอาหารเลี้ยงเชื้อจากถังหมัก โดยอาศัยหลักการละลายของโปรตีนที่มีค่าพีเอชเป็นตัวแปร ทำการทดลองที่อุณหภูมิคงที่ (28 องศาเซลเซียส) ปรับพีเอชด้วยการเติมกรดฟอร์มิค (Formic acid) ลงในสารตัวอย่างด้วยอัตราเร็วเท่ากับ 2 ไมโครลิตรต่อนาที หรือช้าที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้เพื่อให้ระบบของสารละลายเปลี่ยนแปลงอย่างช้าๆ ช่วยป้องกันการเกิดตะกอน ผลจากการทดลองพบว่าที่พีเอช 4.3-4.5 ทำให้ความสามารถในการละลายของไลเปสต่ำที่สุด ไลเปสที่มีอยู่ในสารละลายอิ่มตัวยิ่งยวดเปลี่ยนสถานะมาเป็นผลึกดังภาพที่ 1-18 และสามารถเก็บเกี่ยวไลเปสที่อยู่ในรูปผลึกได้ 60% แต่ถ้าปรับพีเอชให้ลดลงจนเหลือ 4.25 ทำให้เกิดตะกอนขึ้นซึ่งเป็นไปตามทฤษฎีที่ว่าด้วยการปรับค่าพีเอช ทำให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนเปลี่ยนแปลง ช่วงพีเอช 4.3-4.5 สารละลายอยู่ในสภาพอิ่มตัวยิ่งยวดจึงเกิดเป็นผลึกและถ้าโปรตีนเข้มข้นมากขึ้นหรือความสามารถในการละลายลดลงกว่านั้นจนทำให้โปรตีนตกตะกอน

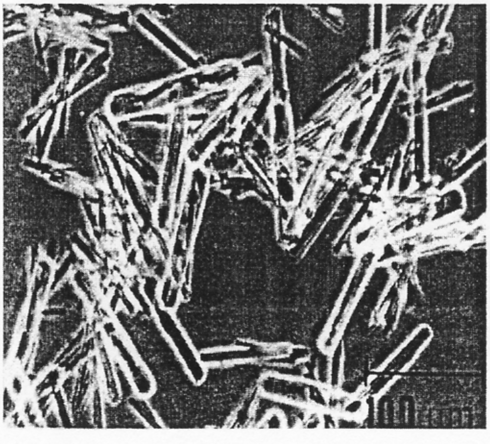


ภาพที่ 1-18 ผลึกเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตโดยเชื้อรา

Figure 1-18 Fungal lipase crystals.

ที่มา : Jacobsen และคณะ (1998)

Judge และคณะ (1995) ทดลองตกผลึกของโอวัลบูมิน (Ovalbumin) (ภาพที่ 1-19) จากโปรตีนไข่ขาว จากหลักการ Salting-out เพื่อลดค่าการละลายของโปรตีนทำให้สารละลายอยู่ในสภาพอิ่มตัวยิ่งยวด โดยเติมสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate) อิ่มตัวที่ความเข้มข้น 27%w/v อย่างช้าๆ ลงในสารละลายโปรตีนตัวอย่างในขณะที่กวนด้วยความเร็วต่ำและปรับพีเอชเป็น 4.9 ที่ 30 องศาเซลเซียส จากผลของ SDS-PAGE พบว่าสารละลายที่เหลือหลังตกผลึก (Mother liquor) มีโปรตีนโอวัลบูมิน (Ovalbumin) โคนัลบูมิน (Conalbumin) และไลโซไซม์ (Lysozyme) ในขณะที่ผลึกมีเฉพาะโอวัลบูมิน แสดงว่าสามารถแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ได้ ต่อมา Judge และคณะ (1998) ศึกษาการเกิดผลึกของไลโซไซม์จากสารละลายที่มีการปนเปื้อนโปรตีนหลายชนิด โดยใช้โปรตีนไข่ขาวเป็นวัตถุดิบซึ่งประกอบด้วยไลโซไซม์ 3.4%, โอวัลบูมิน 54%, โคนัลบูมิน 12% และอะวิดิน (Avidin) 0.05% ผลปรากฏว่าการปนเปื้อนของโปรตีนหลายชนิดไม่มีผลต่อการเกิดผลึก ซึ่งผลึกที่ได้มีความบริสุทธิ์มากกว่า 99.99% แต่มีผลต่ออัตราการโตของผลึกและที่สภาพความอิ่มตัวยิ่งยวดต่ำทำให้ผลึกหยุดโตได้



