

ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคสำหรับการสกัดแอลกอฮอล์โพธิเอส



นางสาวนันทิญา วงษ์มงคล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี


คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-13-0959-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

AN AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM FOR ALKALINE PROTEASE EXTRACTION



Miss Nuntiya Wongmongkol

สถาบันวิทยบริการ

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2000

ISBN 974-13-0959-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ระบบสารละลายนำสองวัฏภาคสำหรับการสกัดแอลคาไลโนไฟรทีเอส
โดย	นางสาวนันทิญา วงษ์มงคล
สาขาวิชา	วิศวกรรมเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สีรุ้ง ปรีชานนท์

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ปัญญาแก้ว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย สุกาญจน์จที)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สีรุ้ง ปรีชานนท์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร.เหมือนเดือน พิศาลพงศ์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นันทิญา วงษ์มงคล : ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคสำหรับการสกัดแอลคาไลโนโปรตีเอส.
(AN AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM FOR ALKALINE PROTEASE EXTRACTION)
อ. ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริรุ่ง ปริษานนท์, 124 หน้า. ISBN 974-13-0959-7.

ในงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์หลักเพื่อพัฒนาระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของโพลีเอทิลีนไกลคอล (PEG) กับโพแทสเซียมฟอสเฟตสำหรับการสกัดแอลคาไลโนโปรตีเอส โดยศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเกิดการแยกวัฏภาคและการสกัดแอลคาไลโนโปรตีเอสด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคดังกล่าว

ทำการศึกษาการแยกแอลคาไลโนโปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* NS 99 ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1000 กับโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4 และ KH_2PO_4) ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) และความดันบรรยากาศ ซึ่งในวัฏภาคนบนจะมี PEG อยู่ในปริมาณมาก ส่วนในวัฏภาคล่างจะมีฟอสเฟตอยู่มาก โดยศึกษาอิทธิพลจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบ (pH), ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และความยาวของเส้นผูก ที่มีต่อลักษณะของแผนภาพวัฏภาค และค่าสัมประสิทธิ์การแยก (K) ในช่วงความเข้มข้นเริ่มต้นของ PEG1000 เท่ากับ 5-70 % (w/w), ที่ pH 4 ค่าคือ 7.5, 8.5, 9.5 และ 10.5 และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ 0, 4, 7 และ 10 % (w/w) พบว่า pH มีผลน้อยมากหรือไม่มีผลต่อการแยกวัฏภาค ในขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์จะไปลดความเข้มข้นของ PEG1000 และ/หรือ โพแทสเซียมฟอสเฟตที่ต้องการใช้ในการเกิดการแยกวัฏภาค ส่วนค่า K ของแอลคาไลโนโปรตีเอสพบว่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่ม pH แต่จะลดลงเมื่อเพิ่มความยาวของเส้นผูกและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการสกัดแอลคาไลโนโปรตีเอสในช่วงที่ทำการทดลองนี้คือ ระบบที่ประกอบด้วย PEG1000 18.00 % (w/w), โพแทสเซียมฟอสเฟต 13.01 % (w/w) และโซเดียมคลอไรด์ 0 % (w/w) ที่ pH 9.5, อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) และความดันบรรยากาศ ซึ่งให้ค่า K เท่ากับ 20.0 และให้ค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้เท่ากับ 95.1.

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา.....วิศวกรรมเคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา.....2543.....

4070313021 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING DEPARTMENT

KEY WORD: AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM (ATPS) / ALKALINE PROTEASE / PROTEIN

PARTITIONING

NUNTIYA WONGMONGKOL : AN AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM FOR ALKALINE PROTEASE EXTRACTION. THESIS ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR SEEROONG PRICHANONT, Ph.D. , 124 pp. ISBN 974-13-0959-7.

The aim of this work was to develop a polyethylene glycol (PEG) – potassium phosphate aqueous two-phase system for extraction of an alkaline protease and to determine suitable conditions for phase forming and alkaline protease extraction by aqueous two-phase system.

The partitioning of an alkaline protease from *Bacillus subtilis* NS 99 in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol with MW 1000 Da and potassium phosphate salts (K_2HPO_4 and KH_2PO_4) was examined at ambient temperature (30 ± 2 °C) and atmospheric pressure. The top phase was rich in PEG while the bottom phase was rich in phosphate. Factors such as pH, concentration of sodium chloride (NaCl) and tie-line length were found to influence phase diagram and partition coefficient (K) in range of initial concentration of PEG1000, 5-70 % (w/w); pH at 7.5, 8.5, 9.5 and 10.5, and NaCl concentration at 0, 4, 7 and 10 % (w/w). In the forming of aqueous two-phase, pH was found to have very slight or almost no effect. In contrast, increase in NaCl concentration was discovered to reduce PEG and/or potassium phosphate concentrations used in phase formation. The alkaline protease partition coefficient was enhanced with increasing pH but decreased with increasing tie-line length and concentration of NaCl. The suitable conditions found for alkaline protease extraction were 18.00 % (w/w) PEG1000, 13.01 % (w/w) potassium phosphate and 0 % (w/w) NaCl at pH 9.5, ambient temperature (30 ± 2 °C) and atmospheric pressure which gave the K value of 20.0 and percent yield of 95.1.

Department.....Chemical engineering..... Student's signature..... 

Field of study.....Chemical engineering..... Advisor's signature..... 

Academic year2000.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลือจากหลาย ๆ ท่าน ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริรุ่ง ปรีชานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูงสำหรับการให้คำปรึกษาที่มีคุณค่าต่อการพัฒนางานวิจัย การตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ ตลอดจนการพัฒนาคิดในการเป็นนักวิจัยที่ดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย สุภาภูจนิจที่ ประธานกรรมการ และอาจารย์ ดร.เหมือนเดือน พิศาลพงศ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้เสนอข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์และแก้ไข เพิ่มเติมส่วนที่บกพร่องของงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์ จากภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุเคราะห์แอลคาไลน์โปรทีเอสจาก *Bacillus subtilis* NS 99 ตลอดจนงานวิจัยนี้ รวมถึงการให้คำปรึกษาและข้อคิดเห็นที่มีคุณค่าต่องานวิจัย โดยเฉพาะในเรื่องเอนไซม์

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย และภาควิชาวิศวกรรมเคมี ที่ได้สนับสนุนให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณสุนันท์ รัชชีกาญจน์ส่อง จากศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความกรุณาในการให้คำปรึกษาและการใช้เครื่องมือวิเคราะห์เกี่ยวกับการทำวิจัยในครั้งนี้

ท้ายที่สุดนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และคุณยาย ที่ให้การสนับสนุนทางการศึกษาและเป็นกำลังใจที่สำคัญตลอดมา อีกทั้งพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ที่คอยให้กำลังใจ รวมถึงให้ความช่วยเหลือที่เป็นประโยชน์ต่าง ๆ จนทำให้ผู้วิจัยสามารถทำงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 วัตถุประสงค์.....	2
1.2 ขอบเขตการศึกษา.....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2. ทฤษฎี.....	4
2.1 บทนำ.....	4
2.2 เอนไซม์.....	4
2.2.1 โครงสร้างของเอนไซม์.....	4
2.2.2 การทำงานของเอนไซม์.....	5
2.2.3 การเรียกชื่อเอนไซม์.....	6
2.2.4 หน่วยของเอนไซม์.....	7
2.2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์.....	7
2.2.6 โพรทีเอส.....	8
3. การสกัดของเหลวด้วยของเหลว.....	11
2.3.1 ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค.....	11
2.3.2 แผนภาพวัฏภาค.....	15
2.3.3 สัมประสิทธิ์การแยก.....	20

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3. ตรวจสอบเอกสาร.....	22
3.1 บทนำ.....	22
3.2 กระบวนการสกัดสารทางชีวภาพ.....	22
3.2.1 การหมุนเหวี่ยง.....	23
3.2.2 การกรอง.....	23
3.2.3 การตกตะกอนโปรตีน.....	23
3.2.4 โคโรมาโตกราฟี.....	24
3.3 ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก.....	30
3.3.1 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์หรือโปรตีนที่ต้องการ.....	30
3.3.2 คุณสมบัติของระบบ.....	32
3.3.3 ความเป็นกรด-ด่างของระบบ.....	32
3.3.4 ชนิดและน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของพอลิเมอร์.....	34
3.3.5 ชนิดและความเข้มข้นของเกลือ.....	36
3.3.6 ความยาวของเส้นผูก.....	37
3.3.7 แรงไอออนิกจากการเติมเกลือ.....	39
4. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	42
4.1 อุปกรณ์.....	42
4.2 เคมีภัณฑ์.....	42
4.3 เอนไซม์.....	43
4.4 วิธีการทดลอง.....	43
4.4.1 การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดระบบสารละลายน้ำสอง วัฏภาค.....	43
4.4.2 การหาค่าสัมประสิทธิ์การแยก.....	44
4.5 การวิเคราะห์.....	47
4.5.1 การวิเคราะห์โดยใช้ไฮเพอร์ฟลูออเรสเซนต์ ลิวคิวิต โคโรมาโตกราฟี.....	47
4.5.2 การวิเคราะห์โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง.....	49

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5. ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	50
5.1 บทนำ.....	50
5.2 แผนภาพวัฏภาคของระบบ PEG1000 / โพลีเอทิลีนฟอสเฟต / น้ำ.....	50
5.2.1 แผนภาพวัฏภาคที่ได้จากการทดลอง.....	52
5.2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะของเส้นแบ่งวัฏภาค.....	54
5.3 ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาลิโนโปรทีเอสจาก <i>B. subtilis</i> NS 99.....	58
5.3.1 ผลของความยาวของเส้นผูกต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก.....	63
5.3.2 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก.....	66
5.3.3 ผลของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก.....	70
6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	76
6.1 สรุปผลการทดลอง.....	76
6.2 ข้อเสนอแนะ.....	77
รายการอ้างอิง.....	79
ภาคผนวก.....	86
ภาคผนวก ก.....	87
ภาคผนวก ข.....	92
ภาคผนวก ค.....	109
ภาคผนวก ง.....	114
ภาคผนวก จ.....	119
ประวัติผู้เขียน.....	124

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค..... 12
3.1	การสกัดโพธิเอสด้วยวิธีการต่าง ๆ..... 24
3.2	องค์ประกอบของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ใช้ในการสกัดผลิตภัณฑ์..... 27
3.3	น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนชนิดต่าง ๆ..... 31
3.4	ผลของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก..... 31
3.5	ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก..... 33
3.6	ผลของน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของพอลิเมอร์ต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก..... 35
3.7	ผลของชนิดของประจุบวกต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก..... 36
3.8	ผลของความยาวของเส้นผูกต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก..... 37
3.9	ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีนทั้ง 5 ชนิดในระบบ PEG / เด็กซ์แทรน / น้ำ ที่ ความยาวของเส้นผูกต่าง ๆ กัน..... 38
3.10	ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก..... 39
4.1	การเตรียมความเข้มข้นของไทโรซีนเพื่อใช้ในการหาค่ามาตรฐานไทโรซีน..... 46
5.1	ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกตัวถูกละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค..... 59
5.2	ค่าสัมประสิทธิ์การแยกและเปอร์เซ็นต์ผลได้ของแอลคาไลโนโพธิเอสจาก <i>B. subtilis</i> NS 99 ในระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ภาวะต่าง ๆ.. 61
5.3	ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลโนโพธิเอสในระบบ PEG / โพแทสเซียม- ฟอสเฟต / น้ำ ที่อุณหภูมิห้อง..... 66
5.4	ค่าสัมประสิทธิ์การแยกสูงสุดและเปอร์เซ็นต์ผลได้ที่มีผู้ศึกษาแล้ว..... 74
ก.1	ค่ามาตรฐานของ PEG1000 จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ Lichrocart C ₈ 88
ก.2	ค่ามาตรฐานของโพแทสเซียมฟอสเฟต จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ Lichrocart C ₈ 89
ก.3	ค่ามาตรฐานของโพแทสเซียมฟอสเฟต จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ Zorbax-Sax..... 90
ก.4	ค่ามาตรฐานของการดูดกลืนแสงของไทโรซีนในสารละลายคาร์บอนเนต-ไบคาร์บอนเนต บัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน..... 91

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ง.1	องค์ประกอบของสารในแต่ละภูมิภาคที่แสดงให้เห็นผูกในภาวะต่าง ๆ ที่ทำการทดลอง..120
ง.2	องค์ประกอบของระบบที่ใช้ในการหาค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์ โพรทีเอสจาก <i>B. subtilis</i> NS 99 ในทุกภาวะที่ทำการทดลอง..... 122



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	แผนภาพวิภูภาครูปสามเหลี่ยมของระบบ dextran70 / Ficoll400 / น้ำ..... 15
2.2	แผนภาพวิภูภาคของการผสมพอลิเมอร์ P และ Q ในน้ำ..... 16
2.3	แผนภาพวิภูภาคของระบบที่มีองค์ประกอบของ Dextran70 / Ficoll400 / น้ำ ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส..... 17
2.4	แผนภาพวิภูภาคของระบบที่มีองค์ประกอบของ PEG8000 / เด็กซ์แทรน500 / น้ำ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส..... 18
2.5	แผนภาพวิภูภาคของระบบที่มีองค์ประกอบของ PEG8000 / เด็กซ์แทรนT-500 (น้ำหนักโมเลกุล 500,000) / น้ำ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส..... 19
2.6	แผนภาพวิภูภาคของระบบที่มีองค์ประกอบของ PEG 8000 / โพลแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยโพลแทสเซียมฟอสเฟตเป็นสารผสมระหว่าง ไดโพลแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 306.9 กรัม กับโพลแทสเซียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต (KH_2PO_4) 168.6 กรัม..... 20
5.1	แผนภาพวิภูภาคของระบบ PEG1000 / โพลแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ 0 เเปอร์เซ็นต์- โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ต่างเท่ากับ 7.5, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ..... 53
5.2	แสดงเส้นแบ่งวิภูภาคของระบบ PEG1000 / โพลแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ 0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ..... 55
5.3	แสดงเส้นแบ่งวิภูภาคของระบบ PEG1000 / โพลแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ค่าความเป็น- กรด-ต่างเท่ากับ 7.5, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ..... 57
5.4	ผลของความยาวของเส้นผูกต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก ที่ค่าความเป็นกรด-ต่างเท่ากับ 10.5, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ..... 64
5.5	ผลของความยาวของเส้นผูกต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก ที่เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของ โซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียสและที่ความดันบรรยากาศ..... 64
5.6	ผลของค่าความเป็นกรด-ต่างของระบบต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก ที่ปริมาณ โซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ..... 69
5.7	ผลของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกที่ค่าความเป็นกรด-ต่างของ ระบบต่าง ๆ..... 72

สารบัญญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ก.1 ค่ามาตรฐานของ PEG1000 จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ Lichrocart C ₈	88
ก.2 ค่ามาตรฐานของโพแทสเซียมฟอสเฟต จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ Lichrocart C ₈	89
ก.3 ค่ามาตรฐานของโพแทสเซียมฟอสเฟต จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ Zorbax-Sax.....	90
ก.4 ค่ามาตรฐานของการดูดกลืนแสงของโทโรซีนในสารละลายคาร์บอนเนต-ไบคาร์บอนเนต บัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน.....	91
ข.1 แผนภาพวิภูภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ 0 เปอร์เซ็นต์- โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5, อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ.....	93
ข.2 แผนภาพวิภูภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ 0 เปอร์เซ็นต์- โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.5, อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ.....	94
ข.3 แผนภาพวิภูภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ 0 เปอร์เซ็นต์- โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9.5, อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ.....	95
ข.4 แผนภาพวิภูภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ 0 เปอร์เซ็นต์- โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5, อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ.....	96
ข.5 แผนภาพวิภูภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ 4 เปอร์เซ็นต์- โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5, อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ.....	97
ข.6 แผนภาพวิภูภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ 4 เปอร์เซ็นต์- โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.5, อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ.....	98

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ข.16 แผนภาพวิภูภาคของระบบ PEG1000 / โพลีเอทิลีนฟอสเฟต / น้ำ ที่ 10 เปอร์เซ็นต์- โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5, อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ.....	108
ค.1 แสดงเส้นแบ่งวิภูภาคของระบบ PEG1000 / โพลีเอทิลีนฟอสเฟต / น้ำ ที่ 0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ.....	110
ค.2 แสดงเส้นแบ่งวิภูภาคของระบบ PEG1000 / โพลีเอทิลีนฟอสเฟต / น้ำ ที่ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ.....	111
ค.3 แสดงเส้นแบ่งวิภูภาคของระบบ PEG1000 / โพลีเอทิลีนฟอสเฟต / น้ำ ที่ 7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ.....	112
ค.4 แสดงเส้นแบ่งวิภูภาคของระบบ PEG1000 / โพลีเอทิลีนฟอสเฟต / น้ำ ที่ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ.....	113
ง.1 แสดงเส้นแบ่งวิภูภาคของระบบ PEG1000 / โพลีเอทิลีนฟอสเฟต / น้ำ ที่ค่าความเป็น- กรด-ด่างเท่ากับ 7.5, อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ.....	115
ง.2 แสดงเส้นแบ่งวิภูภาคของระบบ PEG1000 / โพลีเอทิลีนฟอสเฟต / น้ำ ที่ค่าความเป็น- กรด-ด่างเท่ากับ 8.5, อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ.....	116
ง.3 แสดงเส้นแบ่งวิภูภาคของระบบ PEG1000 / โพลีเอทิลีนฟอสเฟต / น้ำ ที่ค่าความเป็น- กรด-ด่างเท่ากับ 9.5, อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ.....	117
ง.4 แสดงเส้นแบ่งวิภูภาคของระบบ PEG1000 / โพลีเอทิลีนฟอสเฟต / น้ำ ที่ค่าความเป็น- กรด-ด่างเท่ากับ 10.5, อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ.....	118

บทที่ 1

บทนำ

เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่ช่วยให้กระบวนการผลิตทำได้ง่ายขึ้น ลดขั้นตอนที่ซับซ้อน รวมถึงปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ เอนไซม์จึงมีความจำเป็นต่อกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมเป็นอย่างมาก ในขณะที่ประเทศไทยไม่มีการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม จึงจำเป็นต้องนำเข้าเอนไซม์จากต่างประเทศในปริมาณมากและมีราคาแพง ซึ่งทำให้ในแต่ละปีต้องสูญเสียเงินเป็นจำนวนมาก

โพรทีเอส หรือ โพรทีโอไลติกเอนไซม์ เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนที่ใช้มากในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ภายในประเทศ มีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมอาหาร เส้นใย ผงซักฟอก ฟอกหนัง เบียร์และยาประเภทช่วยย่อยอาหาร โดยมีหน้าที่สำคัญในการทำให้เนื้อนุ่ม ช่วยความคงตัวของเบียร์และไวน์ เพิ่มคุณภาพของโด (dough) ช่วยในการฟอกหนัง การซักแห้ง ใช้ล้างฟิล์มถ่ายภาพ ทำเนยแข็ง ผลิตอาหารโปรตีนไฮโดรไลเซต สกัดโปรตีนจากโรงงานฆ่าสัตว์ ใช้ในการผลิตอาหารที่ได้จากผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองและถั่วอื่น ๆ นอกจากนี้ยังเป็นส่วนสำคัญในอาหารหมักดองประเภทปลาอีกหลายชนิด เช่น น้ำปลา การผลิตปลาป่น การผลิตน้ำมันปลาและโปรตีนเข้มข้นจากปลา

การผลิตโพรทีเอสในระยะเริ่มต้นนั้น ใช้พืชและสัตว์เป็นแหล่งวัตถุดิบ แต่ในปัจจุบันมีการผลิตโพรทีเอสจากจุลินทรีย์ เช่น เชื้อราและแบคทีเรีย เนื่องจากมีต้นทุนการผลิตต่ำกว่าและสามารถควบคุมการผลิตได้ดีกว่าด้วย แบคทีเรียสกุลบาซิลลัสเป็นแบคทีเรียที่นิยมใช้ในการผลิตโพรทีเอส เนื่องจากบาซิลลัสผลิตโพรทีเอสเป็นเอนไซม์นอกเซลล์ (extracellular enzyme) ในปริมาณสูง ทำให้ง่ายต่อการสกัดเอาเอนไซม์ออกมา โดยทั่วไปการผลิตเอนไซม์จะได้รับการหมักจุลินทรีย์ ดังนั้น การสกัดเอนไซม์จากน้ำหมักจึงเป็นขั้นตอนสำคัญในการผลิตเอนไซม์ เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์ขึ้น

