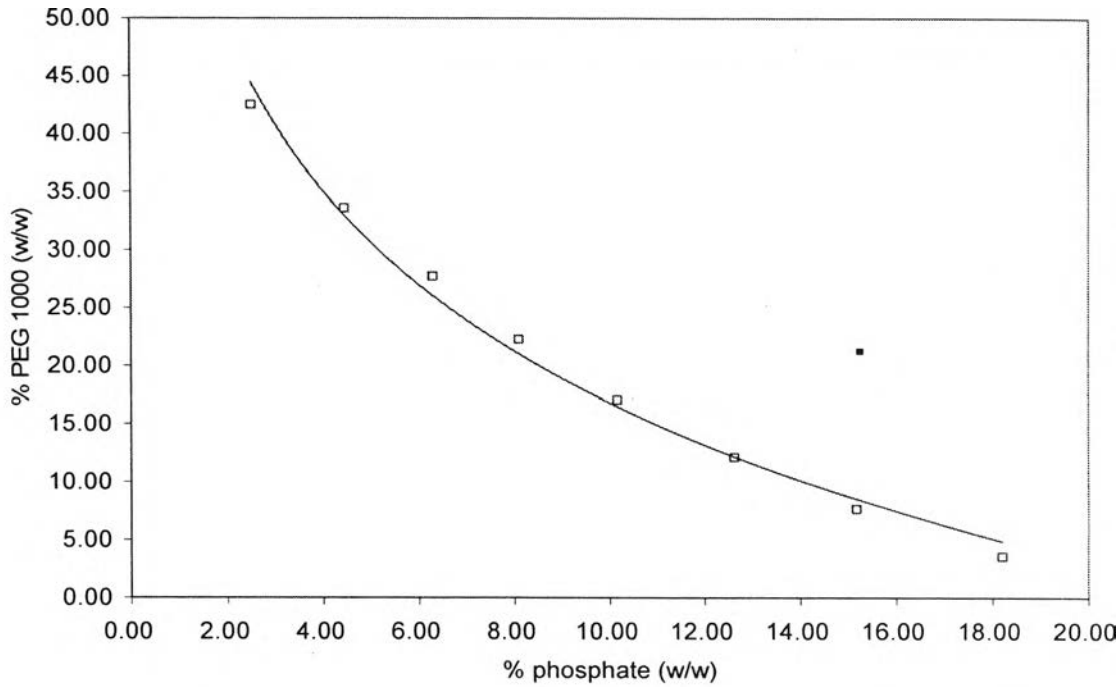
บทที่ 5

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

5.1 บทนำ

การพัฒนาการแยกเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสโดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในห้องปฏิบัติการวิศวกรรมชีวเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยนั้นได้มีการพัฒนามาเป็นลำดับขั้น โดยเริ่มต้นจากการศึกษาการกระจายตัวของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่อยู่ในรูปของครูดเอนไซม์(crude enzyme)จากเชื้อ *Bacillus subtilis* NS99 ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของพอลิเอทิลีนไกลคอล 1000(PEG1000)/ โพแทสเซียมฟอสเฟต/ น้ำ ที่อุณหภูมิห้องและความดันบรรยากาศ(นันทิญา, 2543) ต่อมาได้มีการศึกษาการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสจากน้ำหมักจริงโดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในหอสกัดชนิดโอลชูรัชตันขนาด 0.715 ลิตร ที่อุณหภูมิห้องและความดันบรรยากาศ(วิไลวรรณ, 2544) และได้มีการออกแบบและขยายสเกลหอสกัดโอลชูรัชตันเป็นขนาด 5.7 ลิตร สำหรับสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสโดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่อุณหภูมิห้องและความดันบรรยากาศ(ธนพงษ์ และคณะ, 2545)

ส่วนงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสจากน้ำหมักของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในหอสกัดโอลชูรัชตันขนาด 5.7 ลิตร โดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบดังนี้ PEG 1000 21.25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก/ โพแทสเซียมฟอสเฟต 15.25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก/ น้ำ 63.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ภาวะที่ทำการทดลองคือค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเท่ากับ 7.5 ที่อุณหภูมิห้อง(30±2 องศาเซลเซียส) สัดส่วนปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่องต่อวัฏภาคกระจายตัวที่ 3:1 โดยองค์ประกอบของระบบและภาวะที่ทำการวิจัยนั้นจะเป็นภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากงานวิจัยของวิไลวรรณ(2544) ตำแหน่งองค์ประกอบของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคจะแสดงบนแผนภูมิวัฏภาคดังรูปที่ 5.1 ซึ่งจุดที่แสดงในรูปที่ 5.1 จะเป็นองค์ประกอบของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ใช้ในงานวิจัยนี้ โดยจะอยู่ในช่วงเหนือเส้นแบ่งวัฏภาคดังนั้นองค์ประกอบนี้อยู่ในช่วงสองวัฏภาคอย่างแท้จริง



รูปที่ 5.1 แสดงเส้นแบ่งวัฏภาค(binodal curve) ของระบบ PEG100016 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก/ โพแทสเซียมฟอสเฟต 25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก/ น้ำและน้ำหมัก 59 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5(วชิระและพรพรรณ, 2548) และ ▪ แทนองค์ประกอบของระบบสารลายน้ำสองวัฏภาคที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ในการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสในงานวิจัยนี้ได้ทำการเตรียมวัฏภาคต่อเนื่องและวัฏภาคกระจายตัว(วิไลวรรณ, 2544) สำหรับดำเนินการสกัดดังนี้

<u>วัฏภาคต่อเนื่อง</u>

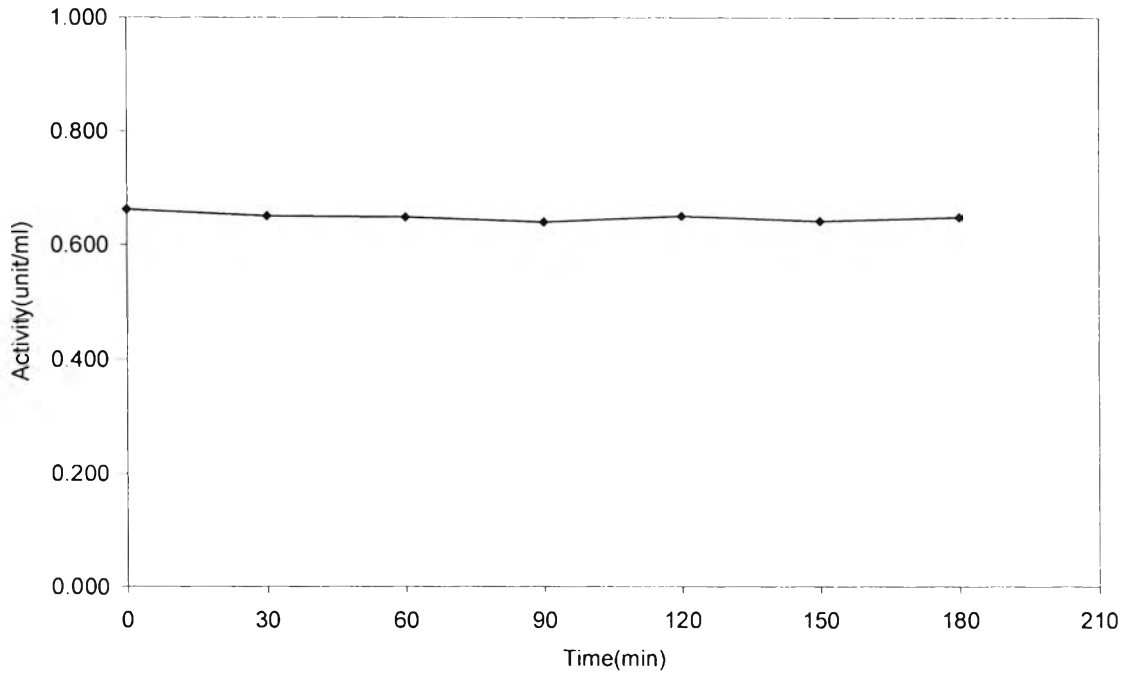
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	8.35	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	19.65	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก
น้ำกรอง	72.00	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

<u>วัฏภาคกระจายตัว</u>

PEG 1000	42.5	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.75	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.75	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก
น้ำกรอง	55.00	เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

ซึ่งวัฏภาคต่อเนื่องจะเป็นวัฏภาคที่มีการเติมน้ำหมักแทนที่น้ำกรอง เมื่อเตรียมวัฏภาคต่อเนื่องและวัฏภาคกระจายตัวที่เหมาะสมแล้ว จะทำการป้อนวัฏภาคต่อเนื่องที่มีน้ำหมักผสมอยู่และวัฏภาคกระจายตัวเข้าสู่หอสกัดโอลชูรัชตันขนาด 5.7 ลิตร ดังในหัวข้อที่ 4.3.1.2 ซึ่งหอสกัดจะมี

ลักษณะดังแสดงในรูปที่ 4.1 และในงานวิจัยนี้จะดำเนินการสกัดแบบไหลสวนทางกันของทั้งสองวัฏภาคเพื่อเพิ่มการถ่ายเทมวลสารระหว่างวัฏภาคและจะเก็บตัวอย่างทั้งสองวัฏภาคเพื่อนำมาวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ระยะเวลาต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 5.2



รูปที่ 5.2 แสดงความเข้มข้นของเอนไซม์ในวัฏภาคกระจายตัวขาออกที่เวลาในการสกัดต่างๆ ภาวะที่ทำการทดลองคือ ความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก อัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัวที่ 42/12 มิลลิลิตรต่อนาที การปั่นกวนของใบพัด 100 รอบต่อนาที

จากรูปที่ 5.2 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของวัฏภาคกระจายตัวขาออกที่เวลาการสกัดต่างๆ โดยในการคำนวณหาประสิทธิภาพการสกัดของหอสกัด จะนำค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่อยู่ในสภาวะคงตัว(Steady state) มาคำนวณ ในสภาวะนี้ความเข้มข้นของเอนไซม์จะคงที่ตามเวลา จากรูปที่ 5.2 แสดงให้เห็นว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เริ่มต้นออกจากหอสกัดที่เวลาที่ 0 นาทีจนถึงเวลาที่ 180 นาทีมีค่าคงที่จึงถือได้ว่าเป็นสภาวะคงตัว ดังนั้นเมื่อจะคำนวณหาประสิทธิภาพการสกัดของหอสกัดจึงสามารถนำค่าเฉลี่ยของค่ากิจกรรมเอนไซม์มาใช้ในการคำนวณได้

ในงานวิจัยนี้จะพิจารณาประสิทธิภาพการสกัดของหอสกัดขนาด 5.7 ลิตรจากปัจจัยต่างๆ ดังนี้

- โพรไฟล์ความเข้มข้นของเอนไซม์ในวัฏภาคต่อเนื่องตามความสูงของหอสกัด
- ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมของเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสระหว่างวัฏภาค($K_{OD}a$)
- เปอร์เซ็นต์ผลได้ (%Yield)

- จำนวนเท่าความบริสุทธิ์ (Purification factor, PF)

เมื่อพิจารณาปัจจัยในการทำงานของหอสกัดจะพบว่ามีทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับอัตราการถ่ายเทมวลสาร ซึ่งสามารถพิจารณาได้จากสมการที่ 5.1 ดังนี้

5.1

จากสมการที่ 5.1 จะเห็นได้ว่ามีหลายปัจจัยที่ส่งผลให้อัตราการถ่ายเทมวลสารเปลี่ยนแปลงไปได้แก่ อัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว การปั่นกวนของใบพัดและความแตกต่างของความเข้มข้นระหว่างวัฏภาค เนื่องจากเมื่ออัตราการไหลของวัฏภาคกระจายตัวเปลี่ยนแปลงจะส่งผลต่อขนาดหยดของวัฏภาคกระจายตัว ซึ่งจะส่งผลต่อ hold up ของวัฏภาคกระจายตัวและพื้นที่ที่ใช้ในการถ่ายเทมวลสาร และเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงความเร็วรอบของใบพัด จะทำให้ขนาดหยดของวัฏภาคกระจายตัวเปลี่ยนแปลงไป เมื่อขนาดหยดของวัฏภาคกระจายตัวเปลี่ยนไป จะส่งผลต่อ hold up ของวัฏภาคกระจายตัว เมื่อ hold up เกิดการเปลี่ยนแปลงจะส่งผลต่อค่า a ซึ่งเป็นพื้นต่อปริมาตรที่มีการถ่ายเทมวลสารในสมการที่ 5.1 แต่การเปลี่ยนแปลงความเร็วรอบของใบพัดนอกจากจะทำให้หยดของวัฏภาคกระจายตัวมีขนาดเล็กลงแล้ว แรงเฉือนของใบพัดยังทำให้เกิดการไหลของวัฏภาคแบบปั่นป่วน(turbulence) ซึ่งสามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างความหนาของชั้นฟิล์มกับค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลสารผ่านชั้นฟิล์ม(film coefficient) ของแต่ละวัฏภาคดังสมการที่ 5.2 (Laddhaและ Degaleesan, 1978)

$$k = \frac{D}{\delta} \qquad 5.2$$

จากสมการที่ 5.2 เมื่อความหนาของชั้นฟิล์มลดลง จะทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลผ่านชั้นฟิล์มของแต่ละวัฏภาคสูงขึ้น ส่งผลให้ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมในสมการที่ 5.3 และ 5.4 (Laddha และ Degaleesan, 1978) เพิ่มขึ้นด้วย โดยที่ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลผ่านชั้นฟิล์มของแต่ละวัฏภาคมีความสัมพันธ์กับค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวม ดังนี้

$$\frac{1}{K_{OX}} = \frac{1}{k_X} + \frac{1}{mk_Y} \qquad 5.3$$

และ

$$\frac{1}{K_{OY}} = \frac{1}{k_Y} + \frac{m}{k_X} \qquad 5.4$$

และจากสมการที่ 5.1 ยังพบว่า ผลต่างของความเข้มข้นของเอนไซม์ระหว่างวัฏภาค(ΔC) จะผลต่ออัตราการถ่ายเทมวลสารโดยตรง

จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพการสกัดของหอสกัดจะขึ้นอยู่ 3 ปัจจัยได้แก่ ความเข้มข้นของน้ำหมักเริ่มต้น อัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวและการปั่นกวนของใบพัด ดังนั้น

งานวิจัยนี้ จึงทำการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยดังกล่าวเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมกับการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัดโอลชูรัชตันขนาด 5.7 ลิตร

<u>กำหนดตัวแปรต่างๆดังนี้</u>

a คือ พื้นที่ในการถ่ายเทมวลต่อ dispersion volume ทั้งหมดภายในหอสกัด (cm^2/cm^3)

ΔC คือ ผลต่างของความเข้มข้นของเอนไซม์ระหว่างวัฏภาค ($unit/cm^3$)

D คือ ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (cm^2/min)

k คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลสารผ่านชั้นฟิล์ม (cm/min)

k_x k_y คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลสารผ่านชั้นฟิล์ม อ้างอิงวัฏภาคต่อเนื่องและวัฏภาคกระจายตัวตามลำดับ (cm/min)

K_{OD} คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวม อ้างอิงวัฏภาคกระจายตัว (cm/min)

K_{Ox}, K_{Oy} คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวม อ้างอิงวัฏภาคต่อเนื่องและวัฏภาคกระจายตัวตามลำดับ (cm/min)

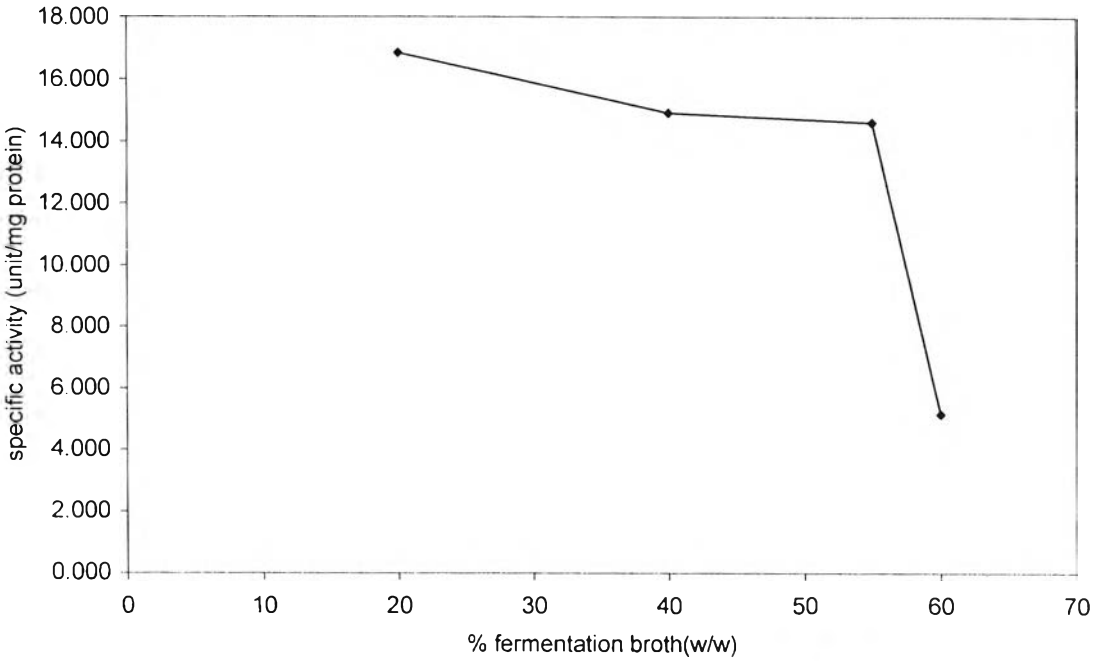
m คือ ค่าสัมประสิทธิ์การแยก

N คือ อัตราการถ่ายเทมวลสารระหว่างวัฏภาค ($unit/cm^3.sec$)

δ คือ ความหนาของชั้นฟิล์ม(cm)

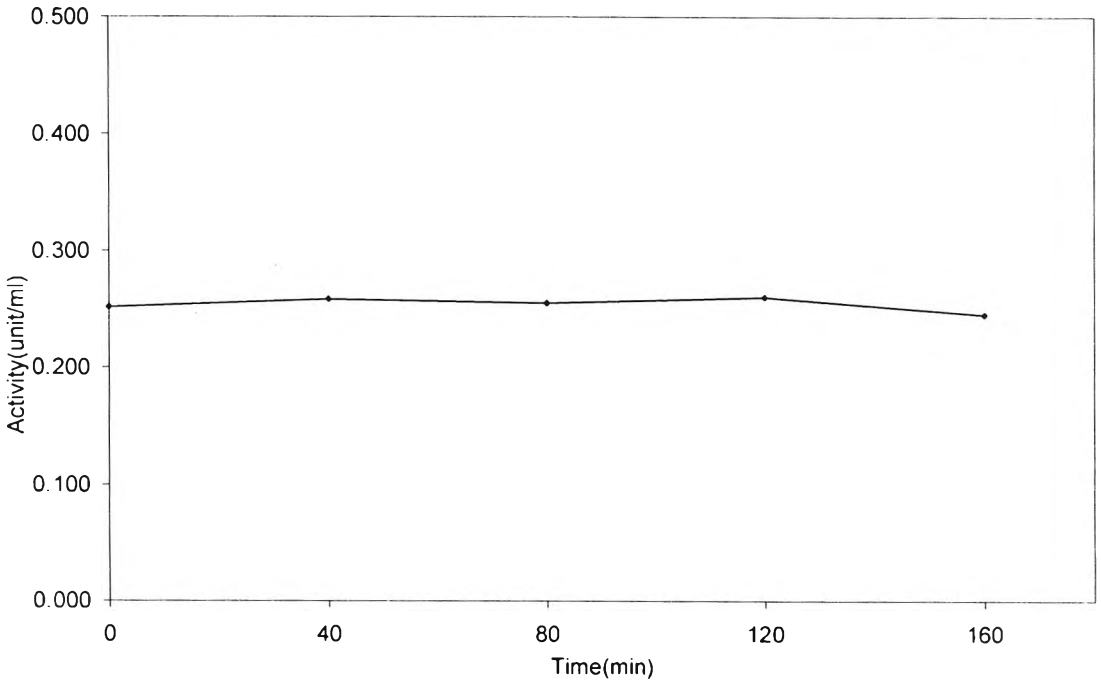
5.2 อิทธิพลของความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่อง

ในการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องจะทำการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของน้ำหมักในช่วง 20-72 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ซึ่งที่ความเข้มข้น 72 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เป็นความเข้มข้นของน้ำหมักมากที่สุดที่สามารถเติมเข้าไปในวัฏภาคต่อเนื่องได้ แต่จากการทดลองพบว่า ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำหมักที่สามารถดำเนินการสกัดได้จะอยู่ในช่วง 20-55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เนื่องจากในการเตรียมวัฏภาคต่อเนื่องเริ่มต้นนั้น จะต้องทำการละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตทั้งสองชนิดให้หมดเสียก่อน จากนั้นจึงเติมน้ำหมักลงในสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟต ซึ่งจะได้วัฏภาคต่อเนื่องที่พร้อมจะดำเนินการสกัด แต่จากการเตรียมสารของวัฏภาคต่อเนื่องเพื่อใช้ในการสกัดนั้น วัฏภาคต่อเนื่องที่มีความเข้มข้นของน้ำหมักมากกว่า 55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก น้ำที่มีอยู่ในวัฏภาคมีปริมาณน้อยเกินไปไม่สามารถละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตทั้งสองชนิดได้หมด ซึ่งเมื่อเติมน้ำหมักลงไป ทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสลดลงอย่างชัดเจนดังแสดงในรูปที่ 5.3 ดังนั้นความเข้มข้นของน้ำหมักสูงสุดที่สามารถดำเนินการสกัดได้คือ 55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก



รูปที่ 5.3 แสดงค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆของน้ำหมักในถังป้อนก่อนเข้าหอสกัด
ภาวะที่ทำการทดลองคือ ที่อุณหภูมิห้อง(30±2 องศาเซลเซียส) ไม่มีการปั่นกวนของใบพัด

ในขณะที่ดำเนินการสกัดเราจะทำการวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ของวัฏภาคต่อเนื่องที่ป้อนเข้าหอสกัดตามระยะเวลาที่ทำการทดลองโดยจะพบว่า ในระหว่างดำเนินการสกัดค่ากิจกรรมเอนไซม์จะมีค่าค่อนข้างคงที่ ดังแสดงในรูปที่ 5.4 ในทุกๆการทดลอง จึงทำให้เราแน่ใจได้ว่าเอนไซม์ไม่ได้เสื่อมสภาพในระหว่างการดำเนินการสกัด

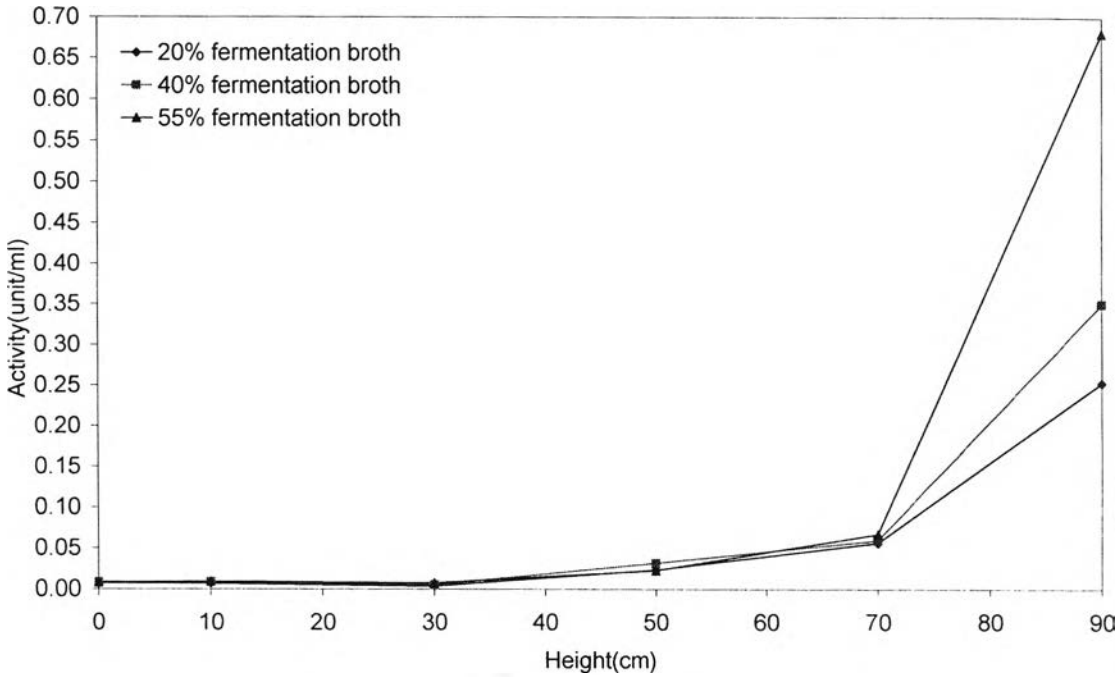


รูปที่ 5.4 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในวัฏภาคต่อเนื่องเริ่มต้นตามระยะเวลาที่ทำการทดลอง ภาวะที่ทำการทดลองคือ ความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ไม่มีการปั่นกวนของใบพัด อุณหภูมิห้อง(30±2 องศาเซลเซียส)

5.2.1 อิทธิพลของความเข้มข้นของน้ำหมักต่อโพรไฟล์ความเข้มข้นของเอนไซม์ในวัฏภาคต่อเนื่องตามความสูงของหอสกัด

เมื่อทำการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเริ่มต้นที่มีผลต่อโพรไฟล์ความเข้มข้นของเอนไซม์ในวัฏภาคต่อเนื่องตามความสูงของหอสกัด จากการทดลองพบว่า เมื่อดำเนินการสกัดที่ความเข้มข้นน้ำหมักในช่วง 20-55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จะได้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 5.5 โดยพบว่าที่ระดับความสูง 90 เซนติเมตร (อ้างอิงตำแหน่งขาออกของวัฏภาคต่อเนื่องที่ความสูง 0 เซนติเมตร) ซึ่งเป็นระดับความสูงที่วัฏภาคต่อเนื่องเข้าสู่หอสกัด ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่วัดได้จึงเป็นค่ากิจกรรมของวัฏภาคต่อเนื่องขาเข้า ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำหมักเพิ่มมากขึ้น และเมื่อพิจารณาที่ตำแหน่ง 90 ถึง 70 เซนติเมตร พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ในวัฏภาคต่อเนื่อง จะมีค่าลดลงจากค่าเริ่มต้นอย่างชัดเจนเหลือเพียง 0.057-0.068 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้เนื่องจากผลของ Entrance effect ซึ่งเป็นผลมาจาก 2 สาเหตุ คือ 1. เกิดการถ่ายเทมวลระหว่างเอนไซม์ที่กระจายตัวอยู่ในวัฏภาคต่อเนื่องขาเข้ากับบริเวณ settling zone และ ระหว่างเอนไซม์ที่กระจายตัวอยู่ในวัฏภาคต่อเนื่องขาเข้ากับวัฏภาคกระจายตัวที่อยู่ภายในหอสกัด 2. เมื่อวัฏภาคกระจายตัวลอยขึ้นมาจะมีขนาดใหญ่และเมื่อชนกับบริเวณ interface จะแตกออกเป็น

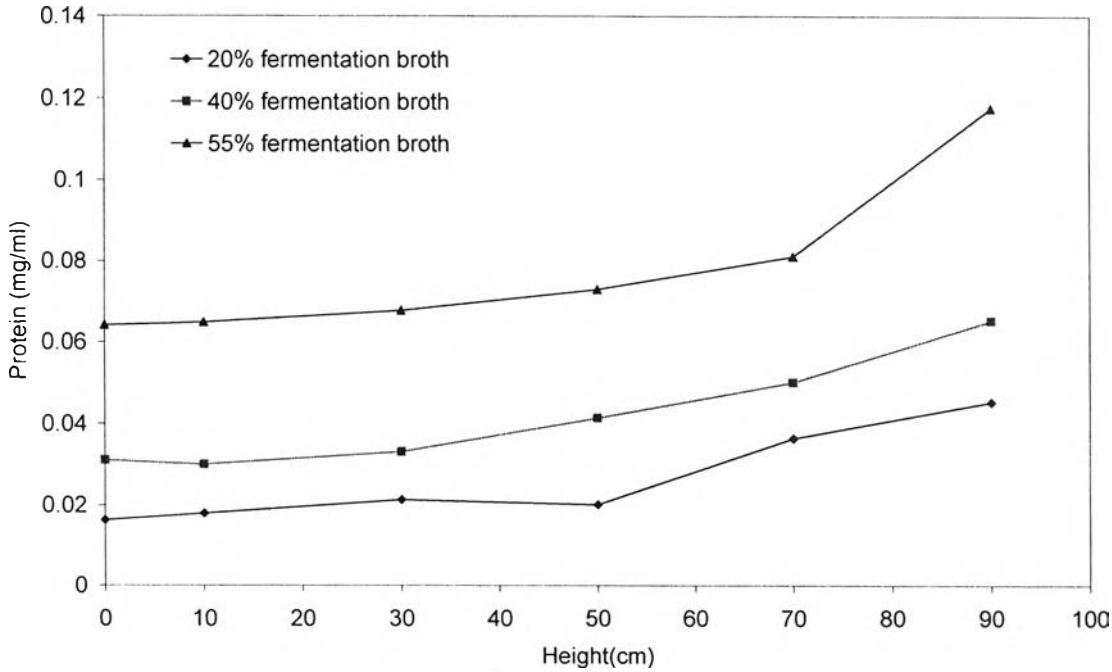
หยดขนาดเล็กๆ ทำให้มีพื้นที่ผิวในการถ่ายเทมวลสารมาก จากทั้งสองสาเหตุจึงทำให้บริเวณยอดหอสกัดมีการถ่ายเทมวลสารมากกว่าที่ระดับอื่นๆ ดังแสดงไว้ในหัวข้อที่ 2.5



รูปที่ 5.5 แสดงอิทธิพลของความเข้มข้นน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเริ่มต้นต่อโพรไฟล์ความเข้มข้นของเอนไซม์ในวัฏภาคต่อเนื่องตามความสูงของหอสกัด
ภาวะที่ทำการทดลองคือ อัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัว ที่ 42 /12 มิลลิลิตรต่อนาที การปั่นกวนของใบพัด 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส)

และที่ระดับความสูง 70 ถึง 30 เซนติเมตร ค่ากิจกรรมเอนไซม์ในวัฏภาคต่อเนื่องจะมีลักษณะลดลงอย่างเป็นเส้นตรง โดยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นในช่วงนี้จะมีค่าน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับที่ระดับความสูง 90 ถึง 70 เซนติเมตร และที่ความสูงต่ำกว่า 30 เซนติเมตรลงไป จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรมเอนไซม์ในวัฏภาคต่อเนื่องอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากมีเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสเหลือจะอยู่ในวัฏภาคต่อเนื่องน้อยมาก การสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสของวัฏภาคต่อเนื่องสู่วัฏภาคกระจายตัวจะเกิดขึ้นเป็นส่วนใหญ่ที่ระดับความสูง 90 ถึง 70 เซนติเมตร เมื่อพิจารณาโพรไฟล์ความเข้มข้นของโปรตีนรวมตามความสูงของหอสกัดดังแสดงในรูปที่ 5.6 จะพบว่าความเข้มข้นของโปรตีนในวัฏภาคต่อเนื่องจะมีค่าลดลงจากเริ่มต้นในช่วง 90 ถึง 70 เซนติเมตร ซึ่งเป็นผลมาจาก Entrance effect แต่ในระดับความสูงที่ต่ำกว่า 70 เซนติเมตรลงไป จะพบว่าความชันของแต่ละเส้นกราฟมีค่าไม่แตกต่างกันมากนักเนื่องจากการถ่ายเทมวลของโปรตีนรวมมีค่าใกล้เคียงกันแต่มีปริมาณโปรตีนที่เหลือในวัฏภาคต่อเนื่องแตกต่างกัน เพราะเมื่อความ

เข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเพิ่มขึ้นโปรตีนรวมจะมีค่าเพิ่มขึ้น แต่การถ่ายเทมวลของโปรตีนรวมระหว่างวัฏภาคมีค่าใกล้เคียงกัน จึงทำให้ปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่ในวัฏภาคต่อเนื่องมีค่าแตกต่างกัน



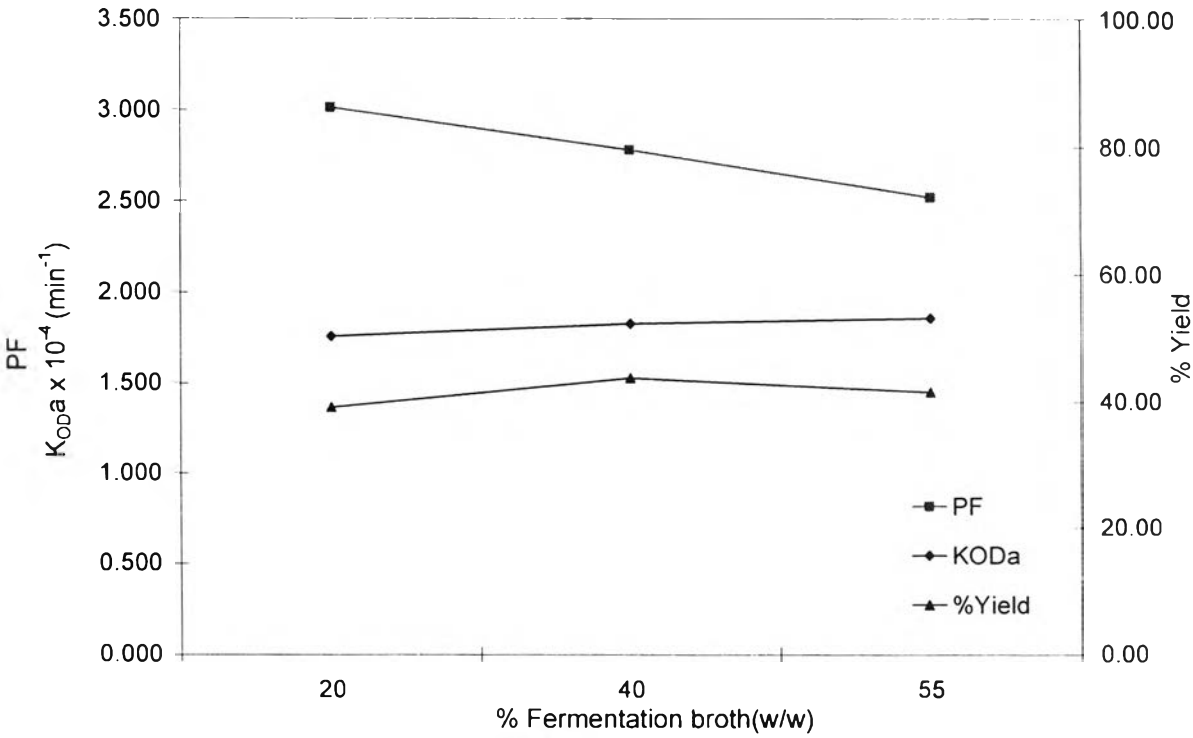
รูปที่ 5.6 แสดงอิทธิพลของความเข้มข้นน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเริ่มต้นที่มีผลต่อโพรไฟล์ความเข้มข้นของโปรตีนในวัฏภาคต่อเนื่องตามความสูงของหอสกัด
ภาวะที่ทำการทดลองคือ อัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัว ที่ 42/12 มิลลิลิตรต่อนาที การปั่นกวนของใบพัด 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส)

เมื่อทำการเปรียบเทียบโพรไฟล์ความเข้มข้นของเอนไซม์และโปรตีนตามความสูงของหอสกัดจากรูปที่ 5.5 และ 5.6 พบว่ามีความแตกต่างกัน เนื่องจากการถ่ายเทมวลสารรวมแตกต่างกัน เมื่อพิจารณาจากสมการที่ 5.2 ที่อัตราการไหลเชิงปริมาตรและการปั่นกวนของใบพัดเท่ากัน จะทำให้ความหนาของชั้นฟิล์ม(δ) มีค่าเท่ากัน แต่เอนไซม์และโปรตีนจะมีค่าสัมประสิทธิ์การแพร่(D) แตกต่างกันเนื่องจากเป็นสารคนละชนิดกัน จึงทำให้สัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลสารผ่านชั้นฟิล์มต่างกันและเมื่อนำมาคำนวณหาสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมตามสมการที่ 5.3 และ 5.4 จะพบว่าเอนไซม์และโปรตีนจะมีค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมแตกต่างกัน จึงทำให้โพรไฟล์ของความเข้มข้นของเอนไซม์และโปรตีนตามความสูงของหอสกัดต่างกัน

I22469628

5.2.2 อิทธิพลของความเข้มข้นของน้ำหมักที่มีผลต่อ จำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ เปอร์เซ็นต์ผลได้ และค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวม

ในการทดลองจะกำหนดให้อัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัวเท่ากับ 42/12 มิลลิลิตรต่อนาที การปั่นกวนของใบพัดเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ซึ่งผลการทดลองแสดงในรูปที่ 5.7



รูปที่ 5.7 แสดงอิทธิพลของความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเริ่มต้นที่มีต่อจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์(PF) เปอร์เซ็นต์ผลได้ (%Yield) และค่าสัมประสิทธิการถ่ายเทมวลรวม ($K_{OD}a$)

ภาวะที่ทำการทดลองคือ อัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัวที่ 42/12 มิลลิลิตรต่อนาที การปั่นกวนของใบพัด 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส)

จากรูปที่ 5.7 แสดงให้เห็นว่าจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์มีค่าลดลงเมื่อน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องมากขึ้น เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ผลต่างความเข้มข้นของเอนไซม์และโปรตีนระหว่างวัฏภาคมีค่าเพิ่มมากขึ้น ทำให้แรงขับในการถ่ายเทมวลระหว่างวัฏภาคมีค่าสูงยิ่งขึ้น แต่เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้นปริมาณโปรตีนที่ถูกถ่ายเทไปยังวัฏภาคกระจายตัวจึงเพิ่มขึ้น เมื่อนำมาคำนวณจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์จึงมีค่าลดลงจาก 3.12 เป็น 2.78และ 2.52 ที่ความเข้มข้นน้ำหมัก 20, 40 และ 55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองนี้ให้ผลสอดคล้อง

กับงานวิจัยของวิไลวรรณ,(2544) ซึ่งพบว่าจำนวนเท่าความบริสุทธิ์จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำหมักเพิ่มขึ้น และจากการทดลองพบว่าผลต่างความเข้มข้นของน้ำหมักแทบไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ผลได้และค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมเลย โดยที่เปอร์เซ็นต์ผลได้จะอยู่ในช่วง 39.08-41.55 เปอร์เซ็นต์ และค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมจะอยู่ในช่วง 1.30×10^{-4}-1.33×10^{-4} นาที$^{-1}$

ทั้งนี้เป็นที่น่าสังเกตว่าค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้จากการสกัดมีค่าค่อนข้างต่ำทั้งๆที่จากการทดลองพบว่าเอนไซม์เกือบทั้งหมดได้ถูกสกัดออกจากวัฏภาคต่อเนื่องแล้ว(ดูรูปที่ 5.5) โดยสาเหตุอาจเนื่องมาจากการเกิดวัฏภาคที่สามขึ้นใต้ settling zone ของวัฏภาคกระจายตัว เป็นไปได้ว่าเอนไซม์ที่ถูกสกัดส่วนหนึ่งจะกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคนี้และสะสมอยู่ไม่ได้ออกมากับสายขาออกทั้งสองสาย อีกส่วนหนึ่งจะกระจายตัวอยู่ใน settling zone ในการทดลองนี้ การเก็บตัวอย่างมาพิจารณาเปอร์เซ็นต์ผลได้ จะเก็บบริเวณวัฏภาคกระจายตัวขาออก(settling zone) และวัฏภาคต่อเนื่องขาออกเท่านั้นไม่ได้เก็บตัวอย่างบริเวณวัฏภาคที่สามจึงทำให้เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณของเอนไซม์รวมระหว่างขาเข้าและขาออกจากหอสกัดพบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างชัดเจนดังแสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 แสดงปริมาณของเอนไซม์รวมระหว่างขาเข้าและขาออกจากหอสกัดที่ความเข้มข้นของน้ำหมักเริ่มต้นต่างๆ

% fermentation broth (w/w)	Total enzyme in (unit/min)	Total enzyme out* (unit/min)
20	10.640	4.368
40	14.700	6.761
55	28.595	12.174

* พิจารณาจากขาออกของทั้งสองวัฏภาค

จากตารางที่ 5.1 แสดงให้เห็นว่าปริมาณเอนไซม์รวมขาออกของทั้งสองวัฏภาค มีค่าน้อยกว่าขาเข้าในทุกๆความเข้มข้นของน้ำหมัก ซึ่งเป็นผลมาจากเหตุผลที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น จึงทำให้เปอร์เซ็นต์ผลได้มีค่าน้อย ส่วนค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมของเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสระหว่างวัฏภาคจะอยู่ในช่วง 1.30×10^{-4}-1.33×10^{-4} นาที$^{-1}$ ซึ่งผลการทดลองนี้จะสอดคล้องกับงานผลการทดลองของวิไลวรรณ(2544) โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเพิ่มขึ้นค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมจะอยู่ในช่วงใกล้เคียงกันประมาณ 1.5×10^{-4}-1.6×10^{-4}นาที$^{-1}$ ที่อัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง/

วัฏภาคภาคกระจายตัวที่ 11.8/3.4 มิลลิลิตรต่อนาที โดยมีค่า superficial velocity ของวัฏภาคต่อเนื่องและวัฏภาคกระจายตัวเท่ากับ 0.71 และ0.2 เซนติเมตรต่อนาที ที่ความเร็วในการปั่นกวนของใบพัด 100 รอบต่อนาทีตามลำดับ ส่วนงานวิจัยนี้จะมีค่าsuperficial velocity ของวัฏภาคต่อเนื่องและวัฏภาคกระจายตัวเท่ากับ 0.66 และ 0.18 เซนติเมตรต่อนาที ถือได้ว่าใกล้เคียงกัน จึงทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลสารของทั้งสองงานวิจัยมีค่าใกล้เคียงกัน

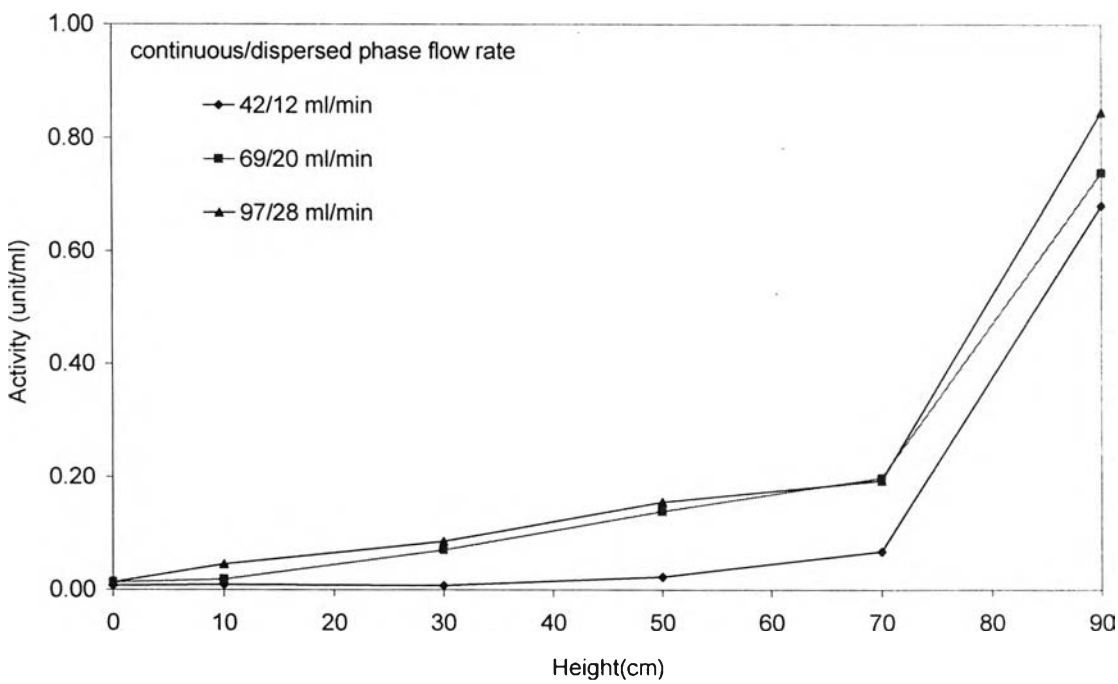
5.3 อิทธิพลของอัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัวที่สัดส่วนของทั้งสองวัฏภาคคงที่ ที่ 3:1

ในการทดลองนี้ได้ทำการปรับเปลี่ยนค่าอัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัวที่สัดส่วนของปริมาตรวัฏภาคต่อเนื่องต่อวัฏภาคกระจายตัวคงที่ ที่ 3:1 เท่ากับ 42/12, 69/20 และ 97/28 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ เพื่อหาค่าอัตราการไหลเชิงปริมาตรสูงสุดที่หอสกัดสามารถดำเนินการได้ โดยที่ค่าเริ่มต้นได้จากงานวิจัยของ ธนพงษ์และคณะ,(2545) ซึ่งค่าอัตราการไหลเชิงปริมาตรค่านี้จะมี superficial velocity เท่ากับงานวิจัยของวิไลวรรณ,(2544) ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัดขนาดเล็ก(0.715 ลิตร) แต่อย่างไรก็ตามในการสกัดเราต้องเตรียมสายป้อน ที่ประกอบด้วยวัฏภาคต่อเนื่องและเอนไซม์เป้าหมายเป็นการล่วงหน้าเพื่อพร้อมสำหรับการป้อนเข้าสู่หอสกัดอย่างต่อเนื่อง และงานวิจัยนี้จำเป็นต้องดำเนินการสกัดเอนไซม์ให้ได้ภายในระยะเวลา 1 วัน(เมื่อถังป้อนอยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิห้อง) เพื่อป้องกันการสูญเสียค่ากิจกรรมเอนไซม์ในถังป้อนมากเกินไป ซึ่งที่อัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัวที่ 42/12, 69/20 และ 97/28 มิลลิลิตรต่อนาที สามารถดำเนินการสกัดโดยใช้ปริมาณน้ำหมักเท่ากับ 33.26, 54.64 และ 76.82 ลิตร ในระยะเวลาสกัด 1 วัน ที่ความเข้มข้นของน้ำหมักเริ่มต้นในวัฏภาคต่อเนื่องเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และพบว่าเมื่อทำการทดลองปรับอัตราการไหลของทั้งสองวัฏภาคพบว่าจะมีวัฏภาคกระจายตัวผสมออกมากับวัฏภาคต่อเนื่องขาออกในทุกๆอัตราการไหลโดยคิดเป็นอัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวที่ผสมออกมากับวัฏภาคต่อเนื่องขาออกได้ 2.1, 3.4และ 4.8 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัวเท่ากับ 42/12, 69/20 และ 97/28 มิลลิลิตรต่อนาทีตามลำดับ หรือเมื่อคิดเทียบกับวัฏภาคกระจายตัวขาออกจะคิดเป็น 17.5, 17.0 และ 17.14 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตราการไหลของวัฏภาคกระจายตัวขาออกที่ 12, 20และ 28 มิลลิลิตรต่อนาทีตามลำดับ ดังนั้นในการคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมและเปอร์เซ็นต์ผลได้ จึงจำเป็นต้องนำปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวที่ผสมมากับวัฏภาคต่อเนื่องขาออกมาหักลบกับวัฏภาคกระจายตัวขาเข้า จึงจะได้ค่าค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมและเปอร์เซ็นต์ผลได้ที่แท้จริง และสาเหตุที่มีวัฏภาคกระจายตัว

ผสมออกมากับวัฏภาคต่อเนื่องขาออกได้ เนื่องมาจากตำแหน่งของวัฏภาคต่อเนื่องขาออกและวัฏภาคกระจายตัวขาเข้าอยู่ที่ระดับความสูงเดียวกันแต่อยู่คนละด้านของหอสกัดเท่านั้น

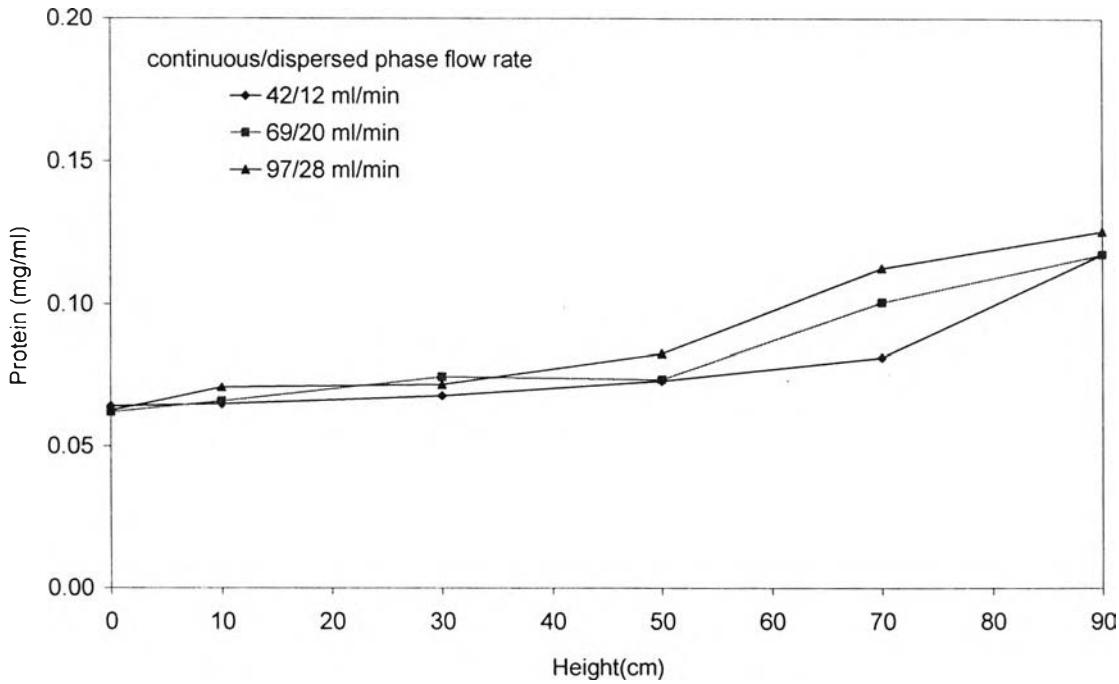
5.3.1 อิทธิพลของอัตราการไหลเชิงปริมาตรต่อโพรไฟล์ความเข้มข้นของเอนไซม์ในวัฏภาคต่อเนื่องตามความสูงของหอสกัด

จากการทดลองทำการเลือกความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเริ่มต้นที่ 55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักและเมื่อทำการปรับเปลี่ยนอัตราการไหลของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัว ที่ 42/12, 69/20และ 97/28 มิลลิลิตรต่อนาที จะได้ผลการทดลองดังรูปที่ 5.8 จากการทดลองพบว่าที่ระดับความสูง 90 เซนติเมตร (อ้างอิงตำแหน่งขาออกของวัฏภาคต่อเนื่องที่ความสูง 0 เซนติเมตร) เป็นระดับที่ป้อนวัฏภาคต่อเนื่องเข้าสู่หอสกัด ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่แสดงในรูปที่ 5.8 จะเป็นของวัฏภาคต่อเนื่องขาเข้า แต่มีค่าไม่เท่ากันเนื่องจากเป็นวัฏภาคต่อเนื่องที่เตรียมขึ้นจากคนละการทดลองและเป็นผลมาจากความเข้มข้นของเอนไซม์ในน้ำหมักเริ่มต้นที่ไม่เท่ากัน จึงเกิดความคลาดเคลื่อนขึ้นโดยมีค่าแตกต่างกันประมาณ 12.67-19.40 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาที่ตำแหน่ง 90 ถึง 70 เซนติเมตร ค่ากิจกรรมลดลงเนื่องมาจากอิทธิพลของ Entrance effect



รูปที่ 5.8 แสดงอิทธิพลของอัตราการไหลเชิงปริมาตรต่อโพรไฟล์ความเข้มข้นของเอนไซม์ในวัฏภาคต่อเนื่องตามความสูงของหอสกัด
ภาวะที่ทำการทดลองคือ ความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก การปั่นกวนของใบพัด 100 รอบต่อนาที

และที่ระดับต่ำกว่า 70 เซนติเมตร ความชันของกราฟจะต่างกัน เนื่องจากในระดับความสูงเดียวกัน ที่อัตราการไหล 42 /12 มิลลิลิตรต่อนาที มีเวลาที่ใช้ในการถ่ายเทมวลสารมากกว่าที่อัตราการไหล 69 /20และ 97/28 มิลลิลิตรต่อนาที จึงมีการถ่ายเทมวลสารมากกว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ในวัฏภาคต่อเนื่องขาออกของอัตราการไหลนี้จึงน้อยกว่าเมื่อเทียบกับอัตราการไหลอื่นๆ จึงทำให้ความชันของกราฟน้อยที่สุด ส่วนที่อัตราการไหล 69/20และ 97/28 มิลลิลิตรต่อนาที ค่ากิจกรรมเอนไซม์ในวัฏภาคต่อเนื่องที่เหลืออยู่แตกต่างกันน้อยมาก ความชันที่ได้จากกราฟไม่ค่อยแตกต่างกันมากนัก และเมื่อนำกราฟจากรูปที่ 5.9 มาเปรียบเทียบกับรูปที่ 5.9 ซึ่งเป็นรูปที่แสดงอิทธิพลของอัตราการไหลเชิงปริมาตรต่อโพรไฟล์ความเข้มข้นของโปรตีนในวัฏภาคต่อเนื่องตามความสูงของหอสกัดจะพบว่าโพรไฟล์ความเข้มข้นของเอนไซม์และโปรตีนจะแตกต่างกัน ดังที่ได้อธิบายไว้ในหัวข้อที่ 5.2.2

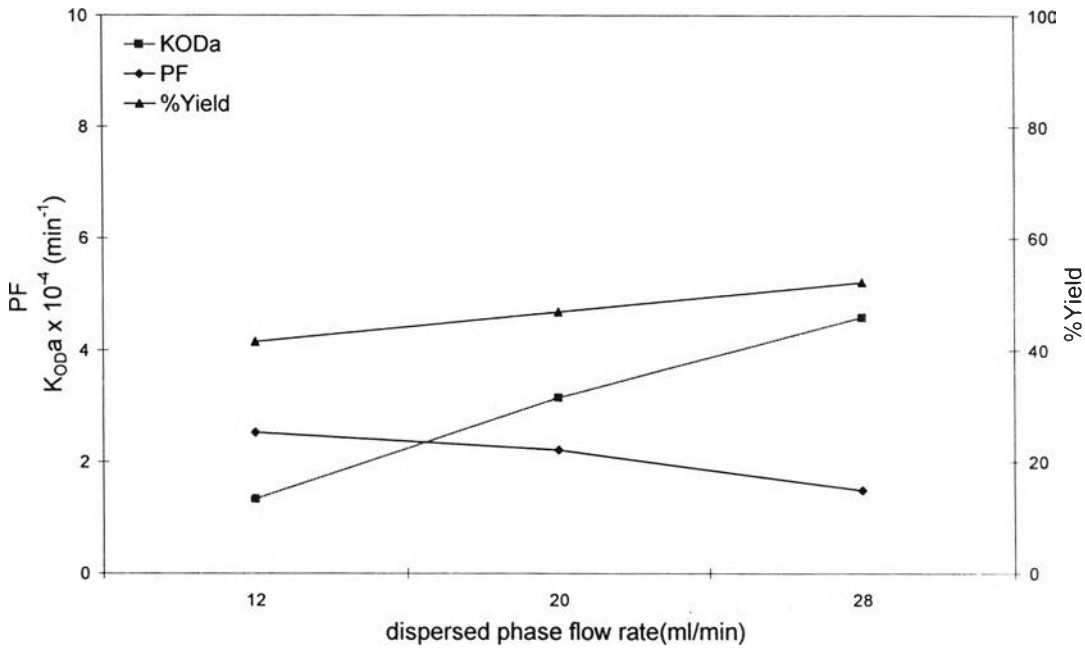


รูปที่ 5.9 แสดงอิทธิพลของอัตราการไหลเชิงปริมาตรต่อโพรไฟล์ความเข้มข้นของโปรตีนในวัฏภาคต่อเนื่องตามความสูงของหอสกัด

<u>ภาวะที่ทำการทดลองคือ</u> ความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก การปั่นกวนของใบพัด 100 รอบต่อนาที

5.3.2 อิทธิพลของอัตราการไหลเชิงปริมาตรต่อจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ เปอร์เซ็นต์ผลได้ และค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมของเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสระหว่างวัฏภาค

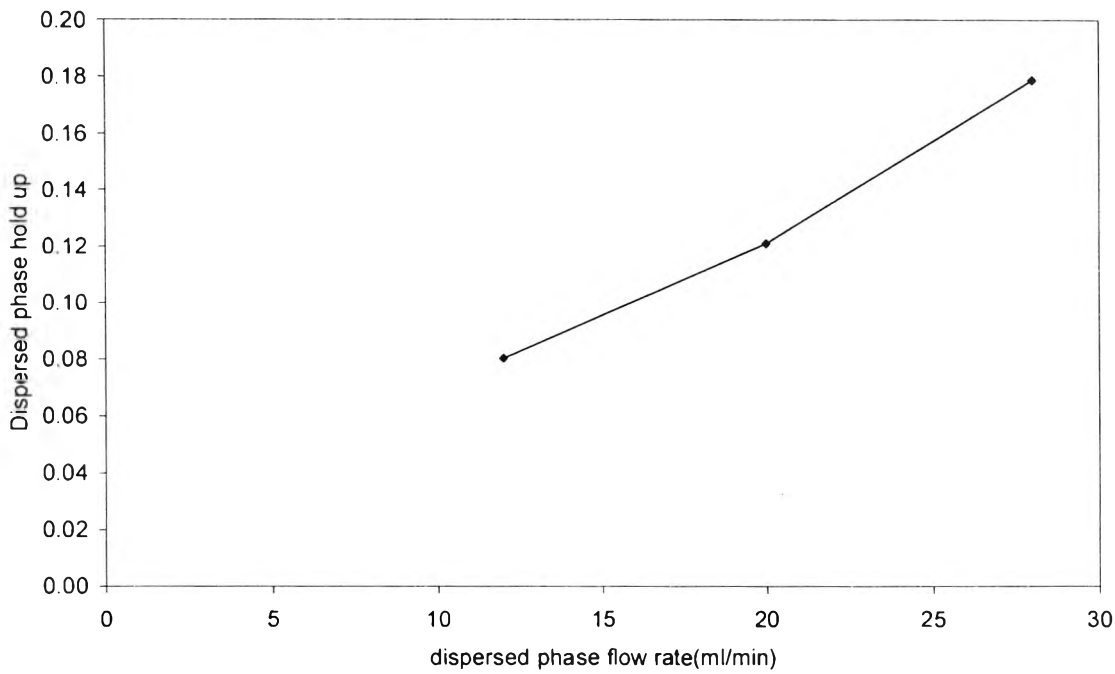
การทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องที่ 55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และเมื่อทำการปรับเปลี่ยนอัตราการไหลของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัวที่ 42/12, 69/20และ 97/2 มิลลิลิตรต่อนาที จะได้ผลการทดลองดังรูปที่ 5.10



รูปที่ 5.10 แสดงอิทธิพลของอัตราการไหลเชิงปริมาตรต่อจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์(PF) เปอร์เซ็นต์ผลได้ (%Yield) และค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวม ($K_{OD}a$)
ภาวะที่ทำการทดลองคือ ความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก การปั่นกวนของใบพัด 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง(30±2 องศาเซลเซียส)

จากรูปที่ 5.10 พบว่าเปอร์เซ็นต์ผลได้และค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมมีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราการไหลเชิงปริมาตรเนื่องจากเมื่ออัตราการไหลเพิ่มมากขึ้น ขนาดของหยดของวัฏภาคกระจายตัวที่ออกจาก sparger มีขนาดลดลงส่งผลให้มีพื้นที่ในการถ่ายเทมวลสารมากขึ้นและ hold up ของวัฏภาคกระจายตัวมีค่ามากขึ้นดังแสดงในรูปที่ 5.11 ดังนั้นเอนไซม์และโปรตีนจึงสามารถถ่ายเทไปยังวัฏภาคกระจายตัวได้ในอัตราที่สูงขึ้น โดยค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้จะเพิ่มขึ้นจาก 41.55 เป็น 52.14 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มอัตราการไหลของวัฏภาคกระจายตัวจาก 12 เป็น 28 มิลลิลิตรต่อนาที แต่ค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ที่ได้จากการทดลองมีค่าน้อยเนื่องจากเหตุผลเดียวกันกับที่ได้อธิบายมาแล้วในหัวข้อที่ 5.2.2 ดังนั้นทำ

สมดุลเอนไซม์พบว่าผลรวมของความเข้มข้นของเอนไซม์ระหว่างขาเข้าและขาออกจากหอสกัดมีค่าไม่เท่ากัน ดังแสดงในตารางที่ 5.2 แต่ค่าประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมของเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสระหว่างวัฏภาคมีค่าเพิ่มจาก 1.33×10^{-4} เป็น 4.52×10^{-4} นาที$^{-1}$ เมื่อเพิ่มอัตราการไหลของวัฏภาคกระจายตัวจาก 12 เป็น 28 มิลลิลิตรต่อนาทีตามลำดับ และเมื่ออัตราการไหลเชิงปริมาตรของทั้งสองวัฏภาคเพิ่มขึ้นโปรตีนรวมที่อยู่ภายในหอสกัดจะถูกถ่ายเทไปยังวัฏภาคกระจายตัวได้ในอัตราที่เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน จึงทำให้จำนวนเท่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์จึงมีค่าลดลงจาก 2.52 เป็น 1.48 เมื่ออัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวเพิ่มขึ้นจาก 12 เป็น 28 มิลลิลิตรต่อนาที



รูปที่ 5.11 แสดงค่า Dispersed phase hold up ที่อัตราการไหลของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ
ภาวะที่ทำการทดลองคือ ความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเริ่มต้น 55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก การปั่นกวนของใบพัด 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง(30±2 องศาเซลเซียส)

ตารางที่5.2 แสดงปริมาณของเอนไซม์ขาเข้าและขาออกจากหอสกัดที่อัตราไหลเชิง ปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ

Dispersed phase flow rate in(ml/min)	Total enzyme in (unit/min)	Total enzyme out*(unit/min)
12	28.602	12.174
20	50.922	24.631
28	81.965	43.611

* พิจารณาจากขาออกทั้งสองวัฏภาค

5.4 อิทธิพลของการปั่นกวนของใบพัด

ในการทดลองนี้จะเลือกอัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัวที่ 97/28 มิลลิลิตรต่อนาที ในการสกัดเนื่องจากเป็นอัตราการไหลที่ให้ค่าการถ่ายเทมวลรวมและเปอร์เซ็นต์ผลได้มากที่สุด แต่จะมีค่าจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ต่ำที่สุด(แต่ยังมีค่ามากกว่า 1) จากนั้นจะทำการปรับการปั่นกวนในช่วง 0-200 รอบต่อนาที เนื่องจากที่ 200 รอบต่อนาทีเป็นความเร็วรอบที่สามารถดำเนินการสกัดได้โดยที่หอสกัดไม่สั่น และในเริ่มต้นได้ทำการทดลองที่ 100 รอบนาที ซึ่งเป็นการปั่นกวนของใบพัดที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัดโอลชูรัชตันของวิไลวรรณ และจากงานวิจัยของ Coimbra และคณะ, (1977) งานวิจัยของ Sarubbo และคณะ, (2003) งานวิจัยของ Giraldo-Zuniga และคณะ, (2004) ทำการศึกษา Axial mixing ในหอสกัดชนิด Graesser liquid-liquid จากสองงานวิจัยแรกได้ทำการศึกษาถึงอิทธิพลของความเร็วรอบของใบพัดที่มีผลต่อค่า hold up ของวัฏภาคกระจายตัว โดยเมื่อความเร็วรอบของใบพัดเพิ่มขึ้น hold up ของวัฏภาคกระจายตัวจะเพิ่มขึ้น เนื่องจากสามารถลดขนาดของหยดของวัฏภาคกระจายตัวจึงทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมและเปอร์เซ็นต์ผลได้มีค่ามากขึ้น งานวิจัยนี้จึงไม่ได้ศึกษาที่การปั่นกวนต่ำกว่า 100 รอบต่อนาทีและในการทดลองเพื่อหาค่าจุดท่วม(Flooding point) ของหอสกัดพบว่า ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับ Flooding point คือ ความเร็วรอบในการปั่นกวนซึ่งจะส่งผลต่ออัตราการไหลสูงสุดที่หอสกัดนี้จะสามารถดำเนินการได้ และ flooding point สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 5.5 ดังนี้(Thornton, 1992)

$$U_{cf} = \overline{u_0}\left(1 - x_f\right)^2\left(1 - 2x_f\right) \qquad 5.5$$

เมื่อ x_f แทน hold up ที่ flooding point สามารถหาได้จากสมการที่ 5.6 (Thornton,1992)

$$x_f = \frac{\left[1 + 8\left(U_c / U_d\right)\right]^{1/2} - 3}{4\left(U_c / U_d\right) - 1} \qquad 5.6$$

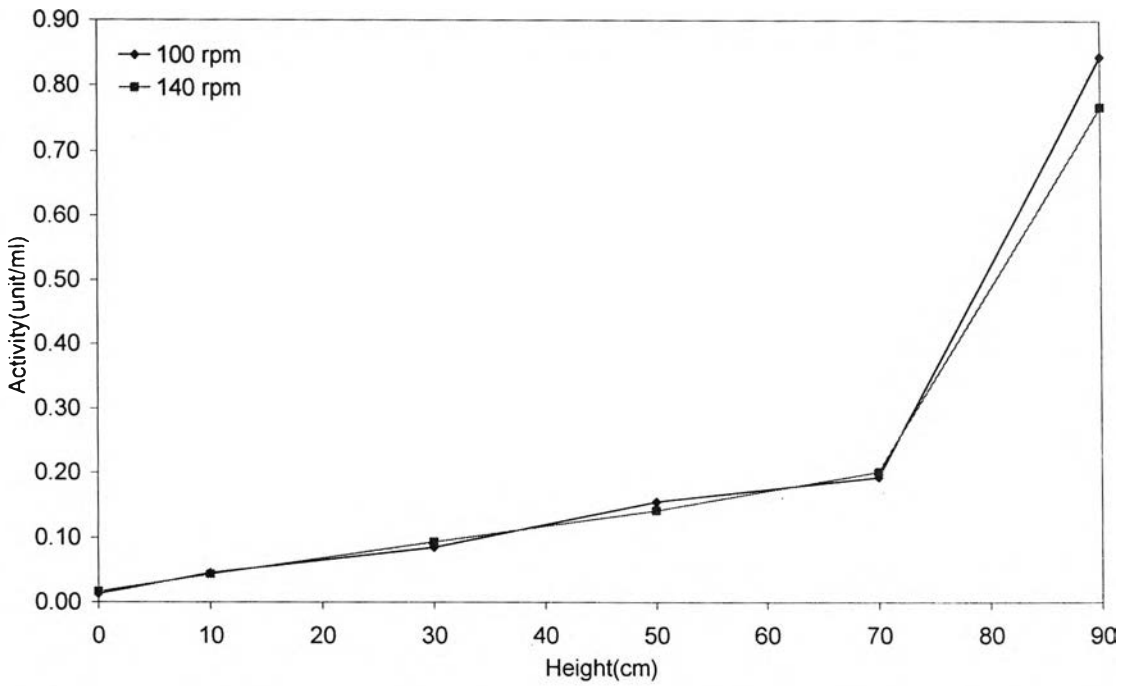
ส่วนค่า U_c และ U_d คือ Superficial velocity ของวัฏภาคต่อเนื่องและวัฏภาคกระจายตัวตามลำดับ สามารถหาได้จากสมการที่ 5.7

$$U_c = \frac{F_c}{A}, \quad U_d = \frac{F_d}{A} \qquad 5.7$$

ค่า $\overline{U_0}$ สามารถหาได้จากการทดลองโดย เติมวัฏภาคต่อเนื่องให้เต็มหอสกัด จากนั้นปล่อยให้หยดของวัฏภาคกระจายตัว 1 หยดลอยขึ้นไปในหอสกัดโดยที่มีการปั่นกวนของใบพัด จับเวลาที่หยดของวัฏภาคกระจายตัวออกจากรูของspager จนถึงยอดหอสกัด เพื่อนำมาคำนวณหาค่า $\overline{U_0}$ โดยสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 5.8

5.4.1 อิทธิพลของการปั่นกวนของใบพัดต่อโพรไฟล์ความเข้มข้นของเอนไซม์ในวัฏภาคต่อเนื่องตามความสูงของหอสกัด

จากการทดลองหา flooding point พบว่าที่การปั่นกวนของใบพัด 180 รอบต่อนาที ไม่เหมาะที่จะนำมาดำเนินการกับหอสกัดนี้ เนื่องจากที่การปั่นกวนของใบพัด 180 รอบต่อนาที อัตราการไหลของวัฏภาคต่อเนื่องที่สามารถดำเนินการสกัดได้มีค่าต่ำกว่าที่อัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่องที่กำลังพิจารณาอยู่(97 มิลลิลิตรต่อนาที) จึงไม่นำความเร็วรอบนี้มาพิจารณา ในการทดลองนี้จึงปรับความเร็วรอบของใบพัดที่ 100 และ 140 รอบต่อนาที จะได้ผลการทดลองดังรูปที่ 5.12

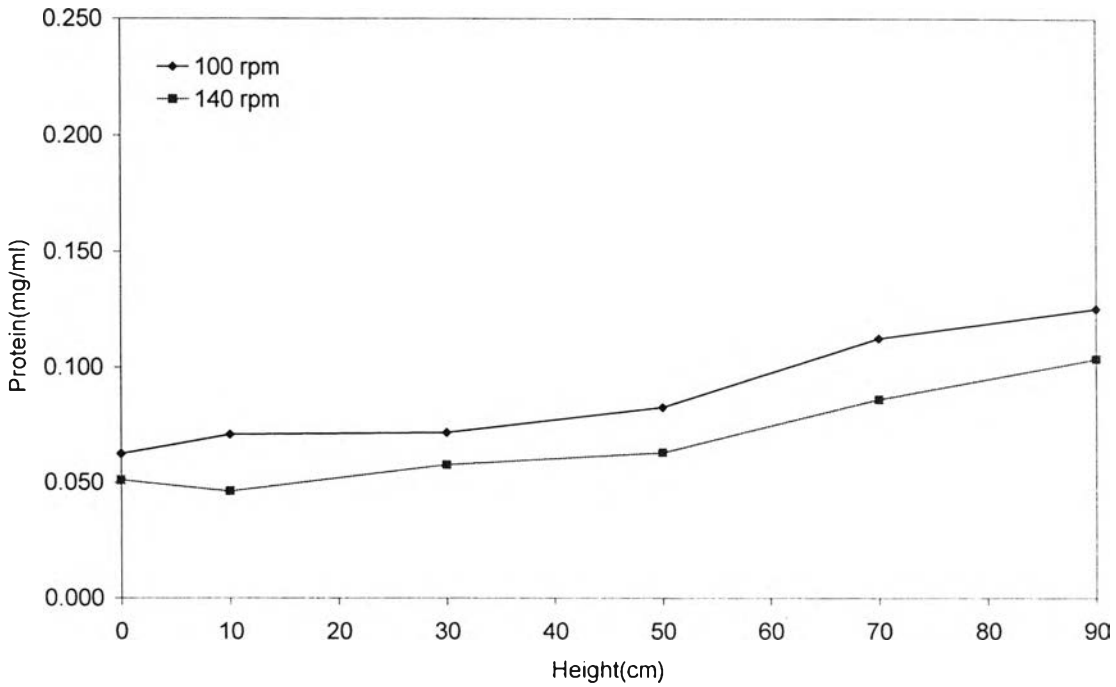


รูปที่ 5.12 แสดงอิทธิพลของการปั่นกวนของใบพัดต่อโพรไฟล์ความเข้มข้นของเอนไซม์ในวัฏภาคต่อเนื่องตามความสูงของหอสกัด

ภาวะที่ทำการทดลองคือ ความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก อัตราการไหลของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัวที่ 97/28 มิลลิลิตรต่อนาทีอุณหภูมิห้อง(30±2 องศาเซลเซียส)

จากการทดลองพบว่าที่ระดับความสูง 90 เซนติเมตร เป็นระดับที่ป้อนวัฏภาคต่อเนื่องเข้าสู่หอสกัด ค่ากิจกรรมที่วัดได้จึงเป็นค่ากิจกรรมของวัฏภาคต่อเนื่องขาเข้าซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันและที่ระดับความสูงในช่วง 70-90 เซนติเมตร ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เปลี่ยน แปลงไปเป็นผลมาจาก Entrance effect และที่ระดับความสูง 30 ถึง 70 เซนติเมตร พบว่าความชันของกราฟทั้งที่ 100 และ 140 รอบต่อนาที ไม่แตกต่างกันมากนัก เนื่องจากเมื่อปรับความเร็วรอบในการปั่นกวนจาก 100 เป็น 140 รอบต่อนาที เวลาที่วัฏภาค

กระจายตัวอยู่ในหอสกัดจะเพิ่มขึ้นจากเดิมเล็กน้อย จึงทำให้การถ่ายเทมวลสารไม่แตกต่างจากเดิมมาก โพรไฟล์ความเข้มข้นของเอนไซม์จึงใกล้เคียงกัน และรูปที่ 5.13 จะแสดงโพรไฟล์ความเข้มข้นของโปรตีนตามความสูงของหอสกัดจึงใกล้เคียงกัน แต่จากกราฟจะเห็นได้ความชันของกราฟมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่ในวัฏภาคต่อเนื่องมีค่าไม่เท่ากัน ซึ่งเกิดจากความคลาดเคลื่อนในการเตรียมสารของแต่ละการทดลอง



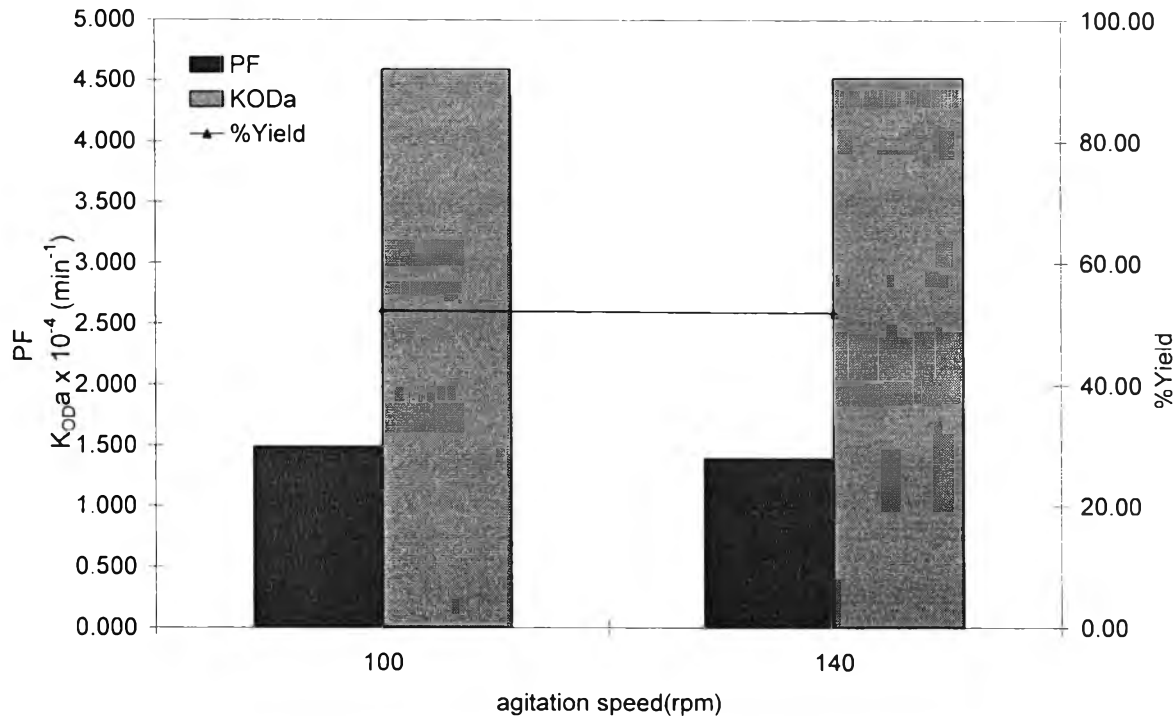
รูปที่ 5.13 แสดงอิทธิพลของการปั่นกวนของใบพัดต่อโพรไฟล์ความเข้มข้นโปรตีนในวัฏภาคต่อเนื่องตามความสูงของหอสกัด

ภาวะที่ทำการทดลองคือ ความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก อัตราการไหลของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัว 97/28 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิห้อง(30±2 องศาเซลเซียส)

5.4.2 อิทธิพลของการปั่นกวนของใบพัดที่มีผลต่อจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ เปอร์เซ็นต์ผลได้ และค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวม

ในการทดลองนี้จะปรับความเร็วของใบพัดที่ 100 และ 140 รอบต่อนาทีจากการทดลองให้ผลดังรูปที่ 5.14 จากรูปที่ 5.14 แสดงให้เห็นว่าความเร็วของใบพัด(เปรียบเทียบที่ 100 และ 140 รอบต่อนาที) มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวม จำนวนเท่าความบริสุทธิ์ เปอร์เซ็นต์ผลได้น้อยมาก โดยที่ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวม จะเปลี่ยนแปลงจาก 4.59×10^{-4} เป็น 4.52×10^{-4} นาที$^{-1}$ จำนวนเท่าความบริสุทธิ์ลดลงจาก 1.43 เป็น 1.39 และเปอร์เซ็นต์ผลได้มีค่าใกล้เคียงกันเท่ากับ 52.14 เป็น 51.78 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเร็วรอบ 100 และ 140 รอบต่อนาทีตามลำดับ จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการเพิ่ม

ความเร็วมากขึ้น 40 รอบต่อนาทียังไม่เพียงพอที่จะส่งผลในการเปลี่ยนแปลงค่า hold up ของวัฏภาคกระจายตัวและความหนาของชั้นฟิล์มมากนัก ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมจึงไม่แตกต่างกันเช่นเดียวกันกับจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์และเปอร์เซ็นต์ผลได้



รูปที่ 5.14 แสดงอิทธิพลของการปั่นกวนของใบพัดต่อจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์(PF) เปอร์เซ็นต์ผลได้ (%Yield) และค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวม ($K_{OD}a$)
ภาวะที่ทำการทดลองคือ ความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก อัตราการไหลของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัว 97/28 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิห้อง(30±2 องศาเซลเซียส)

5.5 การเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ใกล้เคียงกัน

ตั้งแต่อดีตที่ผ่านมา ได้มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัดเอนไซม์และโปรตีนในหอสกัดโดยจะมีเอนไซม์และโปรตีนที่ถูกสกัด จากหอสกัดแต่ละชนิดแตกต่างกันออกไปและงานวิจัยดังกล่าวจะศึกษาหลายๆปัจจัยที่ส่งผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมของเอนไซม์ระหว่างวัฏภาคเปอร์เซ็นต์ผลได้และ จำนวนเท่าความบริสุทธิ์ที่ได้จากหอสกัด ดังแสดงในตารางที่ 5.4 ดังนี้

ตารางที่ 5.4 แสดงงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัดเอนไซม์และโปรตีนในหอสกัด

Name/ Year	Enzyme/ Protein	System	Type	$K_{OD}a$ (min^{-1})	PF	%Yield
Vahid/ 2005	lipoxygenase	Sodium sulfate/PEG/ buffer	Spray	$0\text{-}9\times10^{-4}$	-	95-98
Srinivas/ 2002	horseradish peroxidase	PEG/phosphate/ water	Spray	$0.17\text{-}0.67\times10^{-4}$	-	-
Surubbo/ 2003	BSA	PEG/ polysaccharide/ cashew-nut-tree	Perforate rotating disc	0.15-0.25	-	-
Pawar/ 1997	amyloglucosidase, β-galactosidase	sodium sulphate/PEG/ buffer	Spray	$0\text{-}0.13\times10^{-4}$	-	-
Igarashi/ 2004	xylanase	PEG4000/ potassium phosphate/water	Pack	0-0.32	-	80-90
วิไวรรณ/ 2544	alkaline protease	PEG 1000/phosphate/ water	Oldshue rushton	$1.5\text{-}1.6\times10^{-4}$	6.0	73.70
งานวิจัยนี้/2006	alkaline protease	PEG 1000/phosphate/ water	Oldshue rushton	$1.33\text{-}4.59\times10^{-4}$	1.39 -3.01	39.08-52.14

จากตารางที่ 5.4 แสดงให้เห็นว่าค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวม เปอร์เซ็นต์ผลได้ และจำนวนเท่าความบริสุทธิ์ จะมีค่าแตกต่างกันออกไป นอกจากอิทธิพลต่างๆที่งานวิจัยนี้ได้ศึกษาแล้ว ยังมีอิทธิพลของปัจจัยอื่นๆ ที่จะส่งผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวม เปอร์เซ็นต์ผลได้ และจำนวนเท่าความบริสุทธิ์ เช่น ลักษณะของหอสกัด ชนิดของเอนไซม์หรือโปรตีน และสารที่ใช้เป็นองค์ประกอบของระบบ ส่วนงานวิจัยนี้จะมีค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมใกล้เคียงกับงานวิจัยของวิไลวรรณ(2544) เนื่องจากมีค่า Superficial velocity ใกล้เคียงกัน ดังที่กล่าวไว้ในหัวข้อที่ 5.2.2 ส่วนค่าจำนวนเท่าความบริสุทธิ์และเปอร์เซ็นต์ผลได้น้อยกว่าเนื่องจากเกิดวัฏภาคที่สามขึ้นบริเวณใต้ settling zone ดังเหตุผลที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อที่ 5.2.2

5.6 การหาสาเหตุของการสูญเสียค่ากิจกรรมเอนไซม์ในกระบวนการสกัด

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์ผลได้มีค่าต่ำ(52.14 - 51.78 เปอร์เซ็นต์) ดังนั้น ผู้ทำวิจัยจึงได้ทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อหาสาเหตุของการสูญเสียค่ากิจกรรมเอนไซม์ในกระบวนการสกัด โดยแบ่งหัวข้อของการทดลองดังนี้

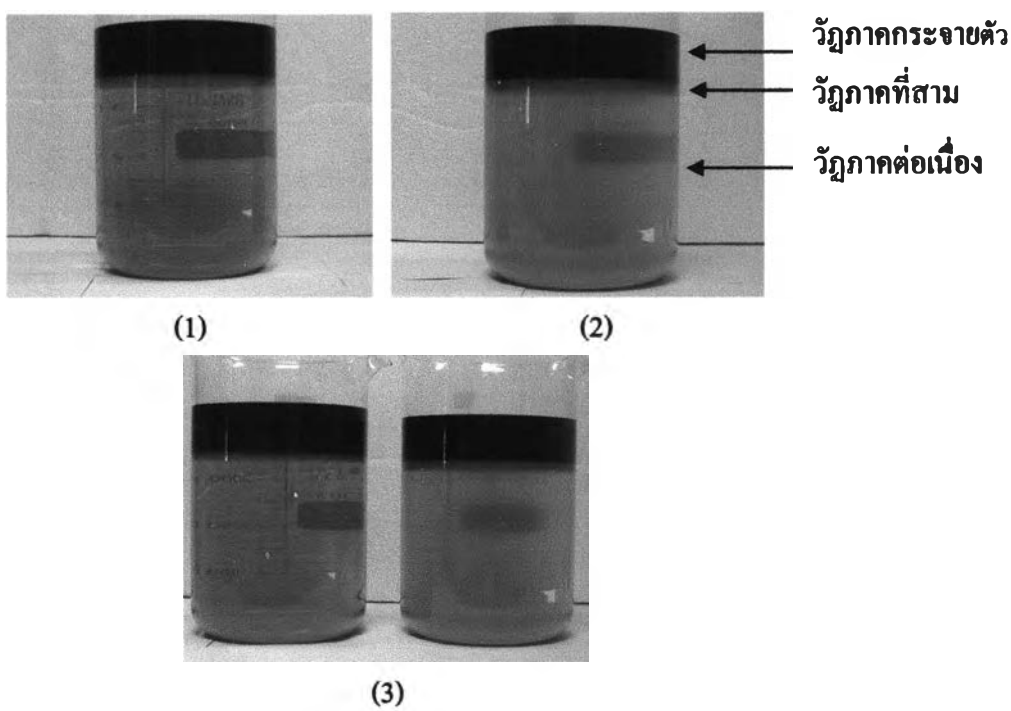
5.6.1 อิทธิพลของสารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบของแต่ละวัฏภาค

จากหัวข้อที่ 5.2.2 ได้กล่าวว่ามีการเกิดวัฏภาคที่สามขึ้น ใต้บริเวณ settling zone ของวัฏภาคกระจายตัว โดยที่งานวิจัยนี้สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบของแต่ละวัฏภาคคุณภาพระดับการค้าแตกต่างจากงานวิจัยของวิไลวรรณ(2544) ซึ่งใช้สารเคมีคุณภาพระดับห้องปฏิบัติการและไม่มีรายงานว่าพบการเกิดวัฏภาคที่สามขึ้น ดังนั้นจึงตั้งสมมุติฐานว่าวัฏภาคที่สามเกิดขึ้นเนื่องจากสารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบ ผู้ทำวิจัยจึงได้ทำการศึกษาการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอส ที่ความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก สัดส่วนของทั้งสองวัฏภาคคงเดิม แต่จะดำเนินการทดลองในบีกเกอร์ที่มีปริมาตรรวมของทั้งสองวัฏภาคประมาณ 4 ลิตร เพื่อเปรียบเทียบการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสที่ใช้สารเคมีคุณภาพระดับการค้ากับคุณภาพระดับห้องปฏิบัติการเป็นองค์ประกอบของแต่ละวัฏภาค โดยผลการทดลองจะแสดงในรูปที่ 5.15 จากรูปที่ 5.15 แสดงให้เห็นว่าทั้ง 2 กรณี จะปรากฏวัฏภาคที่สามขึ้นใต้บริเวณ settling zone ของวัฏภาคกระจายตัวเหมือนกัน และลักษณะของวัฏภาคที่สามที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะเดียวกันคือ แยกชั้นออกมาจากวัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่องอย่างชัดเจนและมีสีขาวขุ่น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการปรากฏวัฏภาคที่สามจะเกิดขึ้นทั้ง 2 กรณี คือการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสที่ใช้สารเคมีเป็นองค์ประกอบของแต่ละวัฏภาคคุณภาพระดับการค้าและคุณภาพระดับห้องปฏิบัติการ

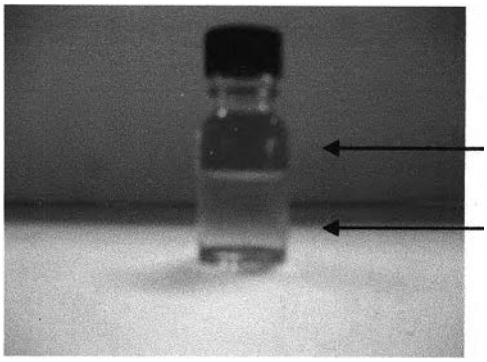
5.6.2 ตรวจสอบการสะสมของเอนไซม์ในวัฏภาคที่สาม(ใต้ settling zone ของวัฏภาคกระจายตัว)

เมื่อเกิดวัฏภาคที่สามใต้บริเวณ settling zone ของวัฏภาคกระจายตัว เอนไซม์สามารถกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคนี้ได้ ผู้ทำวิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่าภายในวัฏภาคที่สามจะมีการสะสมของเอนไซม์อยู่ ดังนั้นเมื่อดำเนินการสกัด เอนไซม์จึงสะสมอยู่ภายในวัฏภาคที่สามและไม่ถ่ายเทมายังวัฏภาคกระจายตัวได้หมด จึงเกิดการสูญเสียค่ากิจกรรมเอนไซม์ขึ้น จากสมมติฐานดังกล่าวจึงทำการทดลองโดยทำการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัดโอลชูรัชตันขนาด 5.7 ลิตร ที่ความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่อง 55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก อัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัวที่ 97/28 มิลลิลิตรต่อนาที การปั่นกวนของใบพัดที่ 100 รอบต่อนาที เพื่อตรวจสอบการสะสมของเอนไซม์ในวัฏภาคที่สาม ที่ส่งผลให้ได้เปอร์เซ็นต์ผลได้ต่ำ เมื่อดำเนินการสกัดและเก็บ

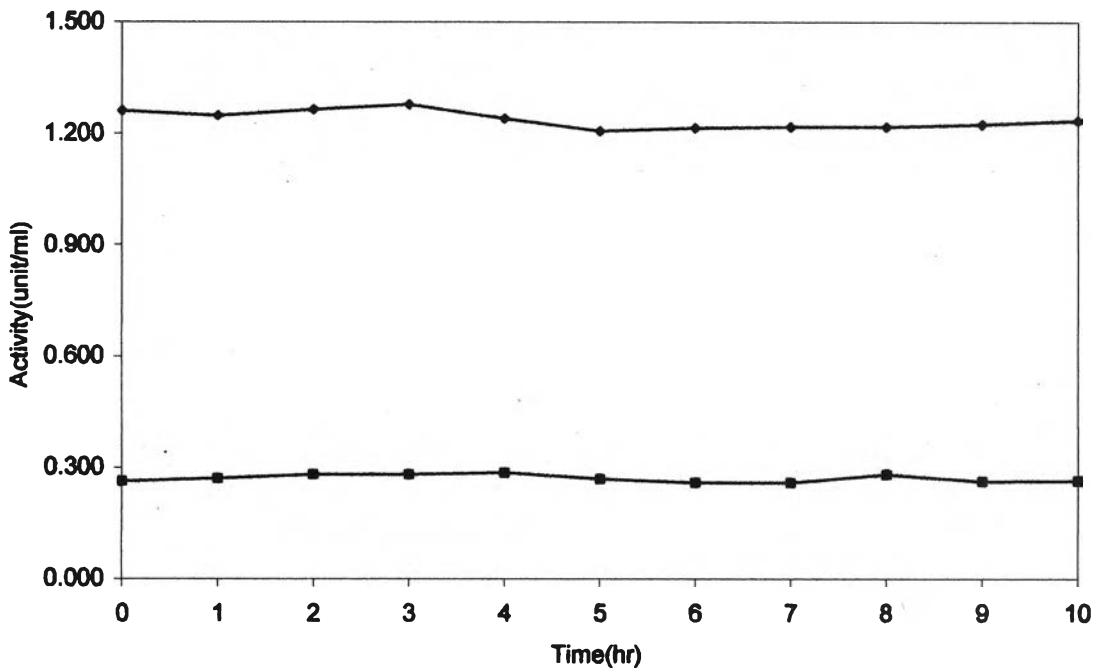
สารละลายตัวอย่างบริเวณวัฏภาคที่สามพบว่าตัวอย่างที่เก็บได้จะเกิดการแยกชั้นออกเป็น 2 วัฏภาคคือ วัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่อง โดยที่มีสัดส่วนของทั้งสองวัฏภาคประมาณ 1:1 โดยวัฏภาคกระจายตัวจะอยู่ด้านบนและวัฏภาคต่อเนื่องจะอยู่ด้านล่างดังรูปที่ 5.16 และเมื่อนำสารละลายตัวอย่างมาวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมเอนไซม์จะได้ผลการทดลองดังรูปที่ 5.17 จากรูปจะพบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เก็บได้จากวัฏภาคที่สามทั้งในวัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่องมีค่าคงที่ตามเวลาที่ดำเนินการทดลอง คือ 1.237 และ 0.271 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ จึงถือได้ว่าในการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัดโอลชูรัชตันขนาด 5.7 ลิตร ไม่มีการสะสมของเอนไซม์ภายในวัฏภาคที่สามจึงไม่ส่งผลกับการได้เปอร์เซ็นต์ผลได้ต่ำของงานวิจัยนี้ และเมื่อนำค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เก็บได้จากวัฏภาคที่สามในส่วนของวัฏภาคต่อเนื่องมาเปรียบเทียบกับโพรไฟล์ความเข้มข้นของเอนไซม์ในวัฏภาคต่อเนื่องของวัฏภาคที่สามตามความสูงของหอสกัด พบว่าความสูงของวัฏภาคที่สามจะเกิดขึ้นบริเวณตำแหน่งที่ 72 เซนติเมตรของหอสกัด(อ้างอิงตำแหน่งที่ 0 เซนติเมตรคือปลายหอสกัดทางด้านล่าง)ดังแสดงในรูปที่ 5.18



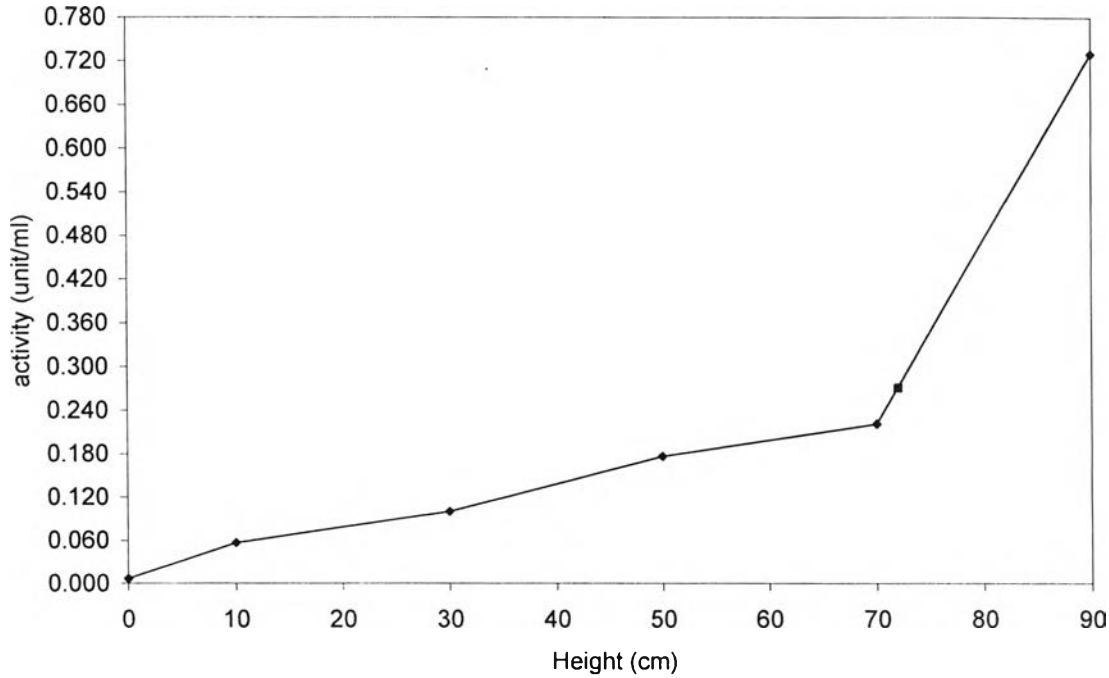
รูปที่ 5.15 (1) แสดงการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสที่ใช้สารเคมีคุณภาพระดับการค้า; (2) แสดงการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสที่ใช้สารเคมีคุณภาพระดับห้องปฏิบัติการ ;(3) แสดงการเปรียบเทียบการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสที่ใช้สารเคมีระหว่างคุณภาพระดับการค้า(ซ้าย)และคุณภาพระดับห้องปฏิบัติการ (ขวา) ภาวะที่ทำการทดลอง ความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก อุณหภูมิห้อง (30± 2 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 5.16 แสดงการแยกชั้นออกเป็นวัฏภาคกระจายตัว(ด้านบน)และวัฏภาคต่อเนื่อง(ด้านล่าง) ของวัฏภาคที่สามใต้ settling zone ของวัฏภาคกระจายตัว
ภาวะที่ทำการทดลอง ความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก อุณหภูมิห้อง(30 + 2 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 5.17 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ในวัฏภาคที่สาม; ◆ แทนค่ากิจกรรมเอนไซม์ของวัฏภาคกระจายตัวในวัฏภาคที่สาม, ■แทนค่ากิจกรรมเอนไซม์ของวัฏภาคต่อเนื่องในวัฏภาคที่สาม
ภาวะที่ทำการทดลอง ความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก อัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัวที่ 97/28 มิลลิลิตรต่อนาที การปั่นกวนของใบพัดที่ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส)

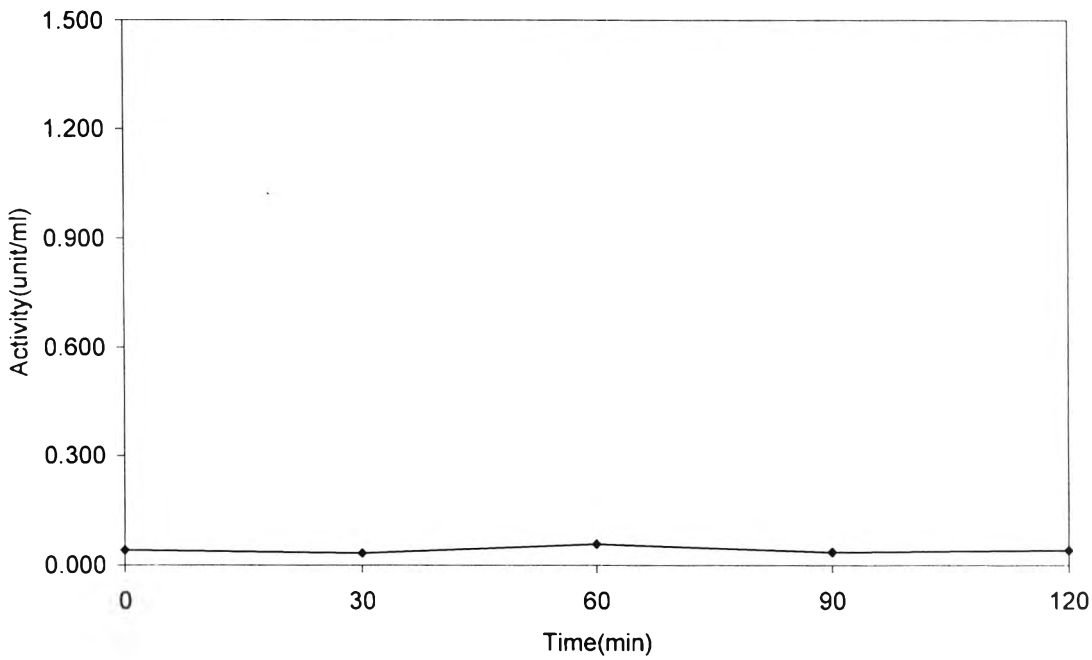


รูปที่ 5.18 แสดงโพรไฟล์ความเข้มข้นของเอนไซม์ในวัฏภาคต่อเนื่องของวัฏภาคที่สามตามความสูงของหอสกัด และ ▪ แทนค่ากิจกรรมเอนไซม์ของวัฏภาคที่สาม(วัฏภาคต่อเนื่อง) ภาวะที่ทำการทดลอง ความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก อัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัวที่ 97/28 มิลลิลิตรต่อนาที การปั่นกวนของใบพัดที่ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส)

5.6.3 ตรวจสอบค่ากิจกรรมเอนไซม์ของวัฏภาคกระจายตัวที่ผสมมากับวัฏภาคต่อเนื่องขาออก

ในการดำเนินการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัดโอลชูรัชตันขนาด 5.7 ลิตร จะพบว่ามีวัฏภาคกระจายตัวผสมออกมากับวัฏภาคต่อเนื่องขาออก เนื่องจากสายป้อนของวัฏภาคกระจายตัวขาเข้าและวัฏภาคต่อเนื่องขาออกมีตำแหน่งเดียวกันแต่อยู่คนละด้านของหอสกัดเท่านั้น ดังนั้นผู้ทำวิจัยจึงได้ตั้งสมมติฐานว่า ภายในวัฏภาคกระจายตัวที่ผสมออกมานั้นจะมีเอนไซม์กระจายตัวอยู่ จึงทำให้เกิดการสูญเสียค่ากิจกรรมเอนไซม์ในกระบวนการสกัด และเมื่อทำการทดลองสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัดโอลชูรัชตันขนาด 5.7 ลิตร ที่ความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก อัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัวที่ 97/28 มิลลิลิตรต่อนาที การปั่นกวนของใบพัดที่ 100 รอบต่อนาที เพื่อตรวจสอบค่ากิจกรรมเอนไซม์ของวัฏภาคกระจายตัวที่ผสมมากับวัฏภาคต่อเนื่องขาออก ที่จะส่งผลให้ได้เปอร์เซ็นต์ผลได้ต่ำ ซึ่งเมื่อดำเนินการทดลองจะได้ผลการทดลองดังรูปที่ 5.19 จากรูปที่ 5.19 แสดงให้เห็นว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่วัดได้ถือได้ว่ามีค่าคงที่

ตลอดเวลาที่ทำการทดลองโดยมีค่าประมาณ 0.042 ยูนิตต่อมิลลิลิตร(4 มิลลิลิตรต่อนาที) หรือคิดเป็น 0.35 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ของวัฏภาคกระจายตัวขาออกเท่ากับ 1.695 ยูนิตต่อมิลลิลิตร(28 มิลลิลิตรต่อนาที) ซึ่งถือได้ว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่วัดได้จากวัฏภาคกระจายตัวที่ผสมมากับวัฏภาคต่อเนื่องขาออกมีค่าน้อยมาก จึงไม่ส่งผลกับการได้เปอร์เซ็นต์ผลได้ต่ำของงานวิจัยนี้



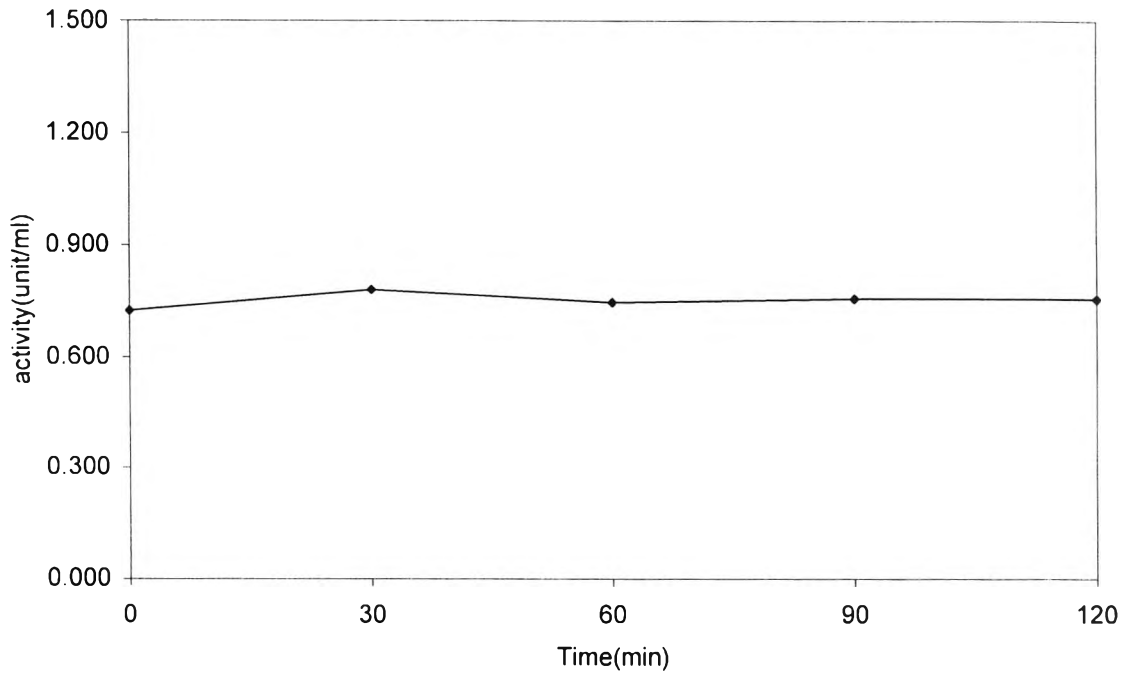
รูปที่ 5.19 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่วัดจากวัฏภาคกระจายตัวที่ผสมมากับวัฏภาคต่อเนื่องขาออก

ภาวะที่ทำการทดลอง ความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก อัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัวเท่ากับ 97/28 มิลลิลิตรต่อนาที การปั่นกวนของใบพัดเท่ากับ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง (30± 2 องศาเซลเซียส)

5.6.4 อิทธิพลของการปั่นกวนของใบพัดในหอสกัด

ในการดำเนินการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัดของงานวิจัยนี้ ภายในของหอสกัดจะมีใบพัดเพื่อช่วยให้เกิดการถ่ายเทมวลของเอนไซม์และใบพัดจะทำให้เกิดแรงเฉือนขึ้น ดังนั้นจึงตั้งสมมติฐานว่าแรงเฉือนที่เกิดจากการปั่นกวนของใบพัดจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการสูญเสียค่ากิจกรรมเอนไซม์ในกระบวนการสกัด จึงทำการทดลองสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัดโอลชูรัชตันขนาด 5.7 ลิตร โดยจะเตรียมวัฏภาคต่อเนื่องเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นของน้ำหมักเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณ 4 ลิตร จากนั้นเติมวัฏภาคต่อเนื่องที่เตรียมไว้ลงในหอสกัดที่มีการปั่นกวนของ

ใบพัดเท่ากับ 100 รอบต่อนาทีตลอดการทดลอง เพื่อศึกษาอิทธิพลของการปั่นกวนของใบพัดในหอสกัดที่จะส่งผลให้ได้เปอร์เซ็นต์ผลได้ต่ำ โดยจะดำเนินการทดลองและเก็บตัวอย่างที่ความสูง 30 เซนติเมตรของหอสกัด ที่ระยะเวลาในการดำเนินการทดลองต่างๆ ดังนี้ 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมง ซึ่งจะได้ผลการทดลองดังรูปที่ 5.20



รูปที่ 5.20 แสดงอิทธิพลของการปั่นกวนของใบพัดที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ของวัฏภาคต่อเนื่องเริ่มต้น

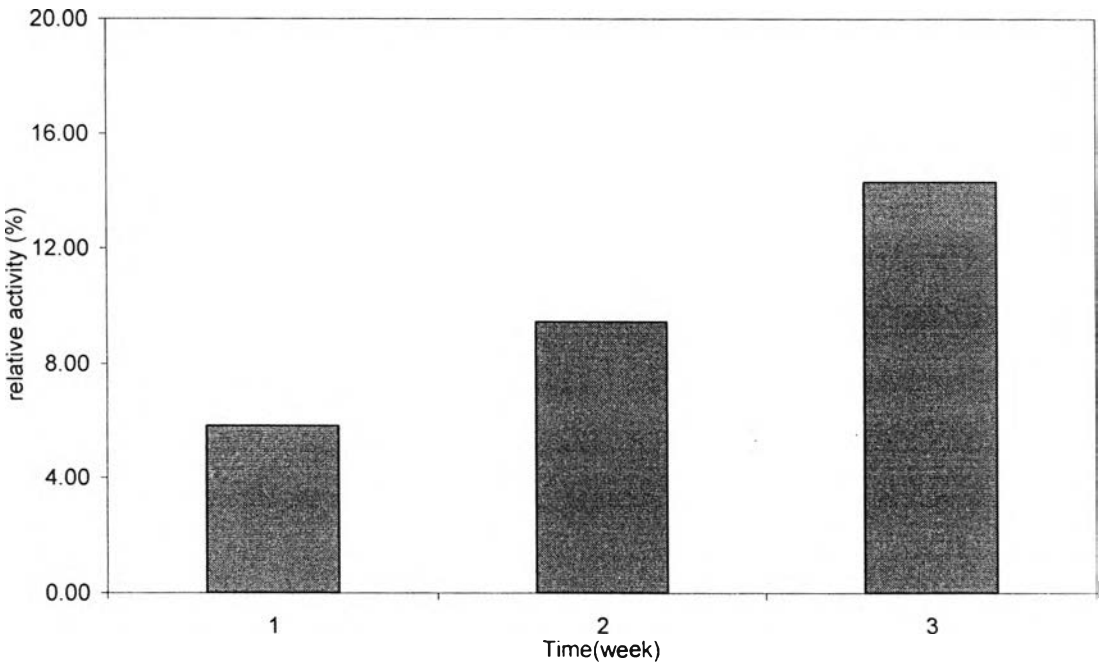
<u>ภาวะที่ทำการทดลอง</u> ความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเริ่มต้นเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก การปั่นกวนของใบพัดเท่ากับ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง(30+ 2 องศาเซลเซียส)

จากรูปที่ 5.20 แสดงให้เห็นว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ในวัฏภาคต่อเนื่องเริ่มต้นที่วิเคราะห์ได้นั้น มีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้นที่ทำการเก็บตัวอย่าง(เวลาที่ 0 ชั่วโมง) จึงสรุปได้ว่าการปั่นกวนของใบพัดไม่มีผลทำให้มีการลดลงของค่ากิจกรรมเอนไซม์ในวัฏภาคต่อเนื่องเริ่มต้นที่ส่งผลให้ได้เปอร์เซ็นต์ผลได้ต่ำ

จากการทดลองต่างๆข้างต้น จึงยังไม่พบสาเหตุของการสูญเสียค่ากิจกรรมเอนไซม์ระหว่างที่ดำเนินการทดลองที่จะส่งผลให้ได้เปอร์เซ็นต์ผลได้มีค่าต่ำ จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าเหตุใดงานวิจัยนี้จึงได้เปอร์เซ็นต์ผลได้ต่ำ

5.7 การทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ที่สามารถสกัดได้

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสที่สามารถสกัดได้ โดยเอนไซม์ที่นำมาทดสอบนั้นจะเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในวัฏภาคกระจายตัว เป็นการทดสอบเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ก่อนจะนำไปใช้งาน โดยจะเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องดังแสดงในรูปที่ 5.21 จากรูปที่ 5.21 แสดงให้เห็นว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์มีการลดลงจากค่ากิจกรรมเริ่มต้นมากขึ้น โดยลดลงจากเริ่มต้นเป็น 5.81, 9.44 และ 14.29 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 1, 2 และ 3 อาทิตย์ตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าวให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของวิไลวรรณ,(2544) โดยงานวิจัยของวิไลวรรณพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง 12.9 เปอร์เซ็นต์ในระยะเวลาการเก็บรักษา 1 เดือนที่อุณหภูมิห้อง(30±2 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 5.21 แสดงอิทธิพลของเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาเอนไซม์ที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์ ภาวะที่ทำการทดลองคือ อุณหภูมิห้อง(30±2 องศาเซลเซียส)