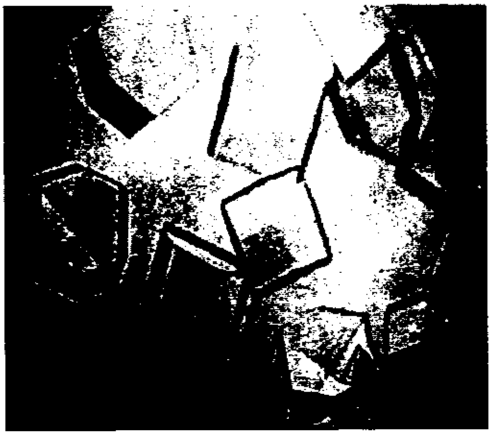
ภาพที่ 1-19 ผลึกโอวัลบูมินจากโปรตีนไข่ขาว

Figure 1-19 Ovalbumin crystals from chicken egg white protein.

ที่มา : Judge และคณะ (1995)

Cherdrungsi (1999) ทำการทดลองตกผลึกไลโซไซม์ (Lysozyme) โดยใช้สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว (26%w/v) เตรียมในบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate) พีเอช 4 เติมลงในสารละลายโปรตีนอย่างช้าๆที่เตรียมจากไลโซไซม์ 25 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกับที่ใช้ละลายเกลือปริมาตร 600 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นิวเคลียสของผลึกจะเกิดขึ้นและรวมตัวกันแยกออกจากสารละลาย Schwartz และ Berglund (2000) ได้ศึกษาใช้เทคนิค Hanging drop ตกผลึกไลโซไซม์ โดยใช้สารช่วยตกผลึกเช่นเดียวกับ Cherdrungsi (1999) ซึ่งมีลักษณะดังภาพ 1-20 พบว่าความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนเปลี่ยนแปลงระหว่างการเกิดผลึก เนื่องจาก 3 เหตุผลคือ (1) น้ำระเหยออกจากสารละลายโปรตีนสู่สารช่วยตกผลึกทำให้ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น (2) โปรตีนเปลี่ยนสถานะจากสารละลายไปอยู่ในรูปนิวเคลียส และ (3) โปรตีนเปลี่ยนไปเกาะที่ผิวผลึกทำให้โตขึ้นทำให้ความเข้มข้นลดลง

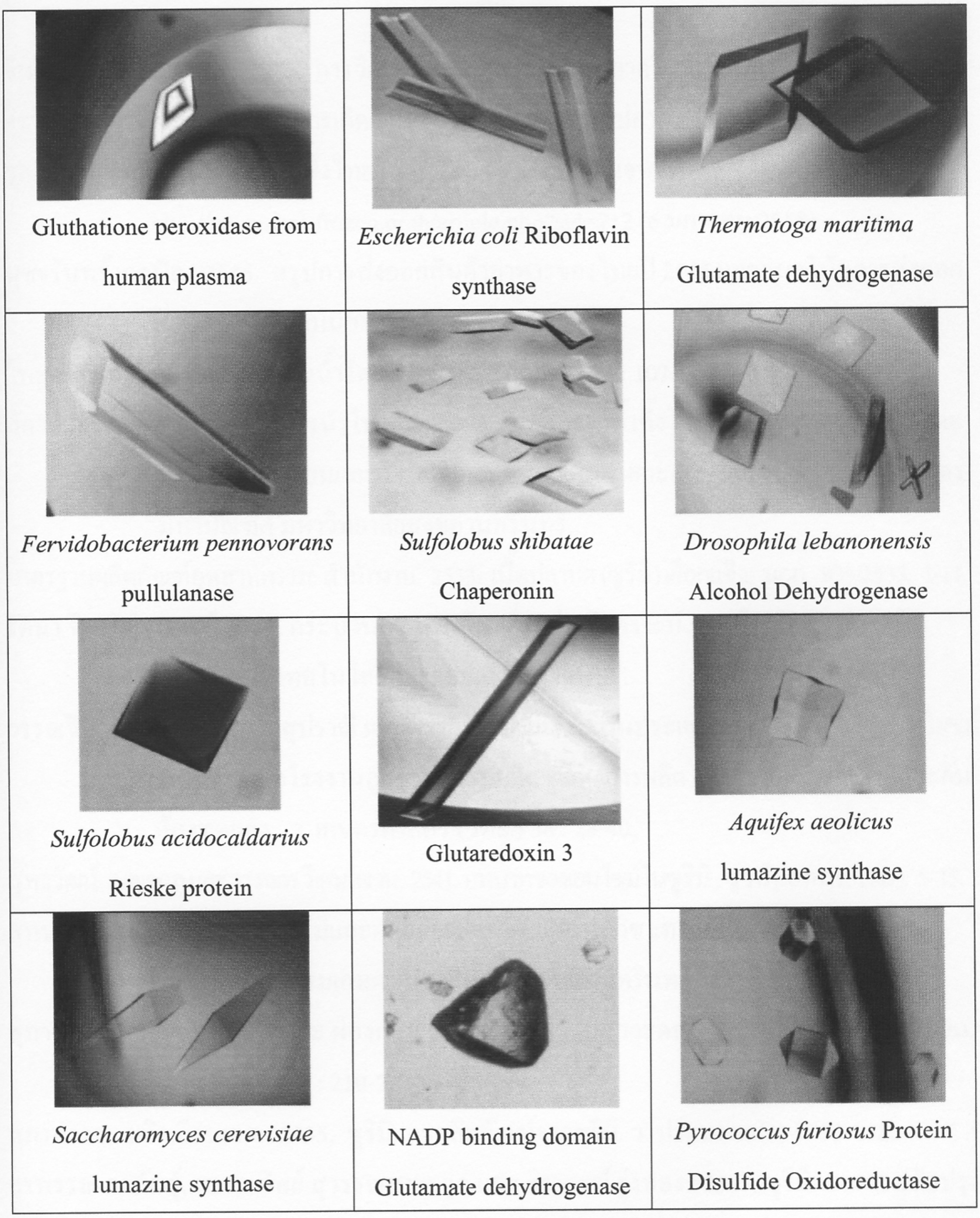
นอกจากนี้ยังมีโปรตีนอีกหลายชนิดที่มีการศึกษาการตกผลึกดังตัวอย่างภาพที่ 1-21



ภาพที่ 1-20 ผลึกไลโซไซม์

Figure 1-20 Lysozyme crystals.

ที่มา : Schwartz และ Berglund (2000)



Gluthatione peroxidase from human plasma | *Escherichia coli* Riboflavin synthase | *Thermotoga maritima* Glutamate dehydrogenase

Fervidobacterium pennovorans pullulanase | *Sulfolobus shibatae* Chaperonin | *Drosophila lebanonensis* Alcohol Dehydrogenase

Sulfolobus acidocaldarius Rieske protein | Glutaredoxin 3 | *Aquifex aeolicus* lumazine synthase

Saccharomyces cerevisiae lumazine synthase | NADP binding domain Glutamate dehydrogenase | *Pyrococcus furiosus* Protein Disulfide Oxidoreductase

ภาพที่ 1-21 ผลึกของโปรตีนชนิดต่างๆ

Figure 1-21 Protein crystals.

ที่มา : Meining (2000)

เอกสารอ้างอิง

จินตนา สิริพิทยานนท์. 2537. การวิเคราะห์โครงสร้างผลึก. ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล. 2541. การเกิดเจลของโปรตีนกล้ามเนื้อปลา. อาหาร 28(4) : 245–254.

จุลสารสมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย (ออนไลน์). 2547 สืบค้นจาก : http://www.thai-frozen.or.th/article.php?sid=212 (6 มกราคม 2548)

นุชจรินทร์ เกตุนิล. 2546. สรุปการส่งออกสินค้าอาหารของไทยปี 2545 และแนวโน้มการส่งออก ปี 2546. ว. สถาบันอาหาร 5(29) : 41-53.

ไพศาล วีรกิจ. 2544. การกรองน้ำโดยเมมเบรน. เทคนิค. 194 : 107-114.

ภัควดี ธรรมเจษฎา. 2543. การนำโปรตีนและไขมันออกจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมซูริมิโดยวิธีการรวมตะกอนและการลอยตะกอนด้วยอากาศละลาย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. สำนักงาน. 2533. เนื้อปลาบด (ซูริมิ) เยือกแข็ง. มอก. 935/2533. 1-11.

รัตนา จิระรัตนานนท์. 2541. กระบวนการแยกด้วยเยื่อแผ่นสังเคราะห์. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้ากรุงธนบุรี.

วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร, สุปราณี แย้มพราย และ สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ. 2541. การใช้ประโยชน์จากของเหลือโรงงานอุตสาหกรรมผลิตซูริมิ : การผลิตโปรตีนสกัดชนิดผงในระดับห้องทดลอง. ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย์.) 38 : 28-40.

สุทธวัฒน์ เบญจกุลและ วรรณพ วิเศษสงวน. 2541. บทบาทของเอนไซม์ในซูริมิ : ซูวาริ. อาหาร. 28(1). 5–15.

สุทธวัฒน์ เบญจกุล. 2536. ซูริมิและผลิตภัณฑ์จากซูริมิ. ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุภาพรรณ บริลเลียนเตส และ ผ่องเพ็ญ รัตตกูล. 2533. สภาวะตลาดโลกของซูริมิและปูเทียม. ว. ประมง 43(3) : 219-222.

สุภาพรรณ บริลเลียนเตส. 2535. ซูริมิและผลิตภัณฑ์จากซูริมิ. ว. ประมง 45(3) : 833-838.

อรพรรณ คงพันธุ์, พรรณทิพย์ สุวรรณสาครกุล และ จิราภรณ์ รุ่งทอง. 2545. ซูริมิและการปรับปรุงคุณภาพ. อาหาร 32(3) : 213-222.

อาภัสสรา ชมิดท์. 2537. คู่มือทางชีวเคมี. ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Abdessemed, D., Nezzal, G. and Aim, R.B. 1999. Treatment of wastewater by ultrafiltration. Desalination. 126 : 1-5.

Adu, G. A., Rabbitt, J. K. and Crawford, D. L. 1983. Effect of washing on the nutritional and quality characteristics of dried minced rockfish flesh. J. Food Sci. 48 : 1053–1055.

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.

An, H., Weerasinghe, V., Seymour, T. A. and Morrissey, M. T. 1994. Cathepsin degradation of Pacific whiting surimi proteins. J. Food Sci. 59(5) : 1013–1017.

Asherie, N. 2004. Protein crystallization and phase diagrams. Methods. 34 : 266-272.

Belter, P. A., Cussler, E. L. and Hu, W. S. 1988. Bioseparations: Downstream processing for biotechnology. John Wiley & Sons. United States of America.

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.

Berry, M. B. 1995. Protein Crystallization: Theory and Practice. สืบค้นจาก : http://www-bioc.rice.edu/~berry/paper/crystallization/crystallization.html (4 มกราคม 2545)

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.

Chayen, N. E. 1999. Recent advances in methodology for the crystallization of biological macromolecules. J. Cryst. Growth. 198 : 649-655.

Chayen, N. E. 2005. Methods for separating nucleation and growth in protein crystallization. Prog. Biophys. Mol. Biol. 88 : 329-337.

Cheang, B. and Zydney, L. 2004. A two-stage ultrafiltration peocess for fractionation of whey protein isolate. J. Membr. Sci. 231 : 159-167.

Cherdrungsi, K. 1999. Bulk Crystallization of Lysozyme. Ph.D. Dissertation. University of Qeensland.

D'Arcy, A., Sweeney, A. M. and Haber, A. 2004. Practical aspects of using the microbatch method in screening conditions for protein crystallization. Methods. 34 : 323-328.

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.

Fabiani, C., Pizzichini, M., Spadoni, M. and Zeddita, G. 1996. Treatment of waste water from silk degumming processes for protein recovery and water reuse. Desalination. 105 : 1-9.

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.

Giacomo, G. D., Re, G. D. and Spera, D. 1996. Milk whey treatment with recovery of valuable products. Desalination. 108 : 273-276.

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. Membr. 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.

Jacobsen, C., Garside, J. and Hoare, M. 1998. Nucleation and growth of microbial lipase crystals from clarified concentrated fermentation broths. Biotechnol Bioeng. 57(6) : 666-674.

Judge, R. A., Johns, M. R. and White, E. T. 1995. Protein purification by bulk crystallization : The Recovery of ovalbumin. Biotechnol. Bioeng. 48 : 316 – 323.

Judge, R. A., Forsythe,E. L. and Pusey, M. L. 1998. The effect of protein impurities on lysozyme crystal growth. Biotechnol. Bioeng. 59(6) : 776 – 785.

Juarez-Martinez, G., Garza, C., Castillo, R. and Moreno, A. 2001. A dynamic light scattering investigation of the nucleation and growth of thaumatin crystals. J. Cryst. Growth. 232 : 119-131.

Kierzek, A. M. and Zielenkiewicz, P. 2001. Models of protein crystal growth. Biophys. Chem. 91 : 1-20.

Kroner, K. H., Schutte, H., Hustedt, H. and Kula, M. R. 1984. Cross-flow filtration in the downstream processing of enzymes. Process Biochem. 67-74.

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

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.

Lo, M. Y., Cao, D., Argin-Soysal, S., Wang, J. and Hahm, T. 2005. Recovery of protein from poultry processing wastewater using membrane ultrafiltration. Bioresour. Technol. 96 : 687-698.

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.

McPherson, A. 1982. Preparation and Analysis of Protein Crystals. John Wiley & Sons. United States of America.

McPherson, A. 2004. Introduction to protein crystallization. Methods. 34 : 254-265.

Meining, W. 2000. Crystal Gallery (Online). Available : http://www.csb.ki.se/xray/gallery.html (2005. May 5)

Method of Protein Crystallization (Online). 2003. Available : http://prech.cimr.cam.ac.uk/Crouse/Cry7stals/Theory/methods.html (2003. April 7)

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.

Mohammadi, T., Madaeni, S. S. and Moghadam, M. K. 20020. Investigation of membrane fouling. Desalination. 153 : 155-160.

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.

Mueller, U., Nyarsik, L., Horn, M., Rauth, H., Przewieslik, T., Saenger, W., Lehrach, H. and Eickhoff, H. 2001. Development of technology for automation and miniaturization of protein crystallization. J. Biotechnol. 85 : 7 – 14.

Mullin, J. W. 1992. Crystallization. 3rd Ed. Butterworth-Heinemann. Oxford.

Pacheco-Aguilar, R., Crawford, D. L. and Lampila, L. E. Procedures for the efficent washing of minced whiting (*Merluccius productus*) flesh for surimi production. . J. Food Sci. 54(2) : 248-252.

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 Res. Int. 31(4): 265-272.

Papanikolau, Y., Gessmann,R., Petratos, K. Igarashi, K. and Kokkinidis, M. 2000. Crystallization of the *E. coli* polyamine-induced protein: a novel procedure based on the concept of ionic strength reducers. J. Cryst. Growth. 210 : 761-766.

Rosenberger, F. 1996. Protein crystallization. J. Cryst. Growth. 166 : 40-54.

Schwartz, A. M. and Berglund, K. A. 2000. In situ monotoring and control of lysozyme concentration during crystallization in hanging drop. J. Cryst. Growth. 210 : 753-760.

Scopes, R. K. 1987. Protein Purification: Principles and Practice . 2nd ed. Springer-Verlag. United States of America.

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.

Suzuki, T. 1981. Characteristics of Fish Meat and Fish Protein. *In* Fish and Krill Protein: Processing Technology. p. 1-61. Applied Science Publishers LTD. England.

Torres, M. R., Marin, F. R., Romos, A. J, and Soriano, E. 2002. Study of operating conditions in concentration of chicken blood plasma proteins by ultrafiltration. J. Food Eng. 54 : 215-219.

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

Zydney, A. L. 1998. Protein separations using membrane filtration: New opportunities for whey fractionation. Int. Dairy J. 8 : 243-250.