โดยทั่วไปวิธีการแยกสารในกระบวนการทางชีวเคมี เช่น การกรอง, การหมุนเหวี่ยง จะขึ้นกับขนาดอนุภาคของสารนั้น การใช้กระบวนการแยกของแข็ง-ของเหลว (solid-liquid separation) เพื่อใช้แยกสารทางชีวภาพ จะมีข้อจำกัดเมื่อมีเซลล์หรือชิ้นส่วนของเซลล์จุลินทรีย์ในอยู่ ซึ่งใน

ปัจจุบันนิยมใช้การสกัดของเหลวด้วยของเหลว (liquid-liquid extraction) ในอุตสาหกรรมการหมักเพื่อใช้แยกเอนไซม์ออกจากเซลล์ และทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (Aqueous Two-Phase System, ATPS) เป็นระบบหนึ่งของการสกัดของเหลวด้วยของเหลว ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการแยกเอนไซม์ออกจากน้ำหมัก เนื่องจากเป็นระบบที่ทำได้ง่าย สะดวก มีประสิทธิภาพสูง ที่สำคัญคือมีน้ำเป็นตัวทำละลายที่เป็นองค์ประกอบหลักของระบบ โดยที่น้ำเป็นสารที่มีราคาถูกและไม่ทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ เนื่องจากน้ำเป็นสารละลายธรรมชาติของเอนไซม์อยู่แล้ว นอกจากนี้การขยายระดับในการผลิตจากระดับทดลองในห้องปฏิบัติการสู่ระดับอุตสาหกรรมยังทำได้ง่าย โดยให้ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ และผลได้ (yield) ใกล้เคียงกันทั้งสองระดับ แม้ว่าแฟคเตอร์ในการขยายระดับ (scale up factor) จะมีค่าสูงมาก แต่ก็สามารถทำได้สำเร็จแล้วในระดับอุตสาหกรรม (Cabral และ Aires-Barros, 1993)

1.1 วัตถุประสงค์

1.1.1 หามภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

1.1.2 หามภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดแอลคาไลโนไฟรทีเอส โดยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

1.2 ขอบเขตการศึกษา

ศึกษาการสกัดแอลคาไลโนไฟรทีเอสจาก *Bacillus subtilis* NS 99 โดยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของโพลีเอททิลีนไกลคอลที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1000 (PEG1000) กับโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4 และ KH_2PO_4) ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) และความดันบรรยากาศ โดยปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อลักษณะของแผนภาพวัฏภาค (phase diagram) และค่าสัมประสิทธิ์การแยก (partition coefficient, K) ที่ใช้ในการศึกษา มีดังนี้

1.2.1 ความเข้มข้นเริ่มต้นของโพลีเอททิลีนไกลคอลน้ำหนักโมเลกุล 1000 (PEG1000) ในช่วง 5-70 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

1.2.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในช่วง 7.0-11.0 โดยทำการทดลอง 4 ค่า คือ 7.5, 8.5, 9.5 และ 10.5

1.2.3 ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ในช่วง 0-10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โดยทำการทดลอง 4 ค่า คือ 0, 4, 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทราบถึงภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

1.3.2 ทราบถึงภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดแอลกอฮอล์โดยระบบสารละลายน้ำ

สองวัฏภาค

1.3.3 เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการพัฒนาระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในระดับอุตสาหกรรม

สาขากรรม

1.3.4 เป็นแนวทางในการศึกษาวิจัยต่อไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ทฤษฎี

2.1 บทนำ

ในการศึกษาระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคสำหรับการสกัดแอลคาไลไนไฟรที่เอสจาก *B. subtilis* NS 99 จำเป็นต้องมีความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับเอนไซม์และวิธีการที่ใช้ในการสกัด ในบทนี้แบ่งเป็น 2 ส่วนหลักคือ ส่วนแรกกล่าวถึงลักษณะโดยทั่วไปของเอนไซม์ ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ และชนิดของไฟรที่เอส ส่วนที่สองกล่าวถึงระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ใช้ในการสกัด รวมถึงพารามิเตอร์ที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการสกัดด้วย

2.2 เอนไซม์

2.2.1 โครงสร้างของเอนไซม์

เอนไซม์เป็นโปรตีนซึ่งสังเคราะห์ขึ้นจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โครงรูปของเอนไซม์ถูกกำหนดขึ้นโดยลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน เรียกลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนในสายโพลีเปปไทด์ว่าโครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) สายโพลีเปปไทด์สามารถขดตัวเป็นเกลียว (helix) การขดตัวเช่นนี้เกิดจากการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างออกซิเจนของพันธะเปปไทด์หนึ่งกับไฮโดรเจนของพันธะเปปไทด์ที่อยู่ในตำแหน่งไกลออกไปในสายโพลีเปปไทด์เดียวกัน นอกจากนี้สายโพลีเปปไทด์ยังสามารถขดตัวกันเป็นแผ่นจีบเบตา (β -pleated sheet) เรียกโครงสร้างของการขดเป็นเกลียวหรือเป็นแผ่นจีบเบตาว่าโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure)

ส่วนเอนไซม์ที่เป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นก้อนกลม (globular protein) ซึ่งเกิดจากการที่สายโพลีเปปไทด์ทั้งส่วนที่เป็นเกลียวหรือไม่ก็ตาม ขดไปขดมาอันเนื่องมาจากพันธะไฮโดรเจน พันธะไดซัลไฟด์ แรงดึงดูดไฟฟ้าสถิตย์ แรงดึงดูดแบบไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) และแวนเดอร์วาล (Van der Waals) ระหว่างหมู่ข้างเคียงของกรดอะมิโนต่าง ๆ เรียกโครงสร้างเช่นนี้ว่าเป็นโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) นอกจากนี้เอนไซม์บางชนิดเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์

หลาย ๆ สายหรือหลาย ๆ หน่วยย่อย (subunit) มาจับกัน เรียกโครงสร้างเช่นนี้ว่าเป็นโครงสร้างจตุรภูมิ (quaternary structure)

2.2.2 การทำงานของเอนไซม์

เอนไซม์เป็นกลุ่มของโปรตีนที่มีหน้าที่พิเศษแตกต่างจากโปรตีนและโมเลกุลทั่วไป นั่นคือมีความสามารถเร่งปฏิกิริยาเคมีในสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงกว่าตัวเร่งสังเคราะห์หลายเท่า แม้ในปริมาณเพียงเล็กน้อย (ระดับไมโครโมลาร์) ก็ตาม นอกจากนี้เอนไซม์สามารถทำงานได้ภายใต้สภาวะไม่รุนแรง (mild condition) ซึ่งเหมาะสมอย่างยิ่งกับสภาวะภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เอนไซม์มีความจำเพาะ (specificity) ต่อสับสเตรทสูงมาก และเร่งปฏิกิริยาโดยไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่น รวมทั้งเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยา โดยเอนไซม์มีความสามารถในการกระตุ้น (activation) ทำให้พลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยาลดลง สารที่ทำปฏิกิริยาโดยมีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เรียกว่า สับสเตรท (substrate) ส่วนสารที่ได้จากปฏิกิริยา เรียกว่า ผลิตภัณฑ์ (product)

เอนไซม์มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 12,000 ถึง มากกว่าล้าน เมื่อเทียบกับขนาดของสับสเตรท พบว่าเอนไซม์มีขนาดใหญ่กว่ามาก แต่ไม่ว่าเอนไซม์จะมีขนาดเท่าใดก็ตาม จะมีกรดอะมิโนเพียงบางตำแหน่งเท่านั้นที่มีส่วนในการเร่งปฏิกิริยา โดยเรียกบริเวณนี้ว่าบริเวณเร่ง (active site) ส่วนกรดอะมิโนที่ตำแหน่งอื่น ๆ จะมีส่วนช่วยในการกำหนดโครงสร้างของโมเลกุลเอนไซม์เท่านั้น

เอนไซม์บางชนิดทำงานได้ในสภาพที่เป็นสายโพลีเปปไทด์อิสระ เช่น ไรโบนิวคลีเอสจากตับอ่อน (pancreatic ribonuclease) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์บางชนิดจะมีความสามารถเร่งปฏิกิริยาได้เฉพาะเมื่อมีสารอื่นที่ไม่ใช่โปรตีนที่มีความจำเพาะต่อตัวมันมาช่วยทำงานเท่านั้น ซึ่งสารเหล่านี้เรียกรวม ๆ ว่า โคแฟกเตอร์ (co-factor) แบ่งเป็นสองประเภทตามชนิดของสารเคมีนั้น ประเภทหนึ่งเป็นสารอนินทรีย์ เช่น Zn^{2+} ของคาร์บอกซีเปปติเดส (carboxypeptidase) อีกประเภทหนึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ซึ่งเรียกรวม ๆ ว่าโคเอนไซม์ (co-enzyme) เช่น ไพริดอกซอลฟอสเฟต (pyridoxal phosphate) ของทรานอะมิเนส (transaminase) เอนไซม์บางชนิดต้องการสารอนินทรีย์ บางชนิดต้องการโคเอนไซม์ และบางชนิดต้องการทั้งสองประเภทในขณะเดียวกัน โคแฟกเตอร์เหล่านี้อาจจับกับเอนไซม์อย่างหลวม ๆ หรือจับอย่างเหนียวแน่นและถาวรก็ได้ โคแฟกเตอร์ที่จับกับเอนไซม์อย่างเหนียวแน่นนี้เรียกว่า กลุ่มโปรสเทติก (prosthetic group) ของเอนไซม์ เช่น ฮีม (heme) ของไซโตโครม (cytochrome) เอนไซม์ที่มีโคแฟกเตอร์อยู่บนโมเลกุล

ครบถ้วนและมีความสามารถเร่งปฏิกิริยาได้อย่างสมบูรณ์ เรียกว่า โฮโลเอนไซม์ (holoenzyme) แต่เมื่อแยกส่วนที่เป็นโคแฟกเตอร์ออกจนเหลือแต่ส่วนที่เป็นสายโพลีเปปไทด์ ส่วนที่เหลือเป็นเฉพาะส่วนโปรตีนเรียก เอโปเอนไซม์ (apoenzyme) ซึ่งทำงานได้ไม่ดีเท่าเดิมหรือทำไม่ได้เลย

สารประกอบที่เติมลงไปในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งแล้วทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาช้าลง เรียกว่าตัวยับยั้ง (inhibitor) สารหลายชนิดมีสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่ง ตัวยับยั้งอาจทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่บริเวณจับ (binding site) หรือบริเวณเร่ง (active site) แล้วทำให้สับสเตรทไม่สามารถจับกับเอนไซม์หรือไม่สามารถดำเนินปฏิกิริยาได้ตามปกติ

2.2.3 การเรียกชื่อเอนไซม์

การเรียกชื่อเอนไซม์ แต่เดิมเรียกเป็นชื่อสามัญ (Trivial name) ซึ่งมักเรียกโดยใช้ชื่อของสับสเตรทแล้วต่อท้ายด้วย -ase เช่น amylase, maltase, protease นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ชนิดเดียวกัน แต่มาจากส่วนของร่างกายต่างกัน เช่น pancreatic α -amylase, salivary α -amylase ในปัจจุบันต้องระบุแหล่งด้วย เช่น human α -amylase, hog pancreatic α -amylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เดียวกันคือย่อยแป้ง แต่มีกรดอะมิโนที่เจาะจงต่างกัน ในปี ค.ศ. 1955 คณะกรรมการเอนไซม์นานาชาติ (International Enzyme Commission) ได้กำหนดการเรียกชื่อเอนไซม์ตามระบบตัวเลข โดยจัดจำพวกของเอนไซม์เป็น 6 ชั้น (class) ได้แก่ oxidoreductases, transferases, hydrolases, lyases, isomerases และ ligases ตามลำดับ ซึ่งการเรียกชื่อเอนไซม์ตามระบบตัวเลขนี้ ประกอบด้วยตัวเลข 4 หมู่ เขียนเรียงเป็นลำดับโดยคั่นด้วยเครื่องหมาย “.” ตัวเลขทั้ง 4 หมู่มีความหมายดังนี้

- หมู่ที่ 1 แสดงถึง class
- หมู่ที่ 2 แสดงถึง sub-class
- หมู่ที่ 3 แสดงถึง sub-sub-class
- หมู่ที่ 4 แสดงถึง serial number ของเอนไซม์ชนิดนั้น

เอนไซม์แต่ละชนิดจะมีเลขรหัสเฉพาะของตัวเอง (EC number) เช่น EC 1.1.1.1 คือ alcohol dehydrogenase , EC 2.4.1.22 คือ lactose synthase, EC 3.4.21.14 คือ alkaline protease

2.2.4 หน่วยของเอนไซม์ (unit of enzyme)

ค่าที่แสดงปริมาณของเอนไซม์ในการทำปฏิกิริยานี้เรียกว่าหน่วยของเอนไซม์ ซึ่งมีความหมายตาม Commission on Enzyme of the International Union of Biochemistry ว่า “เอนไซม์ 1 หน่วย คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ทำปฏิกิริยาในการเปลี่ยน 1 ไมโครโมลของสับสเตรทในเวลา 1 นาที ภายใต้ภาวะที่กำหนด”

2.2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีน สารหรือภาวะที่สามารถทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีน เช่น ตัวทำละลาย อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) จึงเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานและโครงสร้างของเอนไซม์ การทำงานของเอนไซม์จึงขึ้นอยู่กับภาวะแวดล้อมเหล่านี้ โดยทั่วไปปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่

2.2.5.1 ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

เอนไซม์ประกอบด้วยสายของกรดอะมิโนมาต่อกัน และกรดอะมิโนมีคุณสมบัติเป็นแอมโฟไลต์ (ampholyte) เช่น อะลานีน (alanine) เมื่อละลายในน้ำจะทำหน้าที่เป็นกรด (ให้โปรตอน) หรือเป็นด่าง (รับโปรตอน) ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายและค่า pK นั่นคือ ความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อประจุของกรดอะมิโน หรือจำนวนประจุที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ และโครงสร้างของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับความเป็นกรด-ด่าง ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างจึงมีอิทธิพลต่อปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และสับสเตรท เช่น อาจทำให้เอนไซม์จับกับสับสเตรทได้ดีขึ้นหรือแยกลง เอนไซม์แต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการทำงานต่างกันที่ความเป็นกรด-ด่างต่างกัน แต่จะมีช่วงหนึ่งที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด เรียกว่า optimum pH ซึ่งมีค่าต่าง ๆ กันตามชนิดของเอนไซม์ เช่น ฟูมาเรส (fumarase) ในอะซีเตทบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ ที่ 25 องศาเซลเซียส มี optimum pH ที่ 6-7

2.2.5.2 อุณหภูมิ

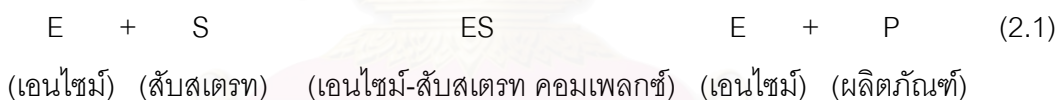
อุณหภูมิของปฏิกิริยามีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เนื่องจากอุณหภูมิมิมีผลต่อเสถียรภาพของเอนไซม์และโคแฟกเตอร์ มีผลต่อปฏิกิริยาชีวเคมีทั่วไป คือ มีผลต่อการละลายของ

สับสเตรท การแตกตัวของบีฟเฟออร์ การจับกันระหว่างเอนไซม์และสับสเตรท, เอนไซม์กับโคแฟกเตอร์และเอนไซม์กับตัวยับยั้ง นอกจากนี้ยังมีผลต่อการแตกตัวของกรดอะมิโนในบริเวณเร่ง

ในปฏิกิริยาเคมีทั่วไป อัตราการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ เนื่องจากโมเลกุลมีพลังงานจลน์มากขึ้น การเพิ่มอุณหภูมิขึ้นทุก 10 องศาเซลเซียสทำให้เอนไซม์ส่วนใหญ่มีอัตราเร็วเพิ่มเป็น 2 เท่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (optimum temperature) มีค่าประมาณ 30-50 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นถึงจุดหนึ่งความสามารถในการทำงานของเอนไซม์จะลดลง เนื่องจากเอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนจะเสียสภาพธรรมชาติ นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์บางชนิดเสียสภาพธรรมชาติที่อุณหภูมิต่ำด้วย

2.2.5.3 ความเข้มข้นของสับสเตรท

ปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ปริมาณหนึ่ง ๆ อัตราเร็วของปฏิกิริยาในช่วงแรก (initial rate) จะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสับสเตรทที่เพิ่มขึ้น ในเวลาต่อมาแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรท แต่อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะคงที่ นั่นคือเอนไซม์อยู่ในรูปของเอนไซม์-สับสเตรท คอมเพลกซ์ (enzyme-substrate complex) เท่านั้น ตามสมการดังต่อไปนี้



2.2.5.4 ความเข้มข้นของเอนไซม์

อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาจะแปรผันเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์เมื่อปฏิกิริยาอยู่ในภาวะที่มีสับสเตรทมากเกินพอ

2.2.6 โพรทีเอส

โพรทีเอส หรือโพรทีโอไลติกเอนไซม์ เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนที่ใช้มากในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ภายในประเทศ มีความสำคัญมากในกระบวนการผลิตของอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมเนยแข็ง, เบียร์, เนื้อ, กล้วยพืช, ฟอกหนัง และอุตสาหกรรมผงซักฟอก โพรทีเอสมีปฏิกิริยาจำเพาะต่อโปรตีน คือ ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีน

โมเลกุล มีชื่อสามัญหลายชื่อ ได้แก่ เปปติเดส (peptidases), โพรทีเอส (protease), โพรทีเนส (proteinases), เปปไทด์ ไฮโดรเลส (peptide hydrolases) และโพรทีโอไลติกเอนไซม์ (proteolytic enzymes)

โดยทั่ว ๆ ไปแบ่งโพรทีเอสออกเป็น 4 กลุ่ม ตามความแตกต่างของลักษณะการทำงานของเอนไซม์ได้ดังนี้

2.2.6.1 แอลคาไลน์โพรทีเอส (alkaline protease) หรือเซอรีนโพรทีเอส (serine protease)

ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนในภาวะสภาวะละลายที่เป็นด่าง ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 8 มี -OH group ของกรดอะมิโนเซอรีนอยู่ที่บริเวณเร่ง ซึ่งมีความจำเป็นต่อความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไคโมทริปซิน (chymotrypsin), ทริปซิน (trypsin), อีลาสเตส (elastase), ทรอมบิน (thrombin) และซบติลิสิน (subtilisin) เช่น ซบติลิสิน คาร์ลสเบิร์ก (subtilisin Carlberg) จาก *Bacillus licheniformis* ซึ่งใช้มากในอุตสาหกรรมสารซักฟอก หรือซบติลิสิน บีพีเอน (subtilisin BPN) จาก *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* และ *B. stearothermophilus* ซึ่งมีคุณสมบัติต่างจากซบติลิสิน คาร์ลสเบิร์ก นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ที่แยกได้จากกลุ่มบาซิลลัสทนด่าง (Alkalophilic *Bacillus*) ซึ่งนอกจากจะทนต่อความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิสูงได้ดี ยังทนต่อสารลดความตึงผิว (surfactants) และสารที่เป็นตัวแยก (sequestering agents) ที่ใช้ผสมในสารซักฟอกได้ดีกว่าซบติลิสิน คาร์ลสเบิร์ก (เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ และพีรดา สิริจินตกานต์, 2530) แอลคาไลน์โพรทีเอสนี้ถูกยับยั้งการทำงานโดยตัวยับยั้งจำเพาะที่มีผลต่อกรดอะมิโนเซอรีน ได้แก่ ได-ไอโซโพรพิลฟลูออโรฟอสเฟต (di-isopropyl fluorophosphonate, DFP) และฟีนิลเมทิลซัลโฟนิล ฟลูออไรด์ (phenylmethyl sulphonyl fluoride, PMSF) เอนไซม์ในกลุ่มนี้เป็นเอนโดเปปติเดส (endopeptidases) คือมีลักษณะการไฮโดรไลสโปรตีนเป็นแบบตัดพันธะในสาย

2.2.6.2 ไทออล (thiol protease) หรือซัลไฟด์ริล โพรทีเอส (sulfhydryl protease)

เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีกลุ่มซัลไฟด์ริล (sulfhydryl group, -SH) อยู่ที่บริเวณเร่ง และอาจมีฮิสติดีล (histidyl) รวมอยู่ด้วย โดยทั่วไปเอนไซม์ในกลุ่มนี้เป็นโพรทีเอสจากพืช เช่น ปาเปน (papain) จากมะละกอ, โบรมีลีน (bromelin หรือ bromelain) จากสับปะรด และไฟซิน (ficin)

จากลูกมะเดื่อ นอกจากนี้มีจากจุลินทรีย์ เช่น *Streptococcus protease* เอนไซม์ในกลุ่มนี้เป็นเอนโดเปปติเดส มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมค่อนข้างกว้าง อยู่ในช่วงระหว่าง 6-7.5 และค่อนข้างทนต่อความร้อนได้ อาจทนได้ถึง 60-80 องศาเซลเซียสที่ความเป็นกรด-ด่างเป็นกลาง

2.2.6.3 นิวทรัลโปรทีเอส (neutral protease) หรือเมทัลโลโปรทีเอส (metallo-protease)

ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่างเป็นกลางคือประมาณ 7 มีอะตอมของโลหะเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในบริเวณเร่ง โดยมากเป็นสังกะสี อาจพบเอนไซม์ชนิดนี้โดยลำพังหรือปนอยู่กับแอลคาไลน์โปรทีเอสด้วยอัตราส่วนต่าง ๆ กัน ตามแต่สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์นั้น ๆ สายพันธุ์ที่พบได้แก่แบคทีเรีย *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus* และ *B. stearothermophilus* และเชื้อรา *Aspergillus oryzae* (เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ และพีรดา สิริจินตกานต์, 2530) ตัวอย่างที่สำคัญของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ เทอร์โมไลซิน (Thermolysin) จาก *B. stearothermophilus* ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์นี้ประกอบด้วยอะตอมของสังกะสี, กรดอะมิโนฮิสติดีน (histidine) และกรดกลูตามิก (glutamic acid) เอนไซม์ในกลุ่มนี้เป็นเอกโซเปปติเดส (exopeptidase) การทำงานของเอนไซม์ถูกยับยั้งได้โดยสารประเภทซีเลติง (metal-chelating agents) ได้แก่ เอทิลีนไดอามีนเตตราอะซีเตต (ethylenediaminetetraacetate, EDTA), 1, 10-ฟีแนนทโรรีน (1, 10-phenanthroline) (เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ และพีรดา สิริจินตกานต์, 2530)

2.2.6.4 แอซิดโปรทีเอส (acid protease)

ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนในภาวะสภาวะละลายที่เป็นกรด คือช่วง 3-5 มีกลุ่มคาร์บอกซิล (carboxyl group) อยู่ที่บริเวณเร่งอย่างน้อย 1 กลุ่ม เอนไซม์ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ผลิตได้จากเชื้อรา แบ่งได้ 2 กลุ่มย่อยคือ กลุ่มที่มีสมบัติคล้ายเปปซิน (pepsin-like) ซึ่งผลิตได้จากราประเภท *Aspergillus* และ *Penicillium* นิยมใช้ในอุตสาหกรรมเนยแข็ง (กฤษณา โพธิสารัตนะ, 2535) และกลุ่มที่มีสมบัติคล้ายเรนนิน (rennin-like) ซึ่งผลิตได้จากราประเภท *Mucor* และ *Endothia* (เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ และพีรดา สิริจินตกานต์, 2530) นิยมใช้ในอุตสาหกรรมหมักซอส และปรับปรุงคุณภาพของแป้งที่ใช้ในการทำขนมปัง

2.3 การสกัดของเหลวด้วยของเหลว (liquid-liquid extraction)

การสกัดของเหลวด้วยของเหลวเป็นขั้นตอนสำคัญขั้นตอนหนึ่งในกระบวนการผลิตทางด้านวิศวกรรมเคมี พบมากในอุตสาหกรรมปิโตรเคมี อุตสาหกรรมสกัดโลหะจากแร่ อุตสาหกรรมเชื้อเพลิงนิวเคลียร์ นอกจากนี้ยังพบในอุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมอาหาร และ อุตสาหกรรมยาด้วย (วรวุฒิ อรรถยุกติ, 2526) การสกัดของเหลวด้วยของเหลวเป็นการสกัดสาร โดยอาศัยคุณสมบัติทางเคมีของสารในระบบ ใช้พลังงานน้อย จึงสามารถประหยัดพลังงานได้มาก โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ ซึ่งนิยมใช้การสกัดของเหลวด้วยของเหลวในกรณีที่วิธีการแยกโดยตรงทำได้แต่มีราคาแพงเกินไป หรือไม่สามารถแยกสารได้ด้วยวิธีการทั่ว ๆ ไป เช่น การกลั่น

การสกัดของเหลวด้วยของเหลวอย่างมีประสิทธิภาพนั้น นอกจากจะต้องออกแบบเครื่องมือที่ใช้ในการสกัดให้เหมาะสมแล้ว ยังต้องคำนึงถึงปัจจัยสำคัญต่าง ๆ ที่มีผลต่อการควบคุมการสกัดซึ่งได้แก่ ธรรมชาติการแยก (degree of separation), สัมประสิทธิ์การแยก (partition coefficient), การกระจายในแนวแกน (axial dispersion), hold-up, อัตราน้ำท่วม (flooding rate), การกระจายขนาดของหยด (droplet size distribution), การรวมตัวของหยดที่บริเวณอินเตอร์เฟซ (droplet coalescence at interfaces), ความสามารถในการกระจายตัว (polydispersivity) และการถ่ายเทมวล (mass transfer) ดังนั้นปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้จึงเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องทำการศึกษสำหรับการสกัดผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด เพื่อสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างเหมาะสมต่อไป

2.3.1 ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (Aqueous Two-Phase Systems, ATPS)

การแยกสารออกจากของผสมเนื้อเดียวกันอาจมีข้อจำกัดจากคุณสมบัติทางเคมี การสร้างวัฏภาคที่สอง ซึ่งไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกับวัฏภาคแรกจะสามารถแยกสารออกมาได้ เนื่องจากองค์ประกอบของสารในระบบมีค่าสัมประสิทธิ์ในการกระจาย (distribution coefficient) ระหว่างวัฏภาคทั้งสองต่างกัน การสกัดด้วยของเหลวจึงใช้แยกสารละลายที่มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันได้ โดยการเติมตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งไม่ผสมกันหรือแยกออกจากสารละลายชนิดแรกได้ และเกิดการกระจายขององค์ประกอบของของผสมระหว่างวัฏภาคทั้งสอง

ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (ATPS) เป็นระบบหนึ่งของการสกัดของเหลวด้วยของเหลวซึ่งเป็นที่รู้จักมาตั้งแต่ปี ค. ศ. 1896 เป็นระบบที่ใช้พอลิเมอร์ 2 ชนิดหรือพอลิเมอร์กับเกลือ ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ แต่ไม่ผสมกันเอง ทำให้ระบบที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลว 2 วัฏภาคแยกชั้นกันอยู่ โดยที่ในวัฏภาคหนึ่งจะมีพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งอยู่มาก ส่วนอีกวัฏภาคจะมีพอลิเมอร์อีกชนิดหนึ่งหรือเกลืออยู่มาก ซึ่งทั้งสองวัฏภาคนี้จะมีน้ำเป็นตัวทำละลาย ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคนี้สามารถจำแนกชนิดของระบบได้ตามลักษณะของสารที่ทำให้เกิดการแยกวัฏภาค ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (Aqueous Two-Phase Systems, ATPS)

(Zaslavsky, 1995)

1. Nonionic polymer (P) – Nonionic polymer (Q) - Water	
Polypropylene glycol	Methoxypolyethylene glycol Polyethylene glycol Polyvinyl alcohol Polyvinylpyrrolidone Hydroxypropyl dextran Dextran
Polyethylene glycol	Polyvinyl alcohol Polyvinylpyrrolidone Dextran Arabinogalactan Hydroxypropyl starch Ficoll
Polyvinyl alcohol	Methylcellulose Hydroxypropyl dextran Dextran
Polyvinylpyrrolidone	Methylcellulose Maltodextrin Dextran
Methylcellulose	Hydroxypropyl dextran Dextran

ตารางที่ 2.1 ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (ต่อ)

1. Nonionic polymer (P) – Nonionic polymer (Q) - Water	
Ethylhydroxyethylcellulose	Dextran
Hydroxypropylidextran	Dextran
Ficoll	Dextran
2. Polyelectrolyte (P) – Nonionic polymer (Q) - Water	
Sodium dextran sulphate	Polypropylene glycol Methoxypolyethylene glycol NaCl Polyethylene glycol NaCl Polyvinyl alcohol NaCl Polyvinylpyrrolidone NaCl Methylcellulose NaCl Ethylhydroxyethylcellulose NaCl Hydroxypropylidextran NaCl Dextran NaCl
DEAE dextran-hydrochloric acid	Polypropylene glycol NaCl Polyethylene glycol Li_2SO_4 Polyvinyl alcohol Methylcellulose
Casein	Dextran Pectin Ficoll Amylopectin
Sodium carboxymethylidextran	Methoxypolyethylene glycol NaCl Polyethylene glycol NaCl Polyvinyl alcohol NaCl Polyvinylpyrrolidone NaCl Methylcellulose NaCl Ethylhydroxyethylcellulose NaCl Hydroxypropylidextran NaCl

ตารางที่ 2.1 ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (ต่อ)

2. Polyelectrolyte (P) – Nonionic polymer (Q) - Water	
Sodium carboxymethylcellulose	Polypropylene glycol NaCl Methoxypolyethylene glycol NaCl Polyethylene glycol NaCl Polyvinyl alcohol NaCl Polyvinylpyrrolidone NaCl Methylcellulose NaCl Ethylhydroxyethylcellulose NaCl Hydroxypropylidextran NaCl
3. Polyelectrolyte (P) – Polyelectrolyte (Q) – Water	
Sodium dextran sulphate Sodium carboxymethylidextran Casein Ovalbumin (pH 6.6)	DEAE dextran-hydrochloric acid NaCl Sodium carboxymethylidextran Sodium carboxymethylcellulose Sodium carboxymethylcellulose Sodium alginate , 0.1 M NaOH Sodium carboxymethylcellulose, 0.1 M NaOH Soybean globulins Ovalbumin thermotropic aggregates Casein
4. Polymer (P) – Low Molecular Weight Component (Q) – Water	
Polypropylene glycol Methoxypolyethylene glycol Polyethylene glycol	Potassium phosphate Glycerol Glucose Potassium phosphate Inorganic salts, e.g., K^+ (Na^+ , Li^+ , $(NH_4)^+$, etc.) PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , etc. Glucose, maltose, cellobiose, iso-maltose, maltotriose, iso-maltotriose, β -cyclodextrin

ตารางที่ 2.1 ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (ต่อ)

4. Polymer (P) – Low Molecular Weight Component (Q) – Water	
Polyvinylpyrrolidone	Butylcellosolve
	Potassium phosphate
Polyvinyl alcohol	Butylcellosolve
Dextran	Butylcellosolve
	Propyl alcohol, Iso-propyl alcohol
Sodium dextran sulphate	Sodium chloride (0 °C)

2.3.2 แผนภาพวัฏภาค (phase diagrams)

องค์ประกอบของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค แสดงได้ในแผนภาพวัฏภาครูปสามเหลี่ยม (รูปที่ 2.1) เมื่อจุดปลายของสามเหลี่ยมในแผนภาพวัฏภาคนั้นคือ พอลิเมอร์ทั้งสองชนิด (Ficoll และเด็กซ์แทรน) และตัวทำละลาย (น้ำ) จุดต่าง ๆ ที่อยู่ภายในพื้นที่สามเหลี่ยมจะแสดงถึงของผสม 3 องค์ประกอบ ซึ่งผลบวกขององค์ประกอบในแต่ละจุดที่แสดงในแผนภาพวัฏภาคนี้จะมีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์เสมอ โดยทั่วไปแล้วองค์ประกอบดังกล่าวจะแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

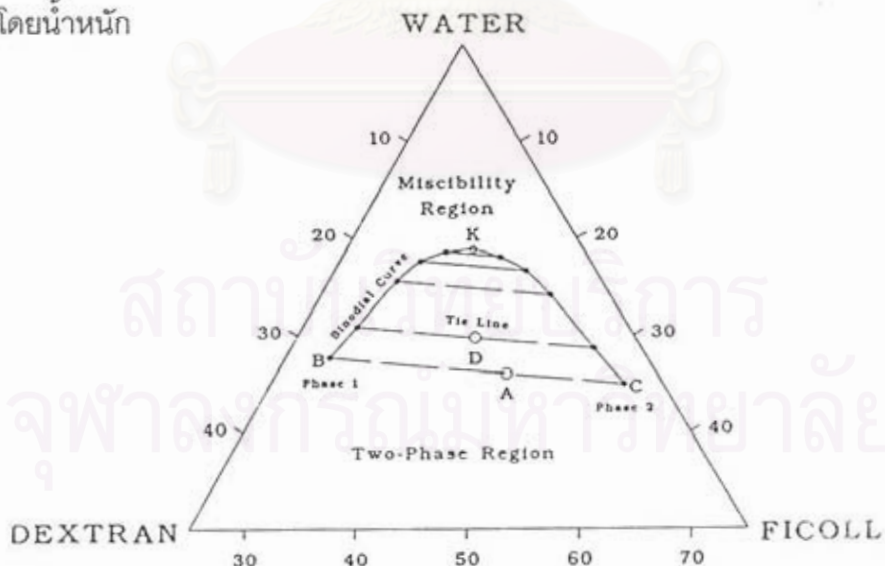


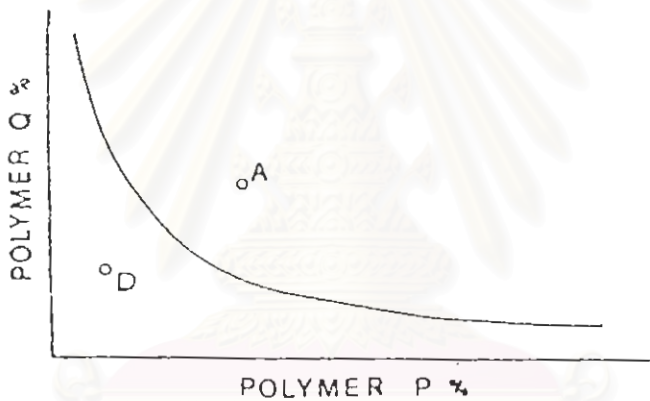
Figure 3.1. Triangular phase diagram for dextran-70 — Ficoll-400 — water system.

รูปที่ 2.1 แผนภาพวัฏภาครูปสามเหลี่ยมของระบบ dextran70 / Ficoll400 / น้ำ

(Zaslavsky, 1995)

การเขียนแผนภาพวิภูภาคในลักษณะที่เป็นแกนมุมฉากจะนิยมใช้มากกว่าแผนภาพวิภูภาครูปสามเหลี่ยม โดยที่แกน y (แนวตั้ง) แสดงเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของพอลิเมอร์ที่มีมากในวิภูภาคบน ส่วนแกน x (แนวนอน) แสดงเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของพอลิเมอร์อีกชนิดหนึ่งหรือเกลือที่มีมากในวิภูภาคล่าง ความแตกต่างของแผนภาพวิภูภาครูปสามเหลี่ยมกับแผนภาพวิภูภาคที่เป็นแกนมุมฉาก คือ การละเลยความเข้มข้นของตัวทำละลาย (น้ำ) ที่แสดงในแผนภาพวิภูภาคที่เป็นแกนมุมฉาก

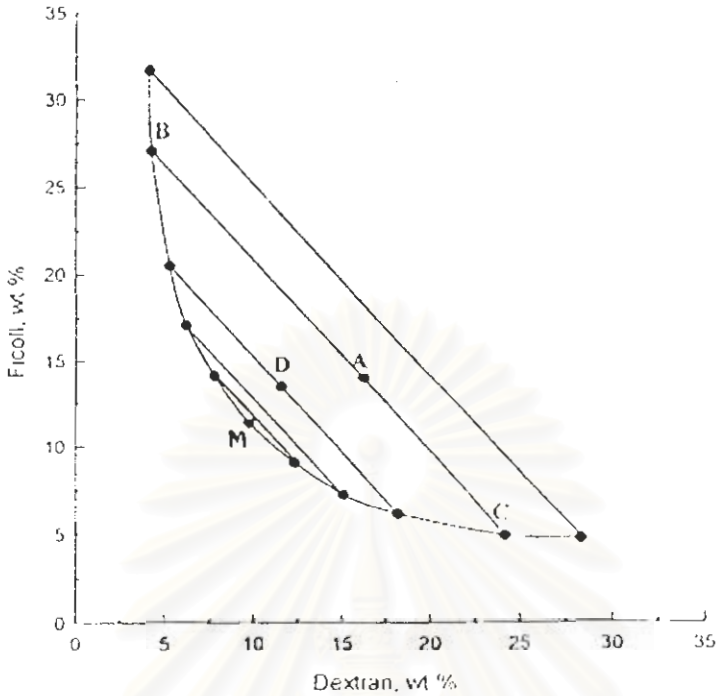
เมื่อผสมพอลิเมอร์ที่ละลายในน้ำกับพอลิเมอร์อีกชนิดหนึ่งหรือเกลือ องค์ประกอบของสารในแต่ละวิภูภาคและช่วงของความเข้มข้นของสารทั้งสองชนิดที่ทำให้เกิดการแยกวิภูภาคสามารถอธิบายได้จากแผนภาพวิภูภาคดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แผนภาพวิภูภาคของการผสมพอลิเมอร์ P และ Q ในน้ำ

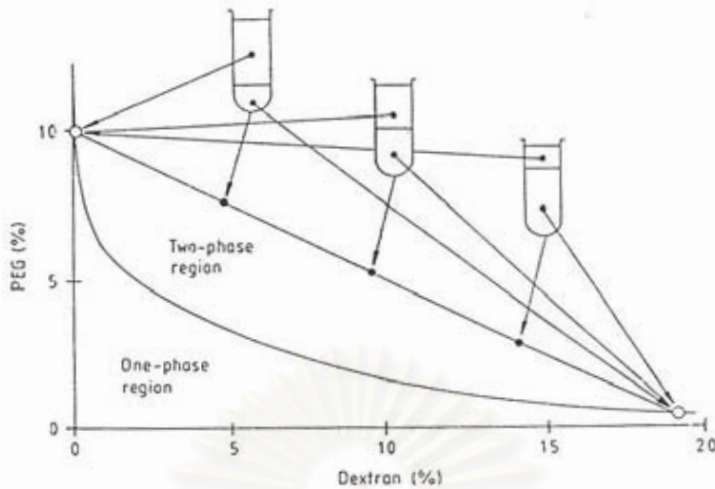
(Cabral และ Aires-Barros, 1993)

เมื่อผสมพอลิเมอร์ P และ Q ในน้ำ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จะได้กราฟเส้นโค้งดังแสดงในรูปที่ 2.2 เรียกเส้นโค้งนี้ว่า "เส้นแบ่งวิภูภาค" (binodal curve) โดยที่เส้นโค้งดังกล่าวจะเป็นเส้นแบ่งลักษณะของวิภูภาคที่เกิดขึ้นในระบบ ถ้าสารละลายผสมนี้มีองค์ประกอบอยู่เหนือเส้นโค้ง (จุด A) ระบบนี้จะมีลักษณะเป็นของเหลว 2 วิภูภาค ในขณะที่จุด D ซึ่งม้องค์ประกอบของสารละลายผสมอยู่ใต้เส้นโค้ง จะมีลักษณะเป็นของเหลววิภูภาคเดียว



รูปที่ 2.3 แผนภาพวิภาคของระบบที่มีองค์ประกอบของ Dextran70 / Ficoll400 / น้ำ ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส (Zaslavsky, 1995)

รูปที่ 2.3 แสดงแผนภาพวิภาคของ Dextran70 / Ficoll400 / น้ำ ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส ในวิภาคบนจะมีความเข้มข้นของ Ficoll อยู่มาก ส่วนเด็กซ์แทรนจะสะสมอยู่ในวิภาคล่าง ซึ่งสารละลายผสม A จะมีองค์ประกอบของวิภาคบนเหมือนองค์ประกอบในจุด B และในวิภาคล่างจะมีองค์ประกอบเหมือนองค์ประกอบในจุด C เมื่อเรียกจุด B และ C ว่า “nodes” เส้นที่เชื่อมระหว่างจุดทั้งสองนี้ คือ “เส้นผูก” (tie line) สารละลายผสมที่แสดงบนเส้นผูกเดียวกัน จะมีองค์ประกอบในแต่ละวิภาคเหมือนกัน แต่สัดส่วนของปริมาตรในวิภาคบนต่อปริมาตรในวิภาคล่าง (V_u/V_b) จะแตกต่างกันดังรูปที่ 2.4 โดยที่สัดส่วนของปริมาตรดังกล่าวจะมีความสัมพันธ์กับสัดส่วนของเส้นตรง AC/AB



รูปที่ 2.4 แผนภาพวิภาคของระบบที่มีองค์ประกอบของ PEG8000 / เดกซ์แทรน 500 / น้ำ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส (Johansson, 1992)

การหาความยาวของเส้นผูก (tie line length, TLL) สามารถหาค่าได้โดยการคำนวณจากความเข้มข้นของพอลิเมอร์หรือเกลือที่มีในแต่ละวิภาค ดังนี้

$$\begin{aligned} \text{TLL} &= \{[C(P)_1 - C(P)_2]^2 + [C(Q)_1 - C(Q)_2]^2\}^{0.5} \\ &= \{[\Delta C(P)]^2 + [\Delta C(Q)]^2\}^{0.5} \end{aligned} \quad (2.2)$$

เมื่อ $C(P)$ คือ ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ P ในวิภาคนั้น ๆ

$C(Q)$ คือ ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ Q ในวิภาคนั้น ๆ

ตัวห้อย 1 และ 2 คือ วิภาคบนและล่าง ตามลำดับ

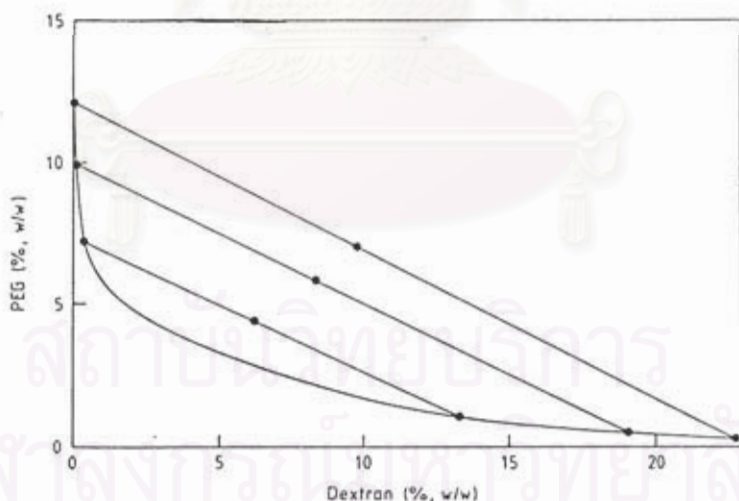
$\Delta C(P)$ และ $\Delta C(Q)$ คือ ความแตกต่างของความเข้มข้นของพอลิเมอร์ P

และ Q ในวิภาคทั้งสอง

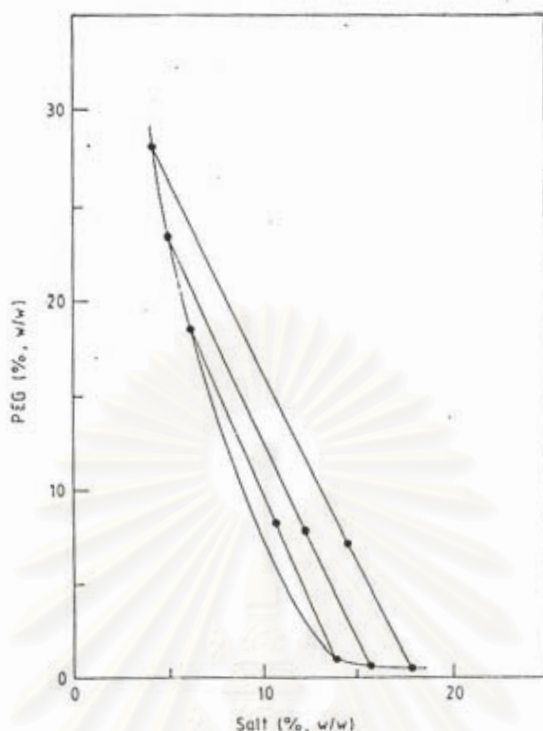
จุด M ในรูปที่ 2.3 เรียกว่า "จุดวิกฤต" (critical point) ซึ่งมีองค์ประกอบและปริมาณของทั้งสองวิภาคไม่แตกต่างกัน สำหรับองค์ประกอบของระบบที่มีค่าใกล้จุด M จะมีความแตกต่างระหว่างวิภาคทั้งสองน้อยมาก

การเกิดระบบสารละลายน้ำสองวิภาคโดยทั่วไปนิยมใช้ PEG เป็นองค์ประกอบสำคัญ (Tjerneld, 1992) ซึ่งพอลิเมอร์ชนิดอื่นหรือเกลือที่นิยมใช้กับ PEG นี้มีหลายชนิดด้วยกัน แต่ใน

กระบวนการแยกสารทางชีวภาพ นิยมใช้ระบบที่มี PEG กับเด็กซ์แทรนเป็นองค์ประกอบ (Johansson, 1992) โดยในวัฏภาคบนมี PEG อยู่ในปริมาณมาก ในขณะที่วัฏภาคล่างจะมีเด็กซ์แทรนในปริมาณมาก และมีน้ำเป็นองค์ประกอบหลักในทั้งสองวัฏภาค (มากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์) (Kula และคณะ, 1982) แต่ในระดับอุตสาหกรรม การใช้เด็กซ์แทรนบริสุทธิ์มีราคาแพง อาจใช้ครูดเด็กซ์แทรน (crude dextran) หรือ ไฮโดรไลส์ เด็กซ์แทรน (hydrolysed dextran) แทนได้ ซึ่งให้ผลต่อระบบใกล้เคียงกับการใช้เด็กซ์แทรนบริสุทธิ์ (Cabral และ Aires-Barros, 1993) นอกจากนี้การใช้เด็กซ์แทรนจะทำให้วัฏภาคล่างมีความหนืดค่อนข้างสูง ซึ่งอาจเกิดเป็นเจล (gel) ทำให้ยากต่อการผลิต ดังนั้นระบบที่ใช้ PEG กับเกลือ จึงเป็นระบบที่มีการพัฒนาเพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป เนื่องจากเกิดการแยกวัฏภาคได้ง่ายกว่าระบบของ PEG กับเด็กซ์แทรน ดังแสดงในแผนภาพวัฏภาคของ PEG กับเด็กซ์แทรน และ PEG กับเกลือ ในรูปที่ 2.5 และ 2.6 ตามลำดับ ในระบบของ PEG กับเกลือจะมี PEG ปริมาณมากเกือบทั้งหมดในวัฏภาคบน และเกลือจะมีมากในวัฏภาคล่าง อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของเกลือก็ยังคงสูงในทั้งสองวัฏภาค โดยเกลือที่เหมาะสมต่อการเกิดการแยกวัฏภาคกับ PEG ได้แก่ เกลือฟอสเฟตและเกลือซัลเฟต (Tjerneld, 1992)



รูปที่ 2.5 แผนภาพวัฏภาคของระบบที่มีองค์ประกอบของ PEG 8000 / เด็กซ์แทรน T-500 (น้ำหนักโมเลกุล 500,000) / น้ำ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส (Tjerneld, 1992)



รูปที่ 2.6 แผนภาพวัฏภาคของระบบที่มีองค์ประกอบของ PEG 8000 / โพลแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยโพลแทสเซียมฟอสเฟตเป็นสารผสมระหว่างไดโพลแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 306.9 กรัม กับโพลแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 168.6 กรัม (Tjerneld, 1992)

2.3.3 สัมประสิทธิ์การแยก (partition coefficients, K)

สัมประสิทธิ์การแยก (K) เป็นค่าสัมประสิทธิ์ที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการแยกสารที่ต้องการของระบบ โดยที่

$$K = \frac{C_T}{C_B} \quad (2.3)$$

เมื่อ C_T และ C_B คือ ความเข้มข้นสมดุลของตัวถูกละลายหรือสารที่ต้องการ (เอนไซม์) ที่มีในวัฏภาคบนและล่างตามลำดับ

โดยปกติการแยกโปรตีนหรือเอนไซม์ออกจากน้ำหมัก ซึ่งมีเซลล์หรือชิ้นส่วนของเซลล์ผสมอยู่ด้วย ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคสามารถแยกเซลล์ทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตไปอยู่ในวัฏภาคล่าง ซึ่งมีความเข้มข้นของพอลิเมอร์หรือเกลือ Q อยู่มาก ส่วนโปรตีนหรือเอนไซม์ที่ต้องการจะอยู่ในวัฏภาคบน ดังนั้น ค่า K จึงสามารถบอกถึงประสิทธิภาพในการแยกเอนไซม์ออกจากน้ำหมักได้ เมื่อ K มีค่าสูง นั่นคือ ระบบสามารถแยกเอนไซม์ไปอยู่ในวัฏภาคบนได้มากกว่าวัฏภาคล่าง ทำให้ระบบนั้นมีประสิทธิภาพในการสกัดสูงด้วย

นอกจากนี้ การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ยังต้องการให้ได้เปอร์เซ็นต์ผลได้ (% yield) ที่มีค่าสูงด้วย เมื่อ

$$\text{ผลได้} = \frac{\text{น้ำหนักของเอนไซม์ในวัฏภาคบน}}{\text{น้ำหนักของเอนไซม์ทั้งหมดที่มีในระบบ}} \quad (2.4)$$

โดยที่เปอร์เซ็นต์ผลได้มีความสัมพันธ์กับค่า K ดังนี้

$$\% \text{Yield} = \frac{100}{1 + \left[\frac{V_B}{V_T} \cdot \frac{1}{K} \right]} \quad (2.5)$$

เมื่อ V_T และ V_B คือ ปริมาตรของวัฏภาคบนและล่างตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ตรวจเอกสาร

3.1 บทนำ

ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคสำหรับการสกัดสารทางชีวภาพ มีการพัฒนาอย่างกว้างขวางเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมแต่ละประเภทได้อย่างเหมาะสม ในงานวิจัยนี้จำเป็นต้องมีข้อมูลต่าง ๆ เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาต่อไป ในบทนี้จะกล่าวถึงกระบวนการสกัดสารทางชีวภาพและปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก (partition coefficient) ซึ่งเป็นพารามิเตอร์สำคัญที่แสดงถึงประสิทธิภาพของระบบ

3.2 กระบวนการสกัดสารทางชีวภาพ

หลังจากผ่านกระบวนการผลิตเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการแล้ว กระบวนการหลังการผลิตซึ่งเป็นขั้นตอนในการแยกผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ และทำให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากค่าใช้จ่ายในขั้นตอนนี้สูงถึง 60 เปอร์เซ็นต์ของค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการผลิตทั้งหมด (Cliffe, 1988) ดังนั้นจึงมีงานวิจัยค่อนข้างมากที่ศึกษากระบวนการสกัดสารทางชีวภาพเพื่อให้เหมาะสมต่อการสกัดสารแต่ละชนิด

กระบวนการหลังการผลิตโดยทั่วไปมีขั้นตอนต่าง ๆ ที่สำคัญตั้งแต่การทำให้เซลล์แตกสำหรับผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในเซลล์ จนถึงการแยกผลิตภัณฑ์ที่ต้องการออกมาและทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งวิธีการที่เลือกใช้เพื่อให้เหมาะสมกับชนิดของผลิตภัณฑ์ ต้องคำนึงถึงคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์เป็นสำคัญ เช่น ในการสกัดเอนไซม์หรือโปรตีน ต้องคำนึงถึงความเสถียรของเอนไซม์หรือโปรตีนชนิดนั้น รวมถึงการสกัดด้วยวิธีการต่าง ๆ ที่ใช้ร่วมกันว่ามีความเหมาะสมมากน้อยเพียงใด เนื่องจากโพรทีเอสหลายชนิดจะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเมื่อใช้วิธีการสกัดต่าง ๆ ร่วมกัน (Beynon และ Bond, 1990)

กระบวนการทั่วไปที่ใช้ในการสกัดสารทางชีวภาพมีดังนี้

3.2.1 การหมุนเหวี่ยง (centrifugation) นิยมใช้เมื่อมีผลิตภัณฑ์ในปริมาณมาก เช่น การสกัดยีสต์จากน้ำหมักในอุตสาหกรรมเบียร์ (Cliffe, 1988)

3.2.2 การกรอง (filtration) นิยมใช้อย่างกว้างขวางและเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไป พบมากในอุตสาหกรรมยาและอาหาร ซึ่งรวมถึงการกรองผ่านเยื่อแผ่นเช่น ไมโครฟิลเตรชัน, อัลตราฟิลเตรชัน และ รีเวิร์สออสโมซิส

3.2.3 การตกตะกอนโปรตีน (protein precipitation) พบมากในอุตสาหกรรมขนาดเล็ก และมีการพัฒนาเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมใหญ่ ซึ่งการตกตะกอนโปรตีนมีหลายวิธี ขึ้นกับสารเคมีที่ใช้ในการตกตะกอน ดังนี้

3.2.3.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือ นิยมใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และ เกลือโซเดียมซัลเฟต

3.2.3.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ นิยมใช้เมทานอล, เอทานอล, ไอโซโพรพานอล และอะซิโตน

3.2.3.3 การตกตะกอนโปรตีนที่จุดไอโซอิเล็กตริก ไม่ค่อยพบในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่

3.2.3.4 การตกตะกอนโปรตีนด้วยนอน-ไอออนิก พอลิเมอร์ โดยเติมพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น โพลีเอทิลีนไกลคอล, โพลีไวนิลแอลกอฮอล์, เมทิลเซลลูโลส หรือเด็กซ์-แทรน ลงในสารละลายน้ำที่มีโปรตีนอยู่ ซึ่งจะเกิดการแยกเป็น 2 ชั้น เช่นเดียวกับระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

3.2.3.5 การตกตะกอนโปรตีนด้วยสารโพลีอิเล็กโทรไลต์ นิยมใช้กรดโพลีอะคริลิก, อะซิติก โพลีแซกคาไรด์ และโพลีฟอสเฟต เพื่อทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ในอุตสาหกรรมขนาดเล็ก แต่ยังไม่พบในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่

3.2.4 โครมาโตกราฟี (chromatography) สารละลายที่ใช้แยกโดยวิธีนี้ต้องไม่มีชิ้นส่วนของเซลล์ปนอยู่ และควรมีโปรตีนอยู่ในช่วง 5-7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร วิธีโครมาโตกราฟีที่พบในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่มี 4 วิธีคือ

3.2.4.1 ไอออน-เอ็กซ์เชนจ์ โครมาโตกราฟี (Ion-Exchange Chromatography)

3.2.4.2 อะฟิไนตี โครมาโตกราฟี (Affinity Chromatography)

3.2.4.3 เจล-ฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟี (Gel-Filtration Chromatography)

3.2.4.4 ไฮเพอร์ฟอแมนส์ ลิควิด โครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

โดยที่ไอออน-เอ็กซ์เชนจ์ โครมาโตกราฟี นิยมใช้ทั่วไปในขั้นตอนแรกของการสกัด เนื่องจากใช้กับสารละลายโปรตีนในปริมาณมาก ส่วนอะฟิไนตี โครมาโตกราฟีใช้ในกระบวนการขั้นต่อไป ซึ่งมีความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์น้อยในสารละลายที่มีสารปนเปื้อนอยู่อีกหลายชนิด ในขณะที่เจล-ฟิลเตรชันและไฮเพอร์ฟอแมนส์ ลิควิด โครมาโตกราฟี นิยมใช้ในขั้นตอนสุดท้ายของการทำให้บริสุทธิ์ เมื่อมีสารปนเปื้อนและปริมาณของสารละลายค่อนข้างน้อย

ได้มีผู้ศึกษาการสกัดโปรตีนด้วยวิธีการต่าง ๆ สรุปได้ในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 การสกัดโปรตีนด้วยวิธีการต่าง ๆ

วิธีการ	ชนิดของโปรตีน	เอกสารอ้างอิง
กรองแบบ cross flow ultrafiltration	- แอลคาไลน์โปรตีน จาก <i>B. licheniformis</i>	- TaKac และคณะ, 2000
ตกผลึก (crystallization)	- แอลคาไลน์โปรตีน	- Park, Lee, H.J. และ Lee, E.K., 1997
ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค	- แอลคาไลน์โปรตีน จาก <i>B. licheniformis</i> - แอลคาไลน์โปรตีน จาก <i>Bacillus sp.</i> - แอลคาไลน์โปรตีน จาก <i>B. thuringiensis</i> H 14	- Lee และ Chang, 1990 - Sinha และคณะ, 1996 - Hotha และ Banik, 1997

ตารางที่ 3.1 การสกัดโพรทีเอสด้วยวิธีการต่าง ๆ (ต่อ)

วิธีการ	ชนิดของโพรทีเอส	เอกสารอ้างอิง
<p>โครมาโตกราฟี</p> <p>- HPLC ซึ่งใช้คอลัมน์แอนไอออน เอกซ์เชนจ์และเจลฟิลเตรชัน</p> <p>- ไอออนเอกซ์เชนจ์และเจลฟิลเตรชัน</p> <p>ใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟีร่วมกันคือ</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. ซีเอ็ม-เซฟาโรส ซีแอล-6บี 2. ดีอีเออี-เซฟาโรส 3. เซฟาเด็กซ์ จี-75 	<p>- เมทัลโลโพรทีเอส</p> <p>- โพรทีเอส จาก <i>Serratia marcescens</i> AP 3801</p> <p>- ซีพี-70 โพรทีเอส</p> <p>- แอลคาไลน์โพรทีเอส จาก <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MN 1</p> <p>- โพรทีเอส ซีเค7-1</p> <p>- โพรทีเอส ซีเค7-2</p>	<p>- Rodier และคณะ, 1997</p> <p>- Morita, Kondoh และคณะ, 1997</p> <p>- Morita, Hasan และคณะ, 1998</p> <p>- Bayoudh และคณะ, 2000</p> <p>- Lee, Park และ Hyun, 2000</p>
<p>ตกตะกอนร่วมกับโครมาโตกราฟี</p> <p>- 1. ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต</p> <p>2. เจลฟิลเตรชันผ่านเซฟาเด็กซ์ จี-100</p> <p>3. ดีอีเออี-เซลลูโลส</p> <p>- 1. ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต</p> <p>2. เจลฟิลเตรชันผ่านเซฟาเด็กซ์ จี-75</p> <p>3. อะฟินิตี โครมาโตกราฟี</p> <p>- 1. ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต</p> <p>2. ดีอีเออี-เซลลูโลส</p> <p>3. อัลฟา-เคซีน อะกาโรส</p>	<p>- โพรทีเอส จาก ปานศรนารายณ์</p> <p>- โพรทีเอส จาก <i>Scedosporium apiospermum</i></p> <p>- แอลคาไลน์โพรทีเอส จาก <i>Bacillus sp.</i> PS 719</p>	<p>- สมบัติ คงวิทยา, 2541</p> <p>- Larcher และคณะ, 1996</p> <p>- Hutadilok-Tawatana, Painupong และ Suntainalert, 1999</p>

จากตารางที่ 3.1 พบว่าวิธีการที่ใช้ในการสกัดโปรตีนเอสมีหลายวิธีด้วยกัน การเลือกใช้วิธีการต่าง ๆ ให้เหมาะสมต้องทราบถึงข้อดี-ข้อเสียและความเป็นไปได้ในระดับอุตสาหกรรม การหมวนเหวี่ยงมีข้อเสียคือ อุณหภูมิของระบบจะสูงขึ้นเมื่อใช้แรงในการหมวนสูง ซึ่งมีผลต่อผลิตภัณฑ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงต่ออุณหภูมิได้ง่าย, การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต นิยมใช้ในระดับห้องปฏิบัติการ แต่ในระดับอุตสาหกรรมมักพบปัญหาในการกำจัดเกลือออกจากโปรตีนที่ตกตะกอนได้ ในขณะที่การใช้โซเดียมซัลเฟตต้องใช้ที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส เพื่อให้แน่ใจว่าจะเกิดการละลายได้อย่างเหมาะสม สำหรับการใส่สารโพลีอิเล็กโทรไลต์ในการตกตะกอนโปรตีน มักพบปัญหาเรื่องราคาของสารโพลีอิเล็กโทรไลต์และการขยายระดับ (scale up) ซึ่งเมื่อขนาดของหน่วยผลิตใหญ่ขึ้น เวลาที่ใช้ในการตกตะกอนจะมากขึ้น ทำให้เกิดการตกตะกอนโปรตีนทั้งที่ต้องการและไม่ต้องการ สำหรับวิธีโครมาโตกราฟีมีข้อจำกัดเรื่องราคาของเจลที่ใช้ ซึ่งทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีราคาสูง นอกจากนี้สารที่แยกได้ยากทำให้ต้องใช้คอลัมน์ที่มีขนาดยาวมาก และการขยายระดับสำหรับโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ก็เป็นปัญหาสำคัญ การใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในการสกัดโปรตีนเอส จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากสามารถแยกสารปนเปื้อนออกจากเอนไซม์ได้ง่าย, ทำได้ที่อุณหภูมิห้อง รวมถึงองค์ประกอบหลักของระบบคือน้ำ ซึ่งไม่ทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ ทั้งยังขยายระดับสู่อุตสาหกรรมได้ง่าย โดยให้ผลได้ (yield) ในทั้งสองระดับใกล้เคียงกัน แม้แฟคเตอร์ในการขยายระดับสูงถึง 40,000 (Cabral และ Aires-Barros, 1993) และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่นที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์แล้ว ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคให้ค่า capacity, throughput และผลได้สูงสุด ในขณะที่ค่าใช้จ่ายด้านแรงงานและพลังงานมีค่าต่ำสุด (Tjerneld, 1992) โดย Sebastiao, Cabral และ Aires-Barros (1996) พบว่าการใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของโพลีเอทิลีนไกลคอล น้ำหนักโมเลกุล 1000 ปริมาณ 25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักและโซเดียมฟอสเฟต 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเท่ากับ 4.8 เพียงขั้นตอนเดียว จะให้ผลได้ 91 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้วิธีสกัดหลายขั้นตอนร่วมกัน คือ การทำให้เซลล์แตกเนื่องจากแรงดันน้ำ (osmotic shock), การตกตะกอนด้วยกรดและวิธีโครมาโตกราฟี จะให้ผลได้เพียง 77 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งองค์ประกอบของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่นิยมใช้ในการสกัดเอนไซม์, โปรตีนชนิดต่าง ๆ รวมถึงผลิตภัณฑ์อื่น ๆ แสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ใช้ในการสกัดผลิตภัณฑ์

องค์ประกอบของระบบ	ชนิดของผลิตภัณฑ์	เอกสารอ้างอิง
1. พอลิเมอร์ / พอลิเมอร์ / น้ำ Polyethylene glycol / Dextran / Water	<ul style="list-style-type: none"> - pullulanase from <i>Klebsiella pneumoniae</i> - alkaline protease from <i>B. licheniformis</i> - lysozyme, transferrin, albumin, catalase และ chymotrypsinogen A - pristinamycins - phosphofructokinase - phosphomonoesterases - Polymerase chain reaction Inhibitory substances - α-amylase 	<ul style="list-style-type: none"> - Kroner, Hustedt และ Kula, 1982 - Lee และ Chang, 1990 - Forciniti, Hall และ Kula, 1991 - Paquet และคณะ, 1994 - Grimonprez และ Johansson, 1995 - Ilieva และ คณะ, 1996 - Lantz และคณะ, 1996 - Liakopoulou-Kyriakides, Karakatsanis และ Stamatoudis, 1996
Polyethylene glycol / Crude dextran / Water	<ul style="list-style-type: none"> - α-amylase และ glucoamylase 	<ul style="list-style-type: none"> - Larsson, Arasa-ratnam และ Mattiasson, 1988
Polyethylene glycol / Hydroxypropyl starch / Water	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Lactobacillus</i>, <i>Lactococcus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Planas, Radstrom และคณะ, 1996
Poly (ethyleneimine) / Hydroxyethyl cellulose / Water	<ul style="list-style-type: none"> - Lactic acid 	<ul style="list-style-type: none"> - Kwon, Kaul และ Mattiasson, 1996
(Ethyl oxide / Propylene oxide, EOPO) / Hydroxypropyl starch / Water	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Lactobacillus</i>, <i>Lactococcus</i> - Amino acids 	<ul style="list-style-type: none"> - Planas, Radstrom และคณะ, 1996 - Li, Zhu และ Mei, 1997
EOPO / Benzoyl dextran / Water	<ul style="list-style-type: none"> - 3-Phosphoglycerate kinase 	<ul style="list-style-type: none"> - Lu และคณะ, 1996

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ใช้ในการสกัดผลิตภัณฑ์ (ต่อ)

องค์ประกอบของระบบ	ชนิดของผลิตภัณฑ์	เอกสารอ้างอิง
1. พอลิเมอร์ / พอลิเมอร์ / น้ำ EOPO / Dextran / Water	- Lactic acid	- Planas, Lefebver และคณะ, 1997
2. พอลิเมอร์ / เกลือ / น้ำ Polyethylene glycol / Potassium phosphate / Water	- <i>Brevibacterium ammoniagenes</i> - Fumarase - Cytochrome b ₅ - Clavulanic acid - Alkaline protease from <i>Bacillus sp.</i> - Alkaline protease from <i>B. thuringiensis</i> H 14 - Alkaline xylanases - Xylanase	- Hustedt, 1986 - Papamichael, Borner และ Hustedt, 1991 - Sarmento และคณะ, 1994 - Videira และ Aires-Barros, 1994 - Sinha และคณะ, 1996 - Hotha และ Banik, 1997 - Duarte และคณะ, 1999 - Jain และ Johri, 1999
Polyethylene glycol / Sodium phosphate / Water	- Amyloglucosidase	- Tanuja และคณะ, 1997
Polyethylene glycol / (Potassium / Sodium phosphate) / Water	- Cutinase - α -amylase from <i>B. subtilis</i> - amyloglucosidase, subtilisin, และ trypsin inhibitor - Cutinase	- Sebastiao, Cabral และ Aires-Barros, 1993 - Mistry และคณะ, 1996 - Schmidt, Andrews และ Asenjo, 1996 - Sebastiao, Martel และคณะ, 1997

ตารางที่ 3.2 องค์ประกอบของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ใช้ในการสกัดผลิตภัณฑ์ (ต่อ)

องค์ประกอบของระบบ	ชนิดของผลิตภัณฑ์	เอกสารอ้างอิง
2. พอลิเมอร์ / เกลือ / น้ำ Polyethylene glycol / Ammonium sulphate / Water	- Cephalosporin C - alcohol dehydrogenase และ human tumous necrosis factor alpha (α -TNF)	- Yang และคณะ, 1994 - Su และ Feng, 1999
Polyethylene glycol / Magnesium sulphate / Water	- soluble proteins from <i>Escherichia coli</i>	- Kaul และ Asenjo, 1994
Polyethylene glycol / Sodium sulphate / Water	- Amyloglucosidase และ β -galactosidase	- Pawar และคณะ, 1997

จากตารางที่ 3.2 พบว่าองค์ประกอบของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคสำหรับการสกัดผลิตภัณฑ์มีการศึกษากันมากใน 2 ระบบ คือระบบที่ประกอบด้วยโพลีเอทิลีนไกลคอลกับเด็กซ์แทรน และระบบที่ประกอบด้วยโพลีเอทิลีนไกลคอลกับโพแทสเซียมฟอสเฟต ซึ่งในระดับห้องปฏิบัติการนิยมใช้ระบบที่ประกอบด้วยโพลีเอทิลีนไกลคอลกับเด็กซ์แทรน แต่ระบบดังกล่าวเมื่อขยายระดับสู่อุตสาหกรรม จะมีค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากเด็กซ์แทรนมีราคาแพง (Kroner, Hustedt และ Kula, 1982) อาจใช้ครูด เด็กซ์แทรน (crude dextran), ไฮโดรไลส์ ครูด เด็กซ์แทรนหรือไฮดรอกซีโพรพิล สตารซ์แทนในระดับอุตสาหกรรมได้ (Cabral และ Aires-Barros, 1993) แต่ยังพบปัญหาจากความหนืดเนื่องมาจากเด็กซ์แทรน ซึ่งมีค่าคั่นข้างสูงและอาจเกิดเป็นเจลได้ ทำให้ไม่เหมาะสมต่อการสกัด สำหรับระบบที่ประกอบด้วยโพลีเอทิลีนไกลคอลกับโพแทสเซียมฟอสเฟต นิยมใช้ในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ เนื่องจากสารที่ใช้มีราคาถูก สามารถเกิดการแยกเป็นสองวัฏภาคได้ง่ายและเร็วกว่าระบบที่ใช้เด็กซ์แทรน (Kroner, Hustedt และ Kula, 1982; Tjerneld, Johansson และ Joelsson, 1987; Cabral และ Aires-Barros, 1993) ในงานวิจัยนี้จึงเลือกศึกษาระบบที่มีองค์ประกอบของโพลีเอทิลีนไกลคอลกับโพแทสเซียมฟอสเฟต เพื่อเป็นแนวทางที่จะใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมต่อไปได้

3.3 ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก

ค่าสัมประสิทธิ์การแยก (partition coefficient, K) เป็นพารามิเตอร์สำคัญที่แสดงถึงประสิทธิภาพในการสกัดโมเลกุลของเอนไซม์ หรือโปรตีนที่ต้องการในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ปัจจัยที่มีผลต่อค่าดังกล่าวจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่กำหนดความเหมาะสมของการแยกในระบบได้ ซึ่งอธิบายได้จากสมการของ Bronstedt (Kula, Kroner และ Hustedt, 1982; Cabral และ Aires-Barros, 1993) ดังนี้

$$K = e^{(\lambda M/kT)} \quad (3.1)$$

เมื่อ K	คือ	สัมประสิทธิ์การแยก
λ	คือ	ปัจจัยกำหนดลักษณะของวัฏภาคและปฏิสัมพันธ์ต่อองค์ประกอบของโปรตีน
M	คือ	น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน
k	คือ	ค่าคงที่ Boltzmann
T	คือ	อุณหภูมิสัมบูรณ์

สัมประสิทธิ์การแยกขึ้นกับปัจจัยหลายชนิด สำหรับปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกที่จะกล่าวถึงนี้เป็นเพียงส่วนหนึ่งเท่านั้น และปัจจัยดังกล่าวยังมีความเกี่ยวเนื่องกัน จึงเป็นการยากในการคำนวณหรือทำนายค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์ หรือโปรตีนแต่ละชนิดในระบบ การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกหาได้จากการทดลองเท่านั้น ซึ่งปัจจัยสำคัญที่ควรพิจารณาในการทดลองมีดังนี้

3.3.1 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์หรือโปรตีนที่ต้องการ

Forciniti, Hall และ Kula (1991) ศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก โดยโปรตีนที่ทำการศึกษา มี 5 ชนิด และมีน้ำหนักโมเลกุลแสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนชนิดต่าง ๆ (Forciniti, Hall และ Kula, 1991)

ชนิดของโปรตีน	น้ำหนักโมเลกุล ($\times 10^4$)
Lysozyme	1.32
Chymotrypsinogen A	2.32
Bovine Serum Albumin	6.50
Transferrin	7.30
Catalase	25.0

โดยผลของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก แสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 ผลของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก (Forciniti, Hall และ Kula, 1991)

ระบบ	PEG (%w/w)		เด็กซ์แทรน (%w/w)		ค่าสัมประสิทธิ์การแยก				
	บน	ล่าง	บน	ล่าง	Lys.	Chym.	Alb.	Trans.	Cat.
PEG10000 / เด็กซ์แทรน 500000	7.0	0.7	0.4	14.1	0.69	1.64	0.37	0.23	0.037
	8.5	0.7	0.4	17.0	0.64	2.2	0.21	0.130	0.025
	9.8	0.4	0.3	19.2	0.60	2.6	0.131	0.080	0.025
	12.3	0.4	0.3	23.0	0.54	2.7	0.043	0.040	0.025

จากผลการทดลองที่แสดงในตารางที่ 3.4 พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การแยกลดลงเมื่อน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเพิ่มขึ้น ยกเว้นไลโซไซม์ (Lys.) ซึ่งอาจมีความชอบอยู่ในวัฏภาคที่มีเด็กซ์แทรนมากกว่า หรือเมื่ออยู่ในระบบแล้วมีลักษณะเป็นไดเมอร์ (dimer) หรือไตรเมอร์ (trimer) ทำให้มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าไคโมทริปซินเจน เอ (Chym.) จึงทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของไลโซไซม์มีค่าน้อย อย่างไรก็ตามผลการทดลองดังกล่าวขัดแย้งกับสมการที่ 3.1 ซึ่งแสดงว่าค่าสัมประสิทธิ์การแยกจะแปรผันตามน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน แต่ทั้งนี้พารามิเตอร์ λ ซึ่งแสดงถึงปัจจัยที่กำหนดลักษณะของวัฏภาคและปฏิสัมพันธ์ต่อองค์ประกอบของโปรตีน อาจมีผลกระทบต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกมากกว่าอิทธิพลจากน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน จึงทำให้ได้ผลการทดลองตามที่กล่าวมาแล้ว

เนื่องจากงานวิจัยนี้กำหนดชนิดของเอนไซม์ คือ แอลคาไลโนโปรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 เพื่อให้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมภายในประเทศ ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 27,000 Da ดังนั้นจึงไม่มีการศึกษาถึงอิทธิพลของน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกเพิ่มเติม

3.3.2 คุณสมบัติของระบบ

การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของระบบมีผลต่อสมบัติทางกายภาพของวัฏภาคของเหลว เช่น ความหนืดและความหนาแน่น ซึ่งทำให้องค์ประกอบของวัฏภาคทั้งสองเปลี่ยนแปลงไป สำหรับระบบที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์ 2 ชนิด เช่น ระบบ PEG / เด็กซ์แทรน / น้ำ การเพิ่มคุณสมบัติของระบบจะมีผลต่อแผนภาพวัฏภาค โดยที่การเพิ่มคุณสมบัติจะทำให้เส้นแบ่งวัฏภาคเข้าใกล้จุดกำเนิดมากขึ้น นั่นคือเมื่อคุณสมบัติเพิ่มขึ้นจะต้องการใช้ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ในการเกิดการแยกวัฏภาคน้อยลง ในขณะที่ระบบ PEG / เกลือ / น้ำ จะให้ผลตรงกันข้าม (Johansson และ Tjerneld, 1994)

ผลของคุณสมบัติของระบบที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกแสดงตามสมการของ Bronstedt (สมการที่ 3.1) โดยการเพิ่มคุณสมบัติมีผลให้เทอม $\lambda M/KT$ มีค่าลดลง ซึ่งทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกลดลงด้วย อย่างไรก็ตามต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกอีกด้วย

จากการศึกษาของ Mehrotra และคณะ (1999) พบว่าคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลคาไลโนโปรทีเอสจาก *Bacillus* sp. คือที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยปกติกระบวนการหลังการผลิตเพื่อแยกเอนไซม์และเซลล์ออกจากกัน ควรจะมีภาวะไม่แตกต่างจากภาวะที่ใช้ในการผลิตมากนัก เพื่อเป็นการประหยัดพลังงานและลดต้นทุนการผลิต และเนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง การใช้คุณสมบัติสูงอาจมีผลทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกศึกษาการสกัดแอลคาไลโนโปรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 ด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) และความดันบรรยากาศ

3.3.3 ความเป็นกรด-ด่างของระบบ

ความเป็นกรด-ด่างของระบบมีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกดังตัวอย่างที่มีผู้ศึกษาแล้วในตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 ผลของความเป็นกรด-ด่างของระบบต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก

เอนไซม์	องค์ประกอบของระบบ (%w/w)	pH	K	Yield (%)	เอกสารอ้างอิง
Cytochrome b ₅	17.7%PEG 1000 + 15.7% Potassium phosphate	6.4	0.23	26	Sarmiento และ คณะ, 1994
		7.3	0.6	42	
		8.7	2.1	68	
		9.6	9.8	91	
Cutinase	30%PEG1000 + 10% Na / K Phosphate	5	48	97	Sebastiao, Cabral และ Aires-Barros, 1994
		6	91	100	
		8	141	100	
		9	303	100	
Amyloglucosidase	5.1%PEG 6000 + 7.5% Na ₂ HPO ₄	3.20	0.011	-	Tanuja และ คณะ, 1997
		9.47	0.25	-	

จากผลการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกตามที่มีผู้ศึกษาแล้วดังแสดงในตารางที่ 3.5 พบว่า เมื่อระบบมีความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้น จะทำให้สัมประสิทธิ์การแยกและเปอร์เซ็นต์ผลได้มีค่าสูงขึ้นด้วย Kaul และ Asenjo (1994) ศึกษาผลของการสกัดโปรตีนที่ละลายน้ำได้จาก *E. coli* ในระบบ PEG / เกลือ / น้ำ โดยทำการศึกษาที่ความเป็นกรด-ด่างของระบบมีค่า 5, 7 และ 8.5 พบว่า เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบลดลง ค่าสัมประสิทธิ์การแยกจะลดลงด้วย และถ้าค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเพิ่มขึ้นสูงกว่าจุดไอโซอิเล็กทริก (pI) ของโปรตีน ค่าสัมประสิทธิ์การแยกจะเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งการที่ระบบมีค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่าจุดไอโซอิเล็กทริกของโปรตีน จะทำให้โปรตีนมีประจุเป็นลบและถูกแยกไปอยู่ในวัฏภาคบนได้มากขึ้น ค่าสัมประสิทธิ์การแยกจึงสูงขึ้น นอกจากนี้ Videira และ Aires-Barros (1994) พบว่าการสกัดโพแทสเซียม คลอไรด์ในระบบ PEG / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ จะให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกเพิ่มขึ้นมากเมื่อความเป็นกรด-ด่างของระบบสูงขึ้นสำหรับระบบที่ใช้ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1000 และ 400 ในขณะที่การใช้ PEG น้ำหนักโมเลกุล 6000 และ 4000 ให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกไม่แตกต่างกัน

ในงานวิจัยนี้ศึกษาการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 ด้วยระบบสารละลายน้ำของวัฏภาคที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบอยู่ในช่วง 7-11 เนื่องจากค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบในช่วงดังกล่าวเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการผลิตโพรทีเอสจาก *Bacillus* sp.

(Mehrotra และคณะ, 1999) เพราะในอนาคตอาจมีการพัฒนาใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค เพื่อแยกเอนไซม์และเซลล์ออกจากกัน ควบคู่ไปกับขั้นตอนในการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์

3.3.4 ชนิดและน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของพอลิเมอร์

การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่ใช้ในระบบมีผลต่อลักษณะโครงสร้างของน้ำและแรงที่กระทำระหว่างโมเลกุลของสารที่อยู่ในระบบ ซึ่งทำให้ความสามารถในการสกัดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการมีค่าต่าง ๆ กันไป น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์มีผลต่อพารามิเตอร์ Λ (ในสมการที่ 3.1) ซึ่งแสดงถึงปัจจัยที่กำหนดลักษณะของวัฏภาคและปฏิสัมพันธ์ต่อองค์ประกอบของโปรตีน ดังนั้นค่าสัมประสิทธิ์การแยกจึงเปลี่ยนแปลงไปด้วย ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของพอลิเมอร์ 2 ชนิดผสมกัน ต้องคำนึงถึงอิทธิพลของน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก Forciniti, Hall และ Kula (1991) ศึกษาการสกัดโปรตีน 5 ชนิดในระบบของ PEG / เด็กซ์แทรน / น้ำ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ต่าง ๆ กัน เมื่อให้น้ำหนักโมเลกุลของเด็กซ์แทรนคงที่ และเพิ่มน้ำหนักโมเลกุลของ PEG เป็น 4000, 6000, 10000 และ 20000 ตามลำดับ พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การแยกจะลดลง ในทางตรงกันข้ามการเพิ่มน้ำหนักโมเลกุลของเด็กซ์แทรนที่ใช้เป็น 10000, 40000, 110000 และ 500000 ตามลำดับ โดยที่น้ำหนักโมเลกุลของ PEG คงที่ จะได้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกสูงขึ้น อธิบายได้ว่า เมื่อน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์เพิ่มขึ้น จะทำให้โครงสร้างของน้ำในวัฏภาคที่มีพอลิเมอร์ชนิดนั้นสะสมอยู่มากเปลี่ยนแปลงไปและมีความสามารถในการละลายเอนไซม์ได้น้อยลง เอนไซม์จึงละลายในอีกวัฏภาคหนึ่งแทน (Forciniti, Hall และ Kula, 1991) สำหรับระบบที่เป็น PEG / เกลือ / น้ำ สนใจเฉพาะน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของ PEG ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่นิยมใช้มากที่สุด (ดังแสดงในตารางที่ 3.2) ซึ่งตัวอย่างของน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของพอลิเมอร์ที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกในระบบ PEG / เกลือ / น้ำ แสดงในตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 ผลของน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของพอลิเมอร์ต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก

เอนไซม์	องค์ประกอบของระบบ(%w/w)	M.W. _{PEG}	K	Yield (%)	เอกสารอ้างอิง
Cytochrome b ₅	16.7%PEG + 14.8%phos.	400	4.6	91	Sarmiento และ คณะ, 1994
	16.2%PEG + 14.3%phos.	1000	2.6	75	
	14 %PEG + 11.8%phos.	3350	0.07	6	
	14 %PEG + 11.8%phos.	8000	0.008	0.6	
Cutinase	25%PEG + 10% phos.	1000	165	99.7	Sebastiao, Cabral และ Aires-Barros, 1994
	25%PEG + 10% phos.	3350	15	96	
	12%PEG + 10% phos.	8000	0.13	90	
Alkaline protease	13.60%PEG + 13.75%phos.	4000	4.976	-	Hotha และ Banik, 1997
	14.30%PEG + 11.25%phos.	6000	3.824	-	
	14.60%PEG + 9.42 %phos.	9000	2.274	-	
Amyloglucosidase	5%PEG + 7.5% Na ₂ HPO ₄	4000	0.161	-	Tanuja และ คณะ, 1997
		6000	0.074	-	

M.W._{PEG} คือ น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของ PEG

จากตารางที่ 3.6 พบว่าน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของ PEG มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกค่อนข้างสูง ซึ่งในทุกตัวอย่างของการทดลองจะให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกเพิ่มขึ้นเมื่อลดน้ำหนักโมเลกุลของ PEG ที่ใช้ Videira และ Aires-Barros (1994) ศึกษาการสกัดกรดคลาวูลานิก ในระบบ PEG / โปแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การแยกจะอยู่ในช่วง 1.5 ถึง 114 เมื่อใช้ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กัน โดยการใช้ น้ำหนักโมเลกุลของ PEG ที่มีค่าน้อย ๆ (PEG 1000 และ 400) จะมีความแตกต่างของค่าสัมประสิทธิ์การแยกไม่มากนัก ในขณะที่การใช้ น้ำหนักโมเลกุลของ PEG ที่มีค่ามาก ๆ (PEG 6000 และ 4000) จะมีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัด โดยการเพิ่มน้ำหนักโมเลกุลของ PEG จะทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกลดลง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 1000 เพื่อให้ได้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกที่มีค่าสูงและเหมาะสมต่อการสกัดแอลคาไลโนโปรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 ในระบบ PEG / โปแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ซึ่งยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษาในระบบเดียวกันนี้

3.3.5 ชนิดและความเข้มข้นของเกลือ

ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ใช้ PEG และเกลือเป็นองค์ประกอบ โดยทั่วไปนิยมใช้เกลือโพแทสเซียมฟอสเฟตหรือโซเดียมฟอสเฟต Sebastiao, Cabral และ Aires-Barros (1994) ศึกษาผลจากชนิดของประจุบวกที่ใช้ต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกและเปอร์เซ็นต์ผลได้ของคิวติเนส โดยทำการทดลองที่องค์ประกอบของระบบมี PEG 25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักและฟอสเฟต 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 24 ± 1 องศาเซลเซียส และมีค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเท่ากับ 6 ซึ่งได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 ผลของชนิดของประจุบวกต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก (Sebastiao, Cabral และ Aires-Barros, 1994)

ชนิดของประจุบวก	น้ำหนักโมเลกุลของ PEG	K	Yield (%)
Na ⁺	1000	31	95
	3350	1.2	50
K ⁺	1000	22	100
	3350	1.6	100

พบว่าในระบบที่ใช้ PEG 1000 ค่าสัมประสิทธิ์การแยกจะลดลงเมื่อใช้ K⁺ แทน Na⁺ เนื่องจากในการเกิดระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของระบบที่ใช้โพแทสเซียมฟอสเฟต ต้องใช้ความเข้มข้นของพอลิเมอร์และเกลือสูงกว่าในระบบที่ใช้โซเดียมฟอสเฟต แสดงว่าเมื่อองค์ประกอบของระบบเหมือนกัน ในระบบที่ใช้โพแทสเซียมฟอสเฟต จุดดังกล่าวจะอยู่ใกล้เส้นแบ่งวัฏภาคมากกว่าระบบที่ใช้โซเดียมฟอสเฟต ซึ่งจุดที่อยู่ห่างจากเส้นแบ่งวัฏภาคมากขึ้นจะทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของคิวติเนสสูงขึ้นด้วย ระบบดังกล่าวจึงมีค่าสัมประสิทธิ์การแยกลดลงเมื่อใช้ K⁺ แทน Na⁺ ในขณะที่ผลของประจุบวกที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกในระบบที่ใช้ PEG 3350 ให้ผลตรงกันข้าม ซึ่งโซเดียมฟอสเฟตทำให้คิวติเนสตกตะกอน และการตกตะกอนโปรตีนจะไม่เกิดขึ้นเมื่อใช้เกลือโพแทสเซียมฟอสเฟต หรือเมื่อใช้ PEG 1000 ในการเกิดระบบสองวัฏภาคนี้

โดยปกติเกลือโซเดียมจะใช้ในการเตรียมระบบที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ (น้อยกว่า 6) สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบที่มีค่าตั้งแต่ 6 จะใช้โพแทสเซียมฟอสเฟต (Sebastiao, Cabral และ Aires-Barros, 1994) ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบ

ในช่วง 7-11 ดังนั้นจึงใช้โพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4 และ KH_2PO_4) ในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบให้ได้ตามต้องการ

3.3.6 ความยาวของเส้นผูก (tie line length, TLL)

เนื่องจากองค์ประกอบของวัฏภาคบนและล่างของระบบที่อยู่บนเส้นผูกเดียวกัน จะมีค่าสัมประสิทธิ์การแยกเท่ากัน แต่เปอร์เซ็นต์ผลได้ต่างกันขึ้นกับสัดส่วนปริมาตรของวัฏภาคล่างต่อวัฏภาคบนดังแสดงในสมการที่ 2.5 ความยาวของเส้นผูกแสดงถึงความแตกต่างขององค์ประกอบในทั้งสองวัฏภาค องค์ประกอบของสารที่ใช้ในระบบ (เช่น PEG และ/หรือโพแทสเซียมฟอสเฟต) จะเพิ่มขึ้นตามความยาวของเส้นผูกที่มากขึ้น ซึ่งความเข้มข้นของสารที่ใช้ในระบบจะมีผลต่อลักษณะของระบบที่เกิดขึ้น ดังนั้นการศึกษาผลของความยาวของเส้นผูกที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกจะเกี่ยวเนื่องกับความเข้มข้นขององค์ประกอบที่ใช้ในการเกิดระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ซึ่งผลของความยาวของเส้นผูกต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกมีผู้ศึกษาไว้ดังแสดงในตารางที่ 3.8

ตารางที่ 3.8 ผลของความยาวของเส้นผูกต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก

เอนไซม์	องค์ประกอบของระบบ (%w/w)	ลักษณะของ TLL	K	Yield (%)	เอกสารอ้างอิง
Cytochrome b_5	16.2%PEG1000+ 14.3%phos.	สั้น	2.6	75	Sarmiento และคณะ, 1994
	17.7%PEG1000+ 15.7%phos.	ยาว	9.8	91	
	19.7%PEG1000+ 17.7%phos.	ยาวมาก	260	99	
Cutinase	20%PEG1000 + 10% phos.	สั้น	41	98	Sebastiao, Cabral และ Aires-Barros, 1994
	25%PEG1000 + 10% phos.	ยาว	165	99.7	
	30%PEG1000 + 10% phos.	ยาวมาก	303	99.8	
Alkaline protease	13.6%PEG4000 +13.75%phos.	สั้น	4.976	-	Hotha และ Banik, 1997
	14.4%PEG4000 +13.75%phos.	ยาว	3.492	-	
	15.0%PEG4000 +13.75%phos.	ยาวมาก	3.373	-	

TLL คือ ความยาวของเส้นผูก ซึ่งแสดงถึงความแตกต่างขององค์ประกอบของวัฏภาคที่อยู่ร่วมกัน

Videira และ Aires-Barros (1994) ศึกษาการแยกกรดคลาวูลานิก ในระบบ PEG / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ พบว่าเมื่อเพิ่มความยาวของเส้นผูก จะได้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกเพิ่มขึ้นจาก 1.5 ถึง 114 ส่วน Forciniti, Hall และ Kula (1991) ศึกษาผลของความยาวของเส้น

ผู้ที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีน 5 ชนิดในระบบ PEG / เด็กซ์แทรน / น้ำ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.9

ตารางที่ 3.9 ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีนทั้ง 5 ชนิดในระบบ PEG / เด็กซ์แทรน / น้ำ ที่ความยาวของเส้นผูกต่าง ๆ กัน (Forciniti, Hall และ Kula, 1991)

ระบบ	PEG (%w/w)		เด็กซ์แทรน (%w/w)		TLL*	ค่าสัมประสิทธิ์การแยก				
	บน	ล่าง	บน	ล่าง		Lys.	Chym.	Alb.	Trans.	Cat.
PEG6000 / เด็กซ์แทรน 40000	6.0	4.4	6.1	9.4	3.7	0.85	1.50	0.43	0.80	0.27
	9.4	2.0	2.0	17.1	16.8	0.74	1.55	0.25	0.18	0.089
	12.4	1.1	0.8	22.3	24.3	0.67	1.94	0.115	0.058	0.030
	13.5	1.0	0.6	24.0	26.5	0.59	1.96	0.099	0.049	0.024

* TLL คือ ความยาวของเส้นผูก ซึ่งคำนวณจาก $TLL = \{[C(P)_1 - C(P)_2]^2 + [C(Q)_1 - C(Q)_2]^2\}^{0.5}$ (สมการที่ 2.2)

จากตารางที่ 3.9 พบว่าเมื่อความยาวของเส้นผูกเพิ่มขึ้น (คำนวณจากสมการที่ 2.2) ค่าสัมประสิทธิ์การแยกจะลดลงสำหรับไลโซไซม์ (Lys.), อัลบูมิน (Alb.), ทรานเฟอริน (Trans.) และ คะตะเลส (Cat.) ซึ่งได้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกน้อยกว่า 1 และจะเพิ่มขึ้นสำหรับโคโมทรอปซิโนเจน เอ (Chym.) ซึ่งได้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกมากกว่า 1 เห็นได้ว่าความยาวของเส้นผูกมีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของระบบในโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ (ทรานเฟอรินและกะตะเลส ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 73,000 และ 250,000 ตามลำดับ) มากกว่าในโปรตีนที่มีขนาดเล็ก (ไลโซไซม์และโคโมทรอปซิโนเจน เอ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 13,200 และ 23,200 ตามลำดับ) (Forciniti, Hall และ Kula, 1991)

จากการศึกษาผลของความยาวของเส้นผูกที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกตามที่ได้กล่าวมาแล้วพบว่า ยังไม่สามารถสรุปผลดังกล่าวเป็นข้อสรุปโดยทั่วไปได้ เนื่องจากมีปัจจัยสำคัญอีกหลายประการที่มีอิทธิพลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก เช่น องค์ประกอบของระบบที่เป็นพอลิเมอร์ 2 ชนิดหรือพอลิเมอร์กับเกลือ รวมถึงชนิดของโปรตีนหรือเอนไซม์ที่ต้องการสกัดด้วย สำหรับงานวิจัยนี้ศึกษาผลของความยาวของเส้นผูกที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 ในระบบ PEG1000 / โฟแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ โดยเลือกจุดกึ่งกลางของเส้นผูกนั้น ๆ เป็นองค์ประกอบของระบบที่ทำการศึกษา เพื่อควบคุมสัดส่วนปริมาตรของวัฏภาคบน

ต่อวัฏภาคล่างให้ใกล้เคียงกันในทุกภาวะการทดลองเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Hotha และ Banik (1997) ที่ศึกษาการสกัดแอลคาไลโนไฟรทีเอสในระบบ PEG / โฟแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ซึ่งทำการศึกษาที่น้ำหนักโมเลกุลของ PEG ต่าง ๆ กันด้วย อย่างไรก็ตามจุดที่มีความเข้มข้นของพอลิเมอร์และเกลือสูงมาก ๆ อาจทำให้โปรตีนตกตะกอนได้ ซึ่งจะมีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีนชนิดนั้นด้วย

3.3.7 แรงไอออนิกจากการเติมเกลือ เช่น โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

การเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีประจุสุทธิเป็นศูนย์มีผลต่อแรงไอออนิกของระบบ ระบบที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์มีผลให้องค์ประกอบในการเกิดเป็น 2 วัฏภาคเปลี่ยนแปลงไป โดยมีเส้นแบ่งวัฏภาคเข้าใกล้จุดกำเนิดมากขึ้น นั่นคือการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ จะใช้ความเข้มข้นของพอลิเมอร์และเกลือในการเกิดระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคน้อยลง (Mistry และคณะ, 1996) ซึ่งมีลักษณะคล้ายกันทั้งในระบบ PEG / เด็กซ์แทรน / น้ำ และ PEG / เกลือ / น้ำ (Huddleston และคณะ, 1991) มีผู้ศึกษาผลของการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกในระบบ PEG / เกลือ / น้ำ แสดงในตารางที่ 3.10

ตารางที่ 3.10 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก

โปรตีน	องค์ประกอบของระบบ (%w/w)	NaCl (%)	K_{prot}	K_{cont}	เอกสารอ้างอิง
Cephalosporin C	17.5%PEG600 + 17.5% (NH ₄) ₂ SO ₄	0	1.30	-	Yang และ คณะ, 1994
		2	1.30	-	
		7.3	1.29	-	
Desacetyl cephalo- sporin C	17.5%PEG600 + 17.5% (NH ₄) ₂ SO ₄	0	0.95	-	Yang และ คณะ, 1994
		2	0.76	-	
		7.3	0.64	-	
Alkaline xylanases	16%PEG6000 + 8%K ₂ HPO ₄	0	0.7	0.3	Duarte และ คณะ, 1999
		3	2.5	2.7	
		6	0.9	5.3	
		9	3.0	2.0	
		12	0.7	108	

K_{prot} คือ ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีนที่ต้องการ

K_{cont} คือ ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีนชนิดอื่น ๆ ที่เป็นสารปนเปื้อน

จากตารางที่ 3.10 พบว่าผลของไซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โซลานเนส ($K_{prot.}$) ไม่ชัดเจนเท่าผลที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีนชนิดอื่น ๆ ที่เป็นสารปนเปื้อน ($K_{cont.}$) โดยแอลคาไลน์โซลานเนสจะถูกแยกไปในวิภูภาคกลางได้มากสำหรับระบบที่มีไซเดียมคลอไรด์ 0, 6 และ 12 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ($K_{prot.} < 1$) และถูกแยกไปในวิภูภาคบนได้มากสำหรับระบบที่มีไซเดียมคลอไรด์ 3 และ 9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ($K_{prot.} > 1$) ซึ่งระบบที่เหมาะสมต่อการแยกแอลคาไลน์โซลานเนสและสารปนเปื้อนออกจากกันมากที่สุด คือระบบที่มีความเข้มข้นของไซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 12 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เนื่องจากมีความแตกต่างของ $K_{prot.}$ และ $K_{cont.}$ มากกว่าในภาวะอื่น ๆ ที่ทำการทดลอง ซึ่งแสดงว่าสามารถแยกโปรตีนที่ต้องการออกจากสารปนเปื้อนไปในวิภูภาคที่ต่างกันได้อย่างชัดเจน ส่วนการแยก Cephalosporin C และ Desacetyl cephalosporin C พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไซเดียมคลอไรด์ มีผลให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีนทั้งสองชนิดลดลง

การเติมไซเดียมคลอไรด์มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของตัวทำละลายในวิภูภาค รวมถึงโครงสร้างของผลิตภัณฑ์และสารปนเปื้อน จึงทำให้เกิดการแยกผลิตภัณฑ์และสารปนเปื้อนไปในวิภูภาคทั้งสองได้ต่างกัน Mistry และคณะ (1996) พบว่าในระบบที่มีความเข้มข้นของไซเดียมคลอไรด์ต่ำ ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของอัลฟา-อะไมเลสมีค่าน้อยกว่าสัมประสิทธิ์การแยกของสารปนเปื้อน และที่ความเข้มข้นของไซเดียมคลอไรด์สูง สัมประสิทธิ์การแยกของอัลฟา-อะไมเลสจะมีค่ามากกว่าสัมประสิทธิ์การแยกของสารปนเปื้อน ซึ่งลักษณะดังกล่าวทำให้สามารถแยกเอนไซม์ออกจากสารปนเปื้อนได้ในการสกัดครั้งแรก โดยให้ระบบมีความเข้มข้นของไซเดียมคลอไรด์สูง (เอนไซม์สะสมอยู่ในวิภูภาคบน ส่วนสารปนเปื้อนสะสมอยู่ในวิภูภาคกลาง) จากนั้นดึงเอาวิภูภาคกลางซึ่งมีสารปนเปื้อนออกและเติมสารละลายเกลือฟอสเฟตหรือซัลเฟตที่ไม่มีไซเดียมคลอไรด์ ทำให้เกิดการแยกวิภูภาคครั้งที่สอง ซึ่งในครั้งนี้จะแยกเอนไซม์มาอยู่ในวิภูภาคกลาง ส่วนวิภูภาคบนซึ่งมีพอลิเมอร์และไซเดียมคลอไรด์ที่สะสมอยู่ตั้งแต่การสกัดครั้งแรกก็นำกลับมาใช้ในขั้นตอนแรกได้อีก

Schmidt, Andrews และ Asenjo (1996) กล่าวว่า การใช้ความเข้มข้นของไซเดียมคลอไรด์ในปริมาณสูง (8.8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ทำให้โปรตีนที่มีประจุบวก เช่น ซับทิลิซิน (subtilisin) ถูกแยกไปในวิภูภาคบน และโปรตีนที่มีประจุลบ เช่น ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ (trypsin inhibitor) ถูกแยกไปในวิภูภาคกลาง

เห็นได้ว่าความเข้มข้นของไซโตเต็มคลอไรด์เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีน การทำนายผลดังกล่าวยังขึ้นกับปัจจัยอื่น ๆ อีกหลายประการ ดังนั้นผลของไซโตเต็มคลอไรด์ต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกสำหรับเอนไซม์หรือโปรตีนแต่ละชนิดนั้น ควรศึกษาจากการทดลอง

จากงานวิจัยที่กล่าวมาทั้งหมดนี้พบว่ายังมีการศึกษาการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคอยู่ไม่มากนัก มีเพียง Hotha และ Banik (1997) ที่ศึกษาการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสในระบบ PEG / โพลีเอทิลีนไกลคอล / น้ำ โดยศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลของ PEG และความยาวของเส้นผูกที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกเท่านั้น สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ จะทำการศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบและผลจากการเติมไซโตเต็มคลอไรด์ลงในระบบ ที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกแอลคาไลน์โพรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 ในระบบ PEG1000 / โพลีเอทิลีนไกลคอล / น้ำ ซึ่งเป็นปัจจัยที่ยังไม่มีผู้ศึกษาไว้ในระบบเดียวกันนี้



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

4.1 อุปกรณ์

- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (4-digits balance) ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland.
- เครื่องกวนแบบแม่เหล็กพร้อมเตาให้ความร้อน (magnetic stirrer / hot plate) ของบริษัท Ika Labortechnik, Germany.
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น MP 220 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland.
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Kubota 5100 ของบริษัท Kubota corporation, Japan.
- เครื่องวิเคราะห์สารไฮเพอร์ฟอแมนส์ ลิควิด โครมาโตกราฟี (HPLC) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan.
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น Julabo ของบริษัท Labortechnik GMBH, Germany.
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer) รุ่น 6405 ของบริษัท Jenway, England.

4.2 เคมีภัณฑ์

- โพลีเอทิลีนไกลคอล น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 1000 (PEG1000) ของบริษัท Ajax, Australia.
- ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของบริษัท Ajax, Australia.
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท Ajax, Australia.
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท Ajax, Australia.
- กรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) ของบริษัท Lipton Manufacturing Chemists, England.
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany.
- โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ของบริษัท Ajax, Australia.

- โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3) ของบริษัท Ajax, Australia.
 - กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท BDH Laboratory Supplies, England.
 - เคซีน (Casein from bovine milk) ของบริษัท Fluka, Switzerland.
 - กรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA) ของบริษัท Merck, Germany.
- เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง มีความบริสุทธิ์ระดับห้องปฏิบัติการ (lab grade)

4.3 เอนไซม์

ในงานวิจัยนี้ใช้แอลคาไลน์โพรทีเอสจาก *B. subtilis* NS99 ซึ่งเป็นครูดเอนไซม์ผง (crude enzyme) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.นภา ศิวรังสรรค์ จากภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 วิธีการทดลอง

การทดลองหาระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคสำหรับการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 สามารถแบ่งได้เป็น 2 ส่วนคือ ส่วนแรกเป็นการทดลองเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค และส่วนที่สองเป็นวิธีการหาค่าสัมประสิทธิ์การแยกเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 ด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

4.4.1 การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

4.4.1.1 การเตรียมระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคเตรียมได้โดยการเติมโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4 และ KH_2PO_4) ลงในสารละลายผสมของโพลีเอทิลีนไกลคอลน้ำหนักโมเลกุล 1000 (PEG1000) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วง 5-70 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักกับโซเดียมคลอไรด์ (0, 4, 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ซึ่งมีปริมาตรรวม 40 มิลลิลิตร จนได้ค่าความเป็นกรด-ด่างตามที่ต้องการ (7.5, 8.5, 9.5 และ 10.5) ผสมให้เข้ากันเป็นสารละลายผสมที่มีลักษณะขุ่น ซึ่งการเตรียมระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคนี้กระทำภายใต้การปั่นกวนตลอดเวลาและใช้น้ำกรองตลอดการทดลอง

4.4.1.2 การหาเส้นแบ่งวัฏภาค

ในการหาเส้นแบ่งวัฏภาคจะนำสารละลายผสมที่เตรียมได้ปริมาณ 5 มิลลิลิตรมาเติมน้ำกรองที่ละน้อย ผสมให้เข้ากันจนได้สารละลายที่มีลักษณะใส คำนวณหาความเข้มข้นของ PEG1000 และโพแทสเซียมฟอสเฟตที่มีในสารละลายนั้น เพื่อเป็นค่าหนึ่งบนเส้นแบ่งวัฏภาค จากนั้นเปลี่ยนความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลาย PEG1000 ในขั้นตอนการเตรียมระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค เพื่อหาจุดอื่น ๆ ที่อยู่บนเส้นแบ่งวัฏภาคต่อไป ผลการทดลองที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำกัน 3 ครั้ง ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่าง (the coefficient of variation) ของชุดตัวอย่างที่ทำการทดลองซ้ำกัน 3 ครั้งนี้เท่ากับ ± 0.93 เปอร์เซ็นต์

4.4.1.3 การหาเส้นผูก

การหาเส้นผูกของระบบที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบและความเข้มข้นของไฮเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ กัน ทำได้โดยปิเปตสารละลายผสมที่เตรียมได้ปริมาณ 10 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้สารละลายแยกเป็นสองวัฏภาคโดยสมบูรณ์ จากนั้นนำตัวอย่างของสารละลายในแต่ละวัฏภาคไปหาปริมาณของ PEG1000 และโพแทสเซียมฟอสเฟตที่มีในแต่ละวัฏภาคด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอ-แมนส์ ลิควิด โครมาโตกราฟี (HPLC) ซึ่งจุดที่เป็นองค์ประกอบของสารทั้งสองในแต่ละวัฏภาคนี้จะเป็นค่าหนึ่งบนเส้นแบ่งวัฏภาคด้วย และเมื่อลากเส้นเชื่อมระหว่างองค์ประกอบในวัฏภาคบนและวัฏภาคล่างจะได้เส้นผูกของระบบในภาวะนั้น ๆ โดยภาวะนั้น ๆ จะหาเส้นผูก 3 เส้นด้วยการเปลี่ยนความเข้มข้นเริ่มต้นของ PEG1000 ที่ใช้ในการเตรียมระบบ ซึ่งในขั้นตอนการหาเส้นผูกโดยวิเคราะห์ด้วย HPLC นี้ทำการทดลองเพียงครั้งเดียว

4.4.2 การหาค่าสัมประสิทธิ์การแยก

4.4.2.1 การเตรียมระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคสำหรับการสกัดแอลคาไลโน-

โพรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99

เลือกจุดกึ่งกลางของเส้นผูกแต่ละเส้นในทุกภาวะการทดลองเป็นจุดที่ใช้ในการสกัดแอลคาไลโนโพรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 เพื่อควบคุมปริมาตรในวัฏภาคบนและล่างให้ใกล้เคียงกัน และควบคุมสัดส่วนของปริมาตรในวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างให้ใกล้เคียงกันในทุก

ภาวะที่ทำการทดลองด้วย เตรียมระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่จะใช้ในการสกัดโดยผสมสารละลาย PEG1000, โซเดียมคลอไรด์ และโพแทสเซียมฟอสเฟตตามองค์ประกอบในจุดดังกล่าว ปรับค่าความเป็นกรด-ต่างของระบบให้ได้ตามต้องการ (7.5, 8.5, 9.5 และ 10.5) ด้วยกรดฟอส-ฟอริกเข้มข้นหรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 นอร์มอลในปริมาณเพียงเล็กน้อย โดยมีการปั่นกวนอยู่ตลอดเวลา เมื่อสารละลายทั้งหมดผสมกันดีแล้ว เติมสารละลายเอนไซม์ ปริมาณ 1 มิลลิลิตรลงในระบบดังกล่าว เติมน้ำกรองจนระบบมีน้ำหนักประมาณ 12 กรัม จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จึงนำตัวอย่างในแต่ละวัฏภาคไปหาแอกติวิตีของเอนไซม์ เพื่อคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอสในแต่ละภาวะการทดลองตามสมการที่ 2.3 โดยค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำกัน 3 ครั้ง ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างของผลการทดลองเท่ากับ ± 23.54 เปอร์เซ็นต์

4.4.2.2 การเตรียมสารละลายเพื่อหาแอกติวิตีของเอนไซม์ (นภา ศิวรังสรรค์และสุดา เกียรติกำจรวงศ์, 2540)

- สารละลายคาร์บอนेट-ไบคาร์บอนेटบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ มีค่าความเป็นกรด-ต่างเท่ากับ 10.5 เตรียมโดย

ละลายโซเดียมคาร์บอนेट (Na_2CO_3) 21.2 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร

ละลายโซเดียมไบคาร์บอนेट (NaHCO_3) 16.8 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร

ผสมสารละลายโซเดียมคาร์บอนेट 202.5 มิลลิลิตร กับสารละลายโซเดียมไบคาร์บอนेट 47.5 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ต่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 นอร์มอลหรือกรดไฮโดรคลอริก 2 นอร์มอล จนได้ความเป็นกรด-ต่างเท่ากับ 10.5 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

- สารละลายเคซีน 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีค่าความเป็นกรด-ต่างเท่ากับ 10.5 เตรียมโดยละลายเคซีน 0.5 กรัมในสารละลายคาร์บอนेट-ไบคาร์บอนेटบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรด-ต่างเท่ากับ 10.5 คนเบา ๆ ให้ความร้อนเล็กน้อยจนเคซีนละลายหมด ทิ้งไว้ให้เย็น ปรับค่าความเป็นกรด-ต่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 นอร์มอลหรือกรดไฮโดรคลอริก 2 นอร์มอล ปรับปริมาตรด้วยสารละลายบัฟเฟอร์จนครบ 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

- กรดไตรคลอโรอะซีติก (trichloroacetic acid, TCA) 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ต่อปริมาตร เตรียมโดยละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก 10 กรัมในน้ำกลั่น คนจนกรดละลายหมด ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร บรรจุในขวดสีชา เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.4.2.3 การเตรียมกราฟมาตรฐานไทโรซีน (tyrosine standard curve)

(นภา ศิวรังสรรค์และสุดา เกียรติกำจรวงศ์, 2540)

ละลายไทโรซีน 0.01 กรัมในสารละลายคาร์บอนेट-ไบคาร์บอนेटบัฟเฟอร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5 ปรับปริมาตรจนครบ 50 มิลลิลิตร และทำกราฟมาตรฐานไทโรซีน โดยเจือจางสารละลายไทโรซีนที่ได้ตามสัดส่วนที่แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 การเตรียมความเข้มข้นของไทโรซีนเพื่อใช้ในการหากราฟมาตรฐานไทโรซีน

สารละลายไทโรซีน (มิลลิลิตร)	สารละลายบัฟเฟอร์ (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของไทโรซีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
0.0	5.0	0
0.5	4.5	20
1.0	4.0	40
1.5	3.5	60
2.0	3.0	80
2.5	2.5	100
3.0	2.0	120

นำสารละลายที่เจือจางแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer)

4.4.2.4 การหาแอกติวิตีของเอนไซม์ (นภา ศิวรังสรรค์และสุดา เกียรติกำจรวงศ์, 2540)

ปมตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตรกับสารละลายเคซีน 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรที่ละลายในบัฟเฟอร์ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.9 มิลลิลิตร นำไปแช่

ในอ่างน้ำอุ่นที่ควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำขึ้นแช่ในอ่างน้ำเย็นหยุดปฏิกิริยาทันทีด้วย 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำส่วนน้ำใสวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซีน (แสดงในภาคผนวก ก.4)

ในการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ต้องทำหาค่าควบคุมสำหรับเปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนที่ได้จากการย่อยสลายโดยเอนไซม์อย่างแท้จริง โดยใส่กรดไตรคลอโรอะซิติกลงไปก่อน แล้วจึงเติมตัวอย่าง, บัฟเฟอร์และสารละลายเคซีนลงไป ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำขึ้นแช่ในอ่างน้ำเย็น แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอน กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำส่วนน้ำใสวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงของหาค่าควบคุมลบออกจากค่าการดูดกลืนแสงจากหลอดตัวอย่าง เปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนจากกราฟมาตรฐาน

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของไทโรซีน 1 ไมโครกรัมที่ได้จากการย่อยสลายเคซีน 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5 ภายในเวลา 1 นาที

4.5 การวิเคราะห์

ในงานวิจัยนี้ใช้ไฮเพอร์ฟอแมนส์ ลิควิด โครมาโตกราฟี (HPLC) ในการหาปริมาณของ PEG1000 และโพแทสเซียมฟอสเฟต และใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรในการหาแอกติวิตีของเอนไซม์

4.5.1 การวิเคราะห์โดยใช้ไฮเพอร์ฟอแมนส์ ลิควิด โครมาโตกราฟี (HPLC)

ไฮเพอร์ฟอแมนส์ ลิควิด โครมาโตกราฟี (HPLC) ที่ใช้เป็นของบริษัท Shimadzu รุ่น LC-3A มีดีเทคเตอร์ (detector) เป็นแบบรีแฟคทีฟ อินเดคทีฟ ดีเทคเตอร์ (RID = Refractive Index Detector) ใช้ในการหาปริมาณ PEG1000 และโพแทสเซียมฟอสเฟตในแต่ละวิญญภาค โดยมีเงื่อนไขในการวิเคราะห์ดังนี้

4.5.1.1 หาปริมาณ PEG1000 ในวัฏภาคบน (ทุกภาวะการทดลอง) และปริมาณ โพลีเอทิลีนฟอสเฟตในวัฏภาคบนและล่าง (ที่ 0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์)

คอลัมน์	: Lichrocart C ₈
ดีเทคเตอร์	: รีเฟคทีฟ อินเดคตีเทคเตอร์ (RID)
วัฏภาคเคลื่อนที่	: 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของเมทานอลในน้ำ
อัตราการไหล	: 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที
อุณหภูมิ	: 30±2 องศาเซลเซียส
ปริมาตรของตัวอย่าง	: 5 ไมโครลิตร

ซึ่งกราฟมาตรฐานของ PEG1000 จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ Lichrocart C₈ แสดงในภาคผนวก ก.1 ในขณะที่ปริมาณ PEG1000 ในวัฏภาคล่างไม่สามารถหาได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC เนื่องจากมีความเข้มข้นของ PEG1000 ในวัฏภาคล่างน้อยเกินไป (น้อยกว่า 0.001 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ส่วนกราฟมาตรฐานของโพลีเอทิลีนฟอสเฟตจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ Lichrocart C₈ แสดงในภาคผนวก ก.2

4.5.1.2 หาปริมาณโพลีเอทิลีนฟอสเฟตในวัฏภาคล่าง (ที่ 4, 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์)

คอลัมน์	: Zorbax-Sax
ดีเทคเตอร์	: รีเฟคทีฟ อินเดคตีเทคเตอร์ (RID)
วัฏภาคเคลื่อนที่	: 20 มิลลิโมลาร์ของกรดฟอสฟอริกที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.7
อัตราการไหล	: 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
อุณหภูมิ	: 30±2 องศาเซลเซียส
ปริมาตรของตัวอย่าง	: 5 ไมโครลิตร

ซึ่งกราฟมาตรฐานของโพลีเอทิลีนฟอสเฟต จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์ Zorbax-Sax แสดงในภาคผนวก ก.3

4.5.2 การวิเคราะห์โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

ในงานวิจัยนี้ใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-VIS spectrophotometer) รุ่น 6405 ของบริษัท Jenway ประเทศอังกฤษ เพื่อใช้หาค่าแอมพลิจูดของเอนไซม์ โดยจะวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

5.1 บทนำ

การทดลองหาภาวะที่เหมาะสมของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ในการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 มี 2 ขั้นตอนหลัก คือ ในขั้นตอนแรกเป็นการหาแผนภาพวัฏภาค (phase diagram) ของระบบ PEG1000 / โพลีแซ็กคาไรด์ / น้ำ ที่ใช้ในการศึกษาที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) และความดันบรรยากาศ โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบ (7.5, 8.5, 9.5 และ 10.5) และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (0, 4, 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ต่าง ๆ กัน รวมทั้งศึกษาผลของค่าทั้งสองที่มีต่อเส้นแบ่งวัฏภาค ส่วนในขั้นตอนที่สองเป็นการเลือกระบบที่จะใช้ในการหาค่าสัมประสิทธิ์การแยก เพื่อให้ได้ภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 ให้ได้มากที่สุด ในขณะเดียวกันจะศึกษาผลของความยาวของเส้นผูก, ความเป็นกรด-ด่างของระบบ และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกด้วย

5.2 แผนภาพวัฏภาคของระบบ PEG1000 / โพลีแซ็กคาไรด์ / น้ำ

Per-Ake Albertsson (1986) พบวิธีการสกัดสารทางชีวภาพด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ซึ่งระบบนี้ประกอบด้วยสารละลายน้ำที่มีความสามารถในการละลายของพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดในน้ำ (เช่น เด็กซ์แทรนและ PEG) หรือพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งกับเกลือ (เช่น PEG และ โพลีแซ็กคาไรด์) แตกต่างกัน โดยโมเลกุลของสารทั้งสองชนิดจะถูกล้อมรอบด้วยโมเลกุลของน้ำซึ่งเป็นตัวทำละลาย และมีโครงสร้างแตกต่างกันตามพันธะที่เกิดขึ้นกับสารชนิดนั้น ๆ ส่วนที่สามารถผสมกันได้จะเกิดการรวมตัวกัน ในขณะที่ส่วนที่ผสมกันไม่ได้และไม่รวมตัวกันนี้ทำให้เกิดความขุ่นและเกิดการแยกวัฏภาคขึ้น ระบบจึงมีลักษณะเป็นสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ไม่ผสมกันซึ่งมีลักษณะคล้ายกับการใช้ตัวทำละลายสองชนิดที่ไม่ผสมกัน และระบบจะพยายามเข้าสู่สมดุล คือ ไม่สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงได้เองตามธรรมชาติ ไม่มีแรงขับ (driving force) ระหว่างวัฏภาคที่จะไปเปลี่ยนแปลงสมบัติในแต่ละวัฏภาคได้ กล่าวคือ อุณหภูมิ, ความดันและศักย์เคมี (chemical potential) ขององค์ประกอบในแต่ละวัฏภาคมีค่าเท่ากัน

ลักษณะทางเคมีฟิสิกส์ที่ใช้อธิบายลักษณะที่แตกต่างกันของวัสดุภาคทั้งสองได้แก่

1. ความมีขั้วของตัวทำละลาย (solvent polarity) ขึ้นกับความเข้มข้นของพอลิเมอร์ (และเกลือ) ที่มีในวัสดุภาค ซึ่งความมีขั้วของวัสดุภาคทั้งสองจะแตกต่างกันน้อยลงเมื่อความเข้มข้นของพอลิเมอร์ลดลง ดังนั้นระบบที่ใช้พอลิเมอร์และ/หรือเกลือต่างชนิดกัน จึงมีความมีขั้วต่างกัน ลักษณะของตัวทำละลายในทั้งสองวัสดุภาคจึงต่างกันด้วย

2. ความสามารถในการเคลื่อนที่ของน้ำ (water mobility) โดย Zaslavsky และคณะ (1989) อ้างถึงใน Zaslavsky (1995) พบว่าความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของน้ำระหว่างวัสดุภาคทั้งสองของวัสดุภาคที่มีความเข้มข้นของ PEG, PVP, และ Ficoll อยู่มาก (มีขั้วน้อย) กับวัสดุภาคที่มีความเข้มข้นของเด็กซ์แทรนอยู่มาก (มีขั้วมาก) จะมีค่าเท่ากับ 0.7×10^{-12} วินาที ซึ่งแตกต่างจากความสามารถในการเคลื่อนที่ของน้ำบริสุทธิ์ที่มีค่าเท่ากับ 8.25×10^{-12} วินาที แสดงว่า สมบัติของน้ำที่มีพอลิเมอร์ผสมอยู่ในวัสดุภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัสดุภาคจะแตกต่างจากสมบัติเดิมของน้ำบริสุทธิ์

3. ลักษณะไฮโดรโฟบิกของวัสดุภาค มีผลต่อโครงสร้างของน้ำในวัสดุภาคทั้งสองของระบบ ความแตกต่างของไฮโดรโฟบิกของวัสดุภาคขึ้นกับชนิดของพอลิเมอร์ที่ใช้ในระบบและขึ้นกับความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นของพอลิเมอร์ในวัสดุภาคทั้งสองด้วย สำหรับระบบที่ใช้พอลิเมอร์และเกลือจะมีค่าไฮโดรโฟบิกของวัสดุภาคบน (มี PEG อยู่มาก) มากกว่าในวัสดุภาคล่าง (มีเกลืออยู่มาก) ซึ่งความแตกต่างของลักษณะไฮโดรโฟบิกของวัสดุภาคทั้งสองจะเพิ่มขึ้นในระบบดังนี้ (เด็กซ์แทรน / Ficoll) < (เด็กซ์แทรน / PVP) < (เด็กซ์แทรน / PEG) < (PEG / แอมโมเนียมซัลเฟต) < (PEG / โปแทสเซียมฟอสเฟต) < (PEG / แมกนีเซียมซัลเฟต) (Zaslavsky, 1995) อย่างไรก็ตามลักษณะไฮโดรโฟบิกของวัสดุภาคทั้งสองในระบบสารละลายน้ำสองวัสดุภาคจะมีค่าแตกต่างกันน้อยมากเมื่อเทียบกับระบบของน้ำกับตัวทำละลายอินทรีย์

ระบบสารละลายน้ำสองวัสดุภาคประกอบด้วยน้ำเป็นส่วนใหญ่ โดยพอลิเมอร์ชนิดแรกจะมีอยู่มากในวัสดุภาคหนึ่ง และพอลิเมอร์ชนิดที่สองหรือเกลือ จะมีมากในอีกวัสดุภาคหนึ่ง เนื่องด้วยตัวทำละลายในทั้งสองวัสดุภาคคือน้ำ องค์ประกอบของวัสดุภาคที่เกิดขึ้นจึงเป็นสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับโมเลกุลทางชีวภาพ การสกัดโปรตีนด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัสดุภาคจะเกิดขึ้นเมื่อเติมสารละลายผสมของโปรตีนลงในระบบและโปรตีนแต่ละชนิดจะกระจายในวัสดุภาคทั้งสองที่อยู่อย่างสมดุลได้ต่างกันตามลักษณะเฉพาะของตัวเอง โดยการสกัดโปรตีนจะขึ้นกับ

ลักษณะเฉพาะของโปรตีนแต่ละชนิดและภาวะที่ใช้ในการสกัด เช่น องค์ประกอบของระบบ, ความเป็นกรด-ด่างของระบบ ฯลฯ ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมนี้ โปรตีนที่ต้องการจะสะสมอยู่ในวัฏภาคบนในปริมาณมาก ขณะที่โปรตีนชนิดอื่น ๆ ที่เป็นสารปนเปื้อนจะถูกแยกไปในวัฏภาคล่าง จึงเป็นเหตุให้เกิดการสกัดโปรตีนที่ต้องการได้

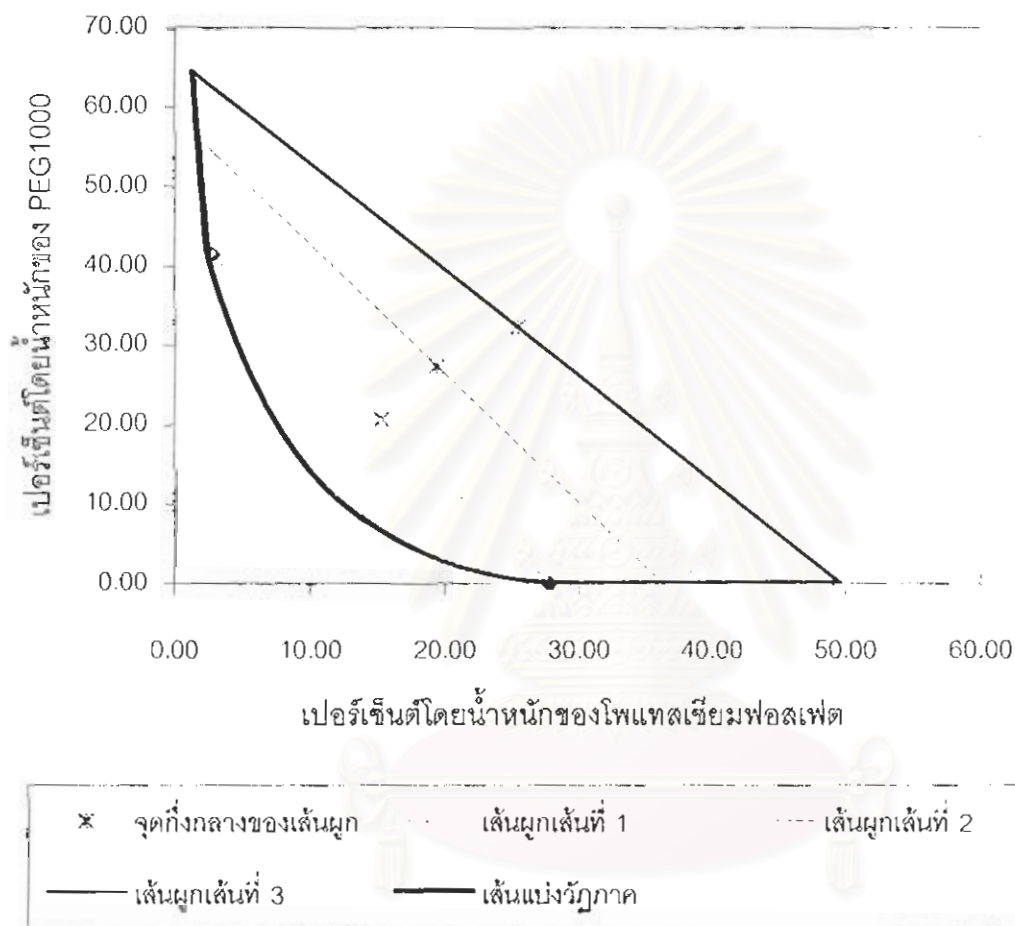
องค์ประกอบของระบบในแต่ละภาวะที่แสดงลักษณะวัฏภาคของระบบจะแสดงในรูปของแผนภาพวัฏภาค โดยจุดที่เป็นเส้นแบ่งวัฏภาค (binodal curve) จะเป็นจุดที่แสดงการเปลี่ยนแปลงวัฏภาคของระบบจากวัฏภาคเดียวเป็นสองวัฏภาค เส้นผกที่เชื่อมองค์ประกอบของวัฏภาคบนและวัฏภาคล่างในเส้นแบ่งวัฏภาคเป็นจุดที่อยู่ในภาวะสมดุล สารละลายผสมที่แสดงจุดบนเส้นผกเดียวกันจะมีองค์ประกอบของวัฏภาคบนและวัฏภาคล่างเหมือนกัน แต่มีปริมาตรในแต่ละวัฏภาคแตกต่างกัน ซึ่งระบบที่อยู่บนเส้นผกเดียวกันจะให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกเหมือนกัน แต่เปอร์เซ็นต์ผลได้จะต่างกันขึ้นกับสัดส่วนปริมาตรของระบบนั้นดังแสดงในสมการที่ 2.5

การกำหนดจุดที่ใช้ในการสกัดไอโซมจำเป็นต้องเลือกจุดที่มีความเหมาะสมและสัมพันธ์กับเส้นแบ่งวัฏภาค การเลือกจุดที่ไกลจากเส้นแบ่งวัฏภาคมาก ๆ หรือความยาวของเส้นผกมีค่ามาก นั่นคือระบบจะมีความเข้มข้นของพอลิเมอร์และเกลือสูง ซึ่งอาจทำให้โปรตีนตกตะกอนได้ในขณะที่จุดที่มีค่าใกล้กับเส้นแบ่งวัฏภาคมากเกินไป เมื่อมีการเจือจางระบบเพียงเล็กน้อย อาจทำให้องค์ประกอบของระบบเปลี่ยนแปลงไปจนทำให้สารละลายมีลักษณะเป็นวัฏภาคเดียว ซึ่งไม่สามารถทำการสกัดได้ ดังนั้นในการขยายระดับการผลิตและการใช้ประโยชน์ของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในอุตสาหกรรม จะต้องเลือกระบบที่มีเสถียรภาพสูงพอที่จะเปลี่ยนแปลงค่าในการผลิตได้โดยไม่ทำลายระบบให้เกิดเป็นระบบที่มีวัฏภาคเดียว ระบบที่มีความเสถียรนี้จะแสดงในรูปของความยาวของเส้นผก (Zaslavsky, 1995) โดยที่ความยาวของเส้นผกบอกระดับความแตกต่างขององค์ประกอบของวัฏภาคที่อยู่ร่วมกัน

5.2.1 แผนภาพวัฏภาคที่ได้จากการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ PEG1000 / โปแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ โดยภาวะที่ใช้ในการทดลองคือ ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) และความดันบรรยากาศ ทำการแปรค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเป็น 4 ค่าคือ 7.5, 8.5, 9.5 และ 10.5 และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 4 ค่าคือ 0, 4, 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ซึ่งในแต่ละ

จะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ใช้ในการศึกษาค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลไนท์ที่เอสต่อไป รูปที่ 5.1 แสดงแผนภาพวิถีภาคของระบบ PEG1000 / โพลีเอทิลีนฟอสเฟต / น้ำ ที่ได้จากการทดลองในภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5 และเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0 สำหรับแผนภาพวิถีภาคของระบบในภาวะอื่น ๆ ที่ทำการทดลองแสดงในภาคผนวก ข



รูปที่ 5.1 แผนภาพวิถีภาคของระบบ PEG1000 / โพลีเอทิลีนฟอสเฟต / น้ำ ที่ 0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ

จากแผนภาพวิถีภาคของระบบ PEG1000 / โพลีเอทิลีนฟอสเฟต / น้ำ ที่เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์และค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ กันทั้ง 16 ภาวะที่ทำการทดลอง พบว่าในวิถีภาคบนจะมีองค์ประกอบของ PEG อยู่มาก ในขณะที่ความเข้มข้นของโพลีเอทิลีนฟอสเฟตในวิถีภาคล่างมีค่ามาก และความหนืดของสารละลายในวิถีภาคบนมีค่าสูงกว่าในวิถีภาคล่าง โดยค่าความหนืดดังกล่าวแปรผันตามความเข้มข้นของ PEG ที่มีในวิถีภาคนั้น (สังเกตได้จากการทดลอง)

เส้นผูกทั้ง 3 เส้นที่ได้จากการแปรความเข้มข้นเริ่มต้นของ PEG ต่าง ๆ กันและทำให้เกิดการแยกวัฏภาคด้วยการเติมโพแทสเซียมฟอสเฟต จนได้ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบตามที่ต้องการ ซึ่งความยาวของเส้นผูกที่แตกต่างกันทั้ง 3 เส้นในแต่ละภาวะการทดลองเป็นปัจจัยหนึ่งที่ใช้ในการหาค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลโนไฟรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 โดยเลือกจุดกึ่งกลางของเส้นผูกแต่ละเส้นเป็นองค์ประกอบของระบบที่ใช้ในการทดลอง เนื่องจากทุกภาวะที่อยู่บนเส้นผูกเดียวกันนี้จะให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกเท่ากัน การเลือกจุดที่อยู่กึ่งกลางเส้นผูกจึงเป็นการเลือกระบบที่ให้ปริมาณของวัฏภาคทั้งสองใกล้เคียงกันมากที่สุด

เนื่องจากองค์ประกอบของสารในวัฏภาคบนและล่างเป็นค่า ๆ หนึ่งที่อยู่บนเส้นแบ่งวัฏภาค ซึ่งหาค่าองค์ประกอบนั้นได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC ส่วนจุดที่แสดงเส้นแบ่งวัฏภาคหาได้จากการไตเตรทสารละลายสองวัฏภาค (ขุ่น) ให้เป็นสารละลายวัฏภาคเดียว (ใส) ซึ่ง Sebastiao, Cabral และ Aires-Barros (1995) พบว่าวิธีการที่แตกต่างกันนี้ไม่มีผลต่อเส้นแบ่งวัฏภาคของระบบ จึงสามารถลากจุดเชื่อมระหว่างค่าที่ได้จากการไตเตรทและการวิเคราะห์ด้วย HPLC ได้

5.2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะของเส้นแบ่งวัฏภาค

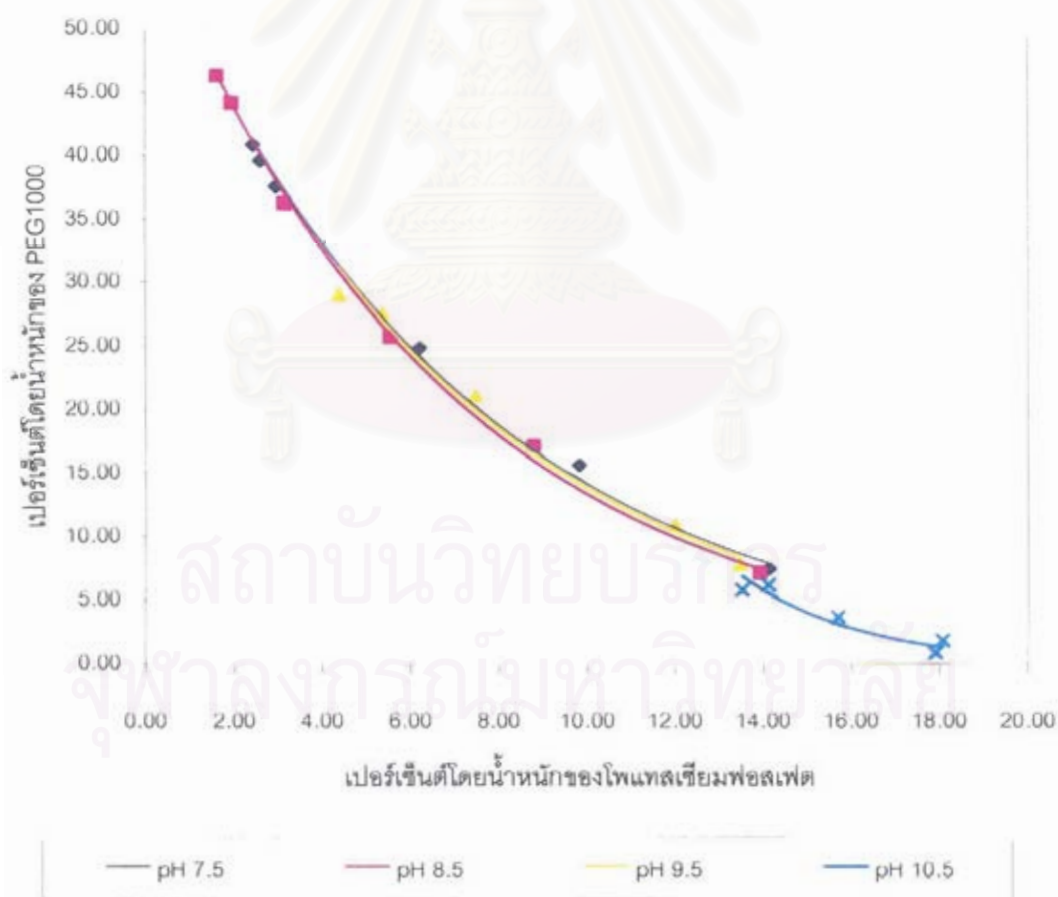
การแยกวัฏภาคที่เกิดขึ้นในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคจะถูกควบคุมโดยลักษณะของโครงสร้างของน้ำภายในระบบ ซึ่งความสามารถของการละลายของตัวถูกละลาย (พอลิเมอร์ 2 ชนิด หรือพอลิเมอร์กับเกลือ) ในตัวทำละลายน้ำขึ้นกับพารามิเตอร์ 2 ชนิดคือ ลักษณะโมเลกุลของตัวถูกละลาย (structural parameters) และแรงที่กระทำระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายกับตัวทำละลาย (interaction parameters) ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของน้ำ จึงทำให้ระบบที่มีพารามิเตอร์ทั้งสองต่างกันจะเกิดการแยกวัฏภาคต่างกันด้วย นอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่มีผลต่อการรบกวนโครงสร้างของน้ำในระบบเช่น อุณหภูมิ, ชนิดของตัวถูกละลาย, น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์, ยูเรีย, สารเติมแต่งที่เป็นเกลืออนินทรีย์ เช่น โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (Zaslavsky, 1995) ดังนั้นปัจจัยดังกล่าวจึงมีอิทธิพลต่อการแยกวัฏภาคของระบบด้วย โดยมีแผนภาพวัฏภาคเป็นสิ่งที่ใช้ในการอธิบายโครงสร้างของระบบที่เป็นสองวัฏภาคที่เกิดขึ้น

ภาวะที่ทำการทดลองสำหรับงานวิจัยนี้ ได้มีการแปรค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบและเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ กัน ซึ่งผลของค่าดังกล่าวที่มีต่อลักษณะของเส้นแบ่งวัฏภาคที่ได้จากการทดลองจะกล่าวถึงต่อไป โดยทั่วไปแล้วการศึกษาเกี่ยวกับระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคมักไม่ค่อยมีการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะของเส้นแบ่งวัฏภาค เนื่อง

จากจุดประสงค์หลักของการศึกษาระบบดังกล่าวนี้คือ ต้องการทราบค่าสัมประสิทธิ์การแยกของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้ ตัวแปรที่ทำการศึกษาค้นคว้าส่วนใหญ่จึงเป็นตัวแปรที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกซึ่งบอกถึงประสิทธิภาพของระบบในภาวะที่ทำการทดลอง

5.2.2.1 อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบต่อเส้นแบ่งวัฏภาค

จากการทดลองที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ กัน ระบบจะเกิดการแบ่งเป็น 2 วัฏภาคต่างกันด้วยเนื่องจากคุณสมบัติทางเคมีของระบบเปลี่ยนไป ผลจากการทดลองที่ศึกษาระบบซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่างกัน และมีเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์เท่ากันนี้ แสดงในรูปที่ 5.2 ซึ่งเป็นระบบที่มีเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0 ส่วนผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบต่อเส้นแบ่งวัฏภาคที่มีเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 4, 7 และ 10 แสดงในภาคผนวก ค



รูปที่ 5.2 แสดงเส้นแบ่งวัฏภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมซัลเฟต / น้ำ ที่ 0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ

จากรูปที่ 5.2 และรูปในภาคผนวก ค ที่แสดงอิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ต่างของระบบที่มีต่อเส้นแบ่งวัฏภาคที่ทำการทดลองในภาวะต่าง ๆ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์ต่างกัน 4 ค่า พบว่า เส้นแบ่งวัฏภาคของระบบที่มีค่าความเป็นกรด-ต่างต่างกันนี้มีค่าใกล้เคียงกันมากจนอาจกล่าวได้ว่า ค่าความเป็นกรด-ต่างของระบบที่แตกต่างกันในช่วงที่ทำการทดลองนี้มีผลน้อยมากหรือไม่มีผลต่อเส้นแบ่งวัฏภาค แต่ในขณะเดียวกันช่วงของค่าความเป็นกรด-ต่างดังกล่าวมีความแตกต่างกันไม่มากนัก ซึ่งอาจทำให้ผลที่ได้ไม่ชัดเจนเท่าที่ควร อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sebastiao, Cabral และ Aires-Barros (1994) ซึ่งศึกษาอิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ต่างที่มีค่าเท่ากับ 6.0, 7.5 และ 9.0 ที่มีต่อลักษณะของเส้นแบ่งวัฏภาคในระบบ PEG1000 / โพลีเอทิลีนออกไซด์ / น้ำ ที่อุณหภูมิ 24±1 องศาเซลเซียส

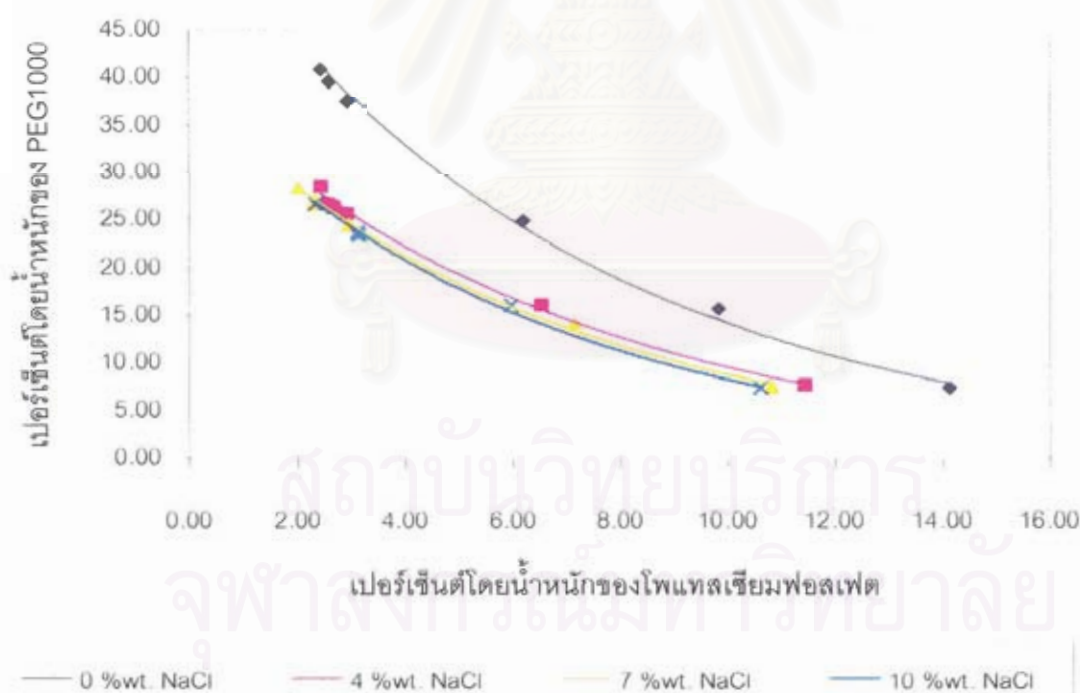
ความแตกต่างเพียงเล็กน้อยของเส้นแบ่งวัฏภาคที่เกิดขึ้นในการทดลองที่ค่าความเป็นกรด-ต่างต่างกันนี้ อาจมีผลมาจากความเข้มข้นของโพลีเอทิลีนออกไซด์ที่ใช้เป็นตัวกำหนดค่าความเป็นกรด-ต่างของระบบต่างกัน ซึ่งความเข้มข้นที่ต่างกันย่อมมีผลต่อโครงสร้างของน้ำภายในระบบต่างกันด้วย ลักษณะการแยกวัฏภาคของระบบในแต่ละภาวะจึงแสดงผลออกมาในลักษณะดังที่เห็น

5.2.2.2 อิทธิพลของโซเดียมคลอไรด์ต่อเส้นแบ่งวัฏภาค

ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งที่ไม่ประจุ (non-ionic polymer) กับเกลือที่มีลักษณะเป็น water-structure-making เช่น ในระบบ PEG 1000 / โพลีเอทิลีนออกไซด์ / น้ำ ที่ทำการศึกษานี้ จะเกิดการแยกวัฏภาคได้ที่อุณหภูมิห้องและถือว่าระบบดังกล่าวเป็นการผสมกันระหว่างสารละลาย 2 ชนิดคือ สารละลายพอลิเมอร์และสารละลายเกลือ ซึ่งการแยกวัฏภาคเกิดจากความแตกต่างของโครงสร้างของน้ำที่เกิดจากโมเลกุลของตัวถูกละลายดังกล่าวมาแล้ว การเติมเกลืออนินทรีย์เช่น โซเดียมคลอไรด์ ลงไปในระบบมีผลต่อโครงสร้างของตัวทำละลายน้ำที่มีในระบบ องค์ประกอบของระบบที่ทำให้เกิดการแยกวัฏภาคจึงเปลี่ยนไป ดังนั้นโซเดียมคลอไรด์จึงมีผลต่อเส้นแบ่งวัฏภาคของระบบด้วย

รูปที่ 5.3 แสดงเส้นแบ่งวัฏภาคของระบบ PEG1000 / โพลีเอทิลีนออกไซด์ / น้ำ ที่ได้จากการทดลองเมื่อใช้เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์ต่างกัน 4 ค่าคือ 0, 4, 7 และ 10 ในขณะที่ค่าความเป็นกรด-ต่างของระบบเท่ากันที่ 7.5 สำหรับผลของโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อ

เส้นแบ่งวัฏภาคในภาวะที่ค่าความเป็นกรด-ต่างเท่ากับ 8.5, 9.5 และ 10.5 แสดงในภาคผนวก ซึ่งในทุกภาวะการทดลองที่มีค่าความเป็นกรด-ต่างต่างกันนี้ ได้ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อเส้นแบ่งวัฏภาคเป็นไปในลักษณะเดียวกันดังที่เห็นในรูป คือ เมื่อมีการเติมโซเดียมคลอไรด์ลงในระบบ จะทำให้ระบบเกิดการแยกวัฏภาคเปลