บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการทดลอง

6.1.1 ภาวะที่เหมาะสมในการตริงรูปปาเปนและนิวเตรสบนทราย

ภาวะที่เหมาะสมในการตริงรูปปาเปนและนิวเตรสบนทราย สรุปได้ดังตาราง ที่ 6.1

ตารางที่ 6.1 สรุปภาวะที่เหมาะสมในการตริงรูปปาเปนและนิวเตรสบนทราย

ภาวะในการตริงรูป	นิวเตรส	ปาเปน
ความเร็วของเครื่องเขย่า	200 รอบ/นาที	200 รอบ/นาที
เวลาในการเขย่าทรายกับเอนไซม์	90 นาที	90 นาที
ความเข้มข้นของสารละลายเอนีทีเอส	ร้อยละ 1 โดยปริมาตร	ร้อยละ 3 โดยปริมาตร
ความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์	ร้อยละ 5 โดยปริมาตร	ร้อยละ 7 โดยปริมาตร
ความเข้มข้นของเอนไซม์	ร้อยละ 3 โดยปริมาตร	ร้อยละ 5 นน./ปริมาตร
พีเอชในการตริงรูป	6.0(อะซีเตทบัฟเฟอร์)	8.5(ทริสบัฟเฟอร์)

6.1.2 สมบัติทางด้านจลนพลศาสตร์ของปาเปนและนิวเตรสตรึงรูปเทียบกับอิสระ

สมบัติทางด้านจลนพลศาสตร์ของปาเปนและนิวเตรสตรึงรูปเทียบกับอิสระ สรุปได้ดังตารางที่ 6.2

ตารางที่ 6.2 สรุปสมบัติทางด้านจลนพลศาสตร์ของปาเปนและนิวเตรสตรึงรูปเทียบกับอิสระ

ค่าทางจลนพลศาสตร์	นิวเตรส		ปาเปน	
	อิสระ	ตรึงรูป	อิสระ	ตรึงรูป
อุณหภูมิที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตีสูงที่สุด(°C)	50	50	80	80
พีเอชที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตีสูงที่สุด	6.7	7.1	6.4	5.9
เสถียรภาพต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 50 ° C	<----เท่ากัน------>		<-----เท่ากัน----->	
เสถียรภาพต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 70 ° C	ต่ำกว่า	สูงกว่า	ต่ำกว่า	สูงกว่า
เสถียรภาพต่อพีเอช	7.0	7.0-8.5	5.0	8.5
ค่าคงที่ไมคีลิส (มิลลิโมลาร์)	2.0×10^{-2}	4.1×10^{-3}	7.7×10^{-3}	1.1×10^{-3}
ค่าแอคติวิตีจำเพาะ(ยูนิต/มก.โปรตีน)	4608.4	337.9	482.3	451.9

6.1.3 ประสิทธิภาพในการทำปฏิกริยาซ้ำของปาเปนและนิวเตรสตรึงรูป

เมื่อนำปาเปนและนิวเตรสตรึงรูปทำปฏิกริยาซ้ำในการย่อยสลายเคซีน 1-7 ครั้ง แต่ละครั้งมีระยะเวลาทำปฏิกริยา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปทั้ง 2 ชนิด ลดลงมากเมื่อทำปฏิกิริยาซ้ำ 1-3 ครั้งแรก และคงที่เมื่อทำปฏิกริยาซ้ำในครั้งต่อ ๆ ไป โดยปาเปนและนิวเตรสมีแอคติวิตีคงเหลือร้อยละ 29 และ 50 ตามลำดับ

6.1.4 ผลของสารปฏิกิริยาของปาเปนและนิวเตรสตริงรูป

6.1.4.1 ผลของอีดีทีเอและซีสเตอีนต่อเสถียรภาพของปาเปนตริงรูป

ภาวะที่ทำให้ปาเปนตริงรูปมีเสถียรภาพดีที่สุดคือเก็บในสารละลายอีดีทีเอเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และซีสเตอีนเข้มข้น 0.08 โมลาร์ ในทริสบัฟเฟอร์พีเอช 8.5 ซึ่งสามารถรักษาแอคติวิตีของปาเปนตริงรูปได้ดีกว่าการเก็บในทริสบัฟเฟอร์พีเอช 8.5 แต่เพียงอย่างเดียวได้ถึง 3.4 เท่า เมื่อเก็บเป็นระยะเวลานาน 48 ชั่วโมง

6.1.4.2 ผลของแคลเซียมอิออนต่อเสถียรภาพของนิวเตรสตริงรูป

ภาวะที่ทำให้ปาเปนตริงรูปมีเสถียรภาพดีที่สุดคือ เก็บในสารละลายแคลเซียมซัลเฟตเข้มข้น 2×10^{-3} โมลาร์ ในน้ำกลั่น ซึ่งสามารถรักษาแอคติวิตีของนิวเตรสตริงรูปได้ดีกว่าการเก็บในทริสบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 แต่เพียงอย่างเดียวได้ประมาณ 2 เท่า เมื่อเก็บเป็นระยะเวลานาน 48 ชั่วโมง

6.1.5 เสถียรภาพของปาเปนและนิวเตรสตริงรูปในระหว่างการเก็บ

ปาเปนตริงรูปภายใต้ภาวะการเก็บในสารละลายอีดีทีเอเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และซีสเตอีนความเข้มข้น 0.08 โมลาร์ ในทริสบัฟเฟอร์พีเอช 8.5 และนิวเตรสตริงรูปภายใต้ภาวะการเก็ยในสารละลายแคลเซียมซัลเฟตเข้มข้น 2×10^{-3} โมลาร์ ในน้ำกลั่น มีเสถียรภาพตลอดช่วงเวลา 16-65 วัน โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงแอคติวิตี ที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส

6.1.6 การย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลาโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ปาเปนและนิวเตรสตริงรูปแบบฟลูอิไดซ์เบด

6.1.6.1 ผลของอุณหภูมิและจำนวนรอบต่อระดับการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลา

ปาเปนและนิวเตรสตริงรูปย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลาที่อุณหภูมิ 50 ° C ได้ดีกว่าที่ 35 ° C ในทุกรอบของการย่อยสลาย โดยนิวเตรสตริงรูปย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลาได้ดีกว่าปาเปนตริงรูปเมื่อเปรียบเทียบที่อุณหภูมิเท่ากัน ที่ space velocity 13.2 (นาที)$^{-1}$ ในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบดขนาด 1.7x75 เซนติเมตร จำนวน 1 คอลัมน์ (กำหนดให้ space velocity คือปริมาณของไหลที่ไหลผ่านเอนไซม์ตริงรูปในคอลัมน์ภายในเวลา 1 นาที)

6.1.6.2 ผลของปริมาณปาเปนและนิวเตรสตริงรูปต่อระดับการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลา

ภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำนึ่งปลาด้วยปาเปนและนิวเตรสตริงรูปคือที่ SV เท่ากับ 5.5 (นาที)$^{-1}$ เวลา 4 ชั่วโมง และ 7.9 (นาที)$^{-1}$ เวลา 3 ชั่งโมง ซึ่งจะทำให้ได้ระดับการย่อยสลายสูงสุดร้อยละ 65 และ 78 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 50 ° C ในเครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบดขนาด 1.7 x 75 เซนติเมตร จำนวน 3 คอลัมน์ต่อเนื่องกัน

6.1.7 การเตรียมและศึกษาสมบัติทางเคมีของสารสกัดจากปลาแบบแห้งแบบเข้มข้น

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากปลาภายใต้ภาวะการผลิตที่ได้จากข้อ 6.1.6 พบว่าประกอบด้วยความชื้นร้อยละ 92.9, โปรตีนร้อยละ 4.59, ไขมันร้อยละ 0.02 ,เถ้าร้อยละ 0.20 และเกลือร้อยละ 1.37 สัดส่วนองค์ประกอบทางเคมีดังกล่าวไม่ต่างไปจากสารสกัดจากปลาที่นำมาแปรรูปในแบบเข้มข้นและแบบแห้ง จากการทดสอบสมบัติด้านการละลายของสารสกัดจากปลาแบบแห้ง พบว่ามีระดับการละลายดีกว่ากรณีของน้ำนึ่งปลาแบบแห้งมากเมื่อเปรียบเทียบด้วยวิธีการทำแห้งแบบเดียวกัน โดยระดับการละลายของผงแห้ง

ที่ได้จากวิธีแช่เยือกแข็งมีระดับการละลายดีกว่าวิธีพ่นฝอย เมื่อพิจารณากรดอะมิโนอิสระในสารสกัดจากปลาเปรียบเทียบกับในน้ำนึ่งปลา พบว่าฮีสติดีนและไลซีนลดลงอย่างมาก ขณะที่กรดอะมิโนอื่น ๆ ลดลงเล็กน้อย ยกเว้นฟีนิลอะลานีนและไทโรซีนมีปริมาณเพิ่มขึ้น

6.1.8 การใช้ประโยชน์จากสารสกัดจากปลาเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร

ผลการทดสอบด้านประสาทสัมผัสของยาคิโทริ (บาบิคิวไก่) ที่ใช้สารสกัดจากปลาเข้มข้นเป็นสารเพิ่มรสปลา (fish flavor) และซุปบะหมี่ปลาที่ใช้สารสกัดจากปลาแบบแห้งเป็นสารให้รสปลา(fish flavor) พบว่าอยู่ในระดับดีทั้งลักษณะสี กลิ่น รส และการยอมรับรวม

6.2 ข้อสังเกตและข้อเสนอแนะ

ข้อสังเกตที่ได้รับจากผลงานวิจัย และประสบการณ์ทำวิจัยเรื่องนี้ มีทั้งข้อสังเกตเป็นประโยชน์และข้อสังเกตในส่วนที่ต้องพิจารณาปรับปรุงและเสนอแนะดังนี้ จากการทดลองเตรียมปาเปนและนิวเตรสตริงรูปบนทรายโดยใช้สารละลายเอพีทีเอสเป็นตัวกระตุ้น และสารละลายกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะเชื่อมขวาง พบว่าการตริงรูปมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติของเอนไซม์ที่ต่างไปจากปาเปนและนิวเตรสอิสระ ซึ่งสมบัติที่เปลี่ยนแปลงไปนี้มีผลในการเสริมประสิทธิภาพ และความเหมาะสมในการนำไปใช้ย่อยสลายโปรตีนจากน้ำนึ่งปลาในระบบต่อเนื่อง อาทิเช่น ทั้งปาเปนและนิวเตรสตริงรูปมีเสถียรภาพต่อความร้อนเพิ่มขึ้น กล่าวคือสามารถย่อยสลายโปรตีนจากน้ำนึ่งปลาที่อุณหภูมิสูงเป็นระยะเวลานาน โดยมีการสลายแอคติวิตีน้อยกว่าเมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระ ทำให้สามารถเลือกอุณหภูมิสูงเป็นภาวะสำหรับย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลา เพื่อป้องกันหรือหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ นอกจากนี้พีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ตริงรูปที่ได้แตกต่างจากอิสระเพียงเล็กน้อย โดยพีเอชที่ปาเปนและนิวเตรสแสดงแอคติวิตีสูงสุด ยังอยู่ในช่วงพีเอชของน้ำนึ่งปลา ทำให้มีความเหมาะสมอย่างมากในการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากทำให้ไม่สิ้นเปลืองเวลา แรงงาน อุปกรณ์ และสารเคมีที่จำเป็นต้องใช้ในการรักษาพีเอชของระบบให้สม่ำเสมอ อย่างไรก็ตามในการทดสอบประสิทธิภาพในการทำปฏิกริยาซ้ำของเอนไซม์ตริงรูปทั้ง 2 ชนิด พบว่าการตริงรูปด้วยวิธีนี้นอกจากเอนไซม์จะเชื่อมกับตัวพยุงด้วยพันธะโควาเลนต์ แล้วยังมีเอนไซม์บางส่วนที่เกาะกับตัวพยุงแบบดูดซับซึ่ง

เป็นแรงอ่อน และหลุดออกจากตัวพยุงได้ง่ายในระหว่างการทำปฏิกิริยา แต่ในการทดลองนี้พบว่าเอนไซม์ส่วนที่เกาะกับตัวพยุงด้วยพันธะโควาเลนต์จะหลุดได้น้อยและคงแอคติวิตีได้เช่นเดิม ซึ่งข้อนี้มิได้เป็นจุดบกพร่องมากนักสำหรับงานวิจัยเรื่องนี้ แต่ถ้าต้องการจะเพิ่มกำลังการเกิดพันธะโควาเลนต์ให้กับเอนไซม์และตัวพยุงก็ต้องเลือกวิธีที่ใช้อุณหภูมิและภาวะปฏิกิริยารุนแรงกว่านี้ ดังเช่น งานวิจัยของ Weetall (1969) ซึ่งเตรียมอะมิโนไซเลนของแก้วพรุนโดยรีฟลักซ์ (reflux) สารละลายเอพีทีเอสในโทลูอีนได้เป็นอนุพันธ์ของ p-aminobenzoyl ซึ่งทำปฏิกริยากับกรดไนตรัสในปฏิกิริยา diazonium ($NaNO_2$/HCl) ได้เป็นอนุพันธ์ของอะมิโนไซเลนบนแก้วพรุนซึ่งสามารถทำปฏิกริยากับเอนไซม์เกิดเป็นพันธะโควาเลนต์ แต่ปฏิกิริยาการเตรียมเอนไซม์ตรึงรูปนี้ค่อนข้างรุนแรงกว่าวิธีที่ใช้ในงานวิจัยนี้มาก เพราะใช้อุณหภูมิสูง กรดแก่ ในการทำปฏิกิริยา จึงคาดว่าอาจมีผลทำให้เกิดการเสียสภาพของเอนไซม์ได้ง่าย จึงได้เลือกวิธีการเตรียมปาเปนและนิวเตรสตรึงรูปบนทรายด้วยปฏิกิริยาการเกิด Schiff's base ซึ่งเป็นปฏิกริยาที่เกิดได้ง่ายที่อุณหภูมิห้อง และไม่ค่อยรุนแรงนักเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีของ Weetall

เมื่อเปรียบเทียบสมบัติของปาเปนและนิวเตรสตรึงรูปในการนำไปใช้งานในระบบต่อเนื่อง จะเห็นว่านิวเตรสตรึงรูปมีความเหมาะสมดีกว่าปาเปนตรึงรูปในด้านต่าง ๆ อาทิเช่น มีประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยาซ้ำดีกว่า มีเสถียรภาพในการเก็บดีกว่า การสูญเสียแอคติวิตีในระหว่างการใช้งานอย่างต่อเนื่องน้อยกว่า จากสมบัติดังกล่าวทำให้นิวเตรสตรึงรูปให้ระดับการย่อยสลายสูงสุดสูงกว่าการใช้ปาเปนตรึงรูปในการย่อยสลายน้ำนึ่งปลาในระยะเวลาที่สั้นกว่า ดังนั้นนิวเตรสตรึงรูปจึงมีความเหมาะสมในการนำไปศึกษาในระดับสูงต่อไป

สำหรับในแง่ของอุตสาหกรรม การใช้ระบบการผลิตสารสกัดจากปลาอย่างต่อเนื่องโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูป ด้วยผลการทดลองที่เสนอนี้ แม้จะมีนักวิจัยต่างประเทศได้รายงานให้ทราบบ้าง แต่เป็นเพียงส่วนน้อย ผลการวิจัยตลอดทั้งเทคโนโลยีที่นำเสนออาจจะประยุกต์ให้สอดรับกับอุปกรณ์และความพร้อมในโรงงานอุตสาหกรรมในประเทศไทยได้ กล่าวคือให้ความสะดวกในด้านสามารถทำงานได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่จำเป็นต้องรอน้ำนึ่งปลาให้มีปริมาณเพียงพอสำหรับการย่อยสลายดังที่เคยใช้ในระบบไม่ต่อเนื่องของเอนไซม์อิสระ ซึ่งให้ข้อดีทางด้านการหลีกเลี่ยงปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในระหว่างรอการย่อยสลายในถังพัก นอกจากนี้ยังประหยัดเนื้อที่การทำงานในโรงงานได้ดี อย่างไรก็ตามการขยายสเกลการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

จะต้องพิจารณาปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องอีกหลายประการ ซึ่งควรจะต้องมีการศึกษาในระดับสูงต่อไป ได้แก่ วัสดุสำหรับทำคอลัมน์ รูปร่างของคอลัมน์ เครื่องสูบของการไหลสำหรับความดันตกในคอลัมน์ นอกจากนี้จะต้องศึกษาตัวแปรต่าง ๆ ที่มีอิทธิพลต่อการขยายสเกลการผลิต ดังนี้ สัดส่วนของคอลัมน์ ซึ่งหมายถึงอัตราส่วนของความสูงของคอลัมน์ต่อเส้นผ่านศูนย์กลาง หรือศึกษาผลของความเร็วเชิงเส้นของน้ำนิ่งปลาต่ออัตราเร็วปฏิกริยา นอกจากนี้จะต้องศึกษาเสถียรภาพการทำงานของเอนไซม์ตรึงรูป หรือการสลายแอคติวิตีของคอลัมน์ในระหว่างปฏิกิริยาเอนไซม์ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่จะชี้ให้เห็นว่าอุตสาหกรรมนั้นประสบความสำเร็จหรือล้มเหลว ดังนั้นจึงต้องศึกษาข้อมูลการเปลี่ยนค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ในระหว่างการใช้งานระยะยาว โดยพิจารณาการลดลงของเสถียรภาพการทำงาน หรือค่าครึ่งชีวิต (half life) ซึ่งหมายถึงเวลาที่แอคติวิตีคงเหลือหรือสลายไปร้อยละ 50 ของเริ่มต้น เพื่อหาเวลาที่จะสิบต่อแอคติวิตีโดยยืดเวลาการใช้งานโดยเติมเอนไซม์ตรึงรูปลงไปเท่ากับแอคติวิตีที่สูญเสีย ซึ่งปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อเสถียรภาพการทำงานของเอนไซม์ได้แก่ อุณหภูมิ และอัตราการไหลของน้ำนิ่งปลาในคอลัมน์ โดยหาอัตราการสลายแอคติวิตีของเอนไซม์จากปัจจัยต่าง ๆ นี้ อยู่ในรูปค่าคงที่ของการสลายแอคติวิตีของเอนไซม์ (Kd) ซึ่งคำนวณจากสมการ 6.10 และ 6.11

$$Kd = \frac{2.303}{\theta} \log \frac{E}{E_o} \qquad (6.10)$$

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{Kd} \qquad (6.11)$$

ในสมการทั้งสองนี้

Kd = ค่าคงที่ของการสลายของเอนไซม์ (enzyme decay constant)

θ = เวลาการทำงาน (operation time)

E_o = แอคติวิตีของเอนไซม์เริ่มต้น (initial enzyme activity)

E_θ = แอคติวิตีของเอนไซม์หลังเวลา (enzyme activity after time θ)

$t_{1/2}$ = ค่าครึ่งชีวิต (half-life)

นอกจากการศึกษาด้านการขยายสเกลการผลิตในระดับอุตสาหกรรมแล้ว อาจศึกษาเกี่ยวกับคุณภาพโปรตีนของสารสกัดจากปลาที่ได้ และการใช้ประโยชน์ที่หลากหลายขึ้น อาทิเช่น ศึกษาสมบัติการเป็นอิมัลชั่น สมบัติการเกิดโฟมในผลิตภัณฑ์ขนมอบ เปรียบเทียบกับโปรตีนคุณภาพสูงอื่น ๆ หรือศึกษาการทดแทนโปรตีนในอาหารสัตว์ที่กินธัญพืชเป็นอาหาร เพื่อเพิ่มปริมาณไลซีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำกัดในธัญพืช โดยทดแทนในอาหารสัตว์ในอัตราส่วนต่าง ๆ และติดตามค่า Protein Efficiency Ratio (PER) เพื่อพิจารณาระดับการทดแทนที่เหมาะสมให้มีค่าสูงกว่าหรือเทียบเท่าระดับมาตรฐาน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการแก้ปัญหาขาดแคลนในประเทศที่กำลังพัฒนาได้ หรืออาจจะทดลองการใช้ประโยชน์ด้านสารปรุงแต่งกลิ่นรสในอาหารมนุษย์ ดังเช่นตัวอย่างเบื้องต้นที่ได้เสนอมาในงานวิจัยนี้

สำหรับข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้จากงานวิจัยนี้ นอกจากจะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการผลิตสารสกัดจากปลาโดยตรงแล้ว ยังสามารถใช้เป็นข้อมูลต้นแบบสำหรับอุตสาหกรรมอื่น ๆ ได้อีก อาทิเช่น อุตสาหกรรมน้ำปลาเพื่อลดระยะเวลาการผลิตน้ำปลา อุตสาหกรรมเบียร์เพื่อป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์ การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโปรตีนเหลือทิ้งในอุตสาหกรรมฆ่าสัตว์ เช่น จากเลือด เศษเนื้อ และการกำจัดของเหลือทิ้งจากโรงงานแปรรูปปลา การเพิ่มการละลายของขยะโปรตีนในโรงพยาบาล เป็นต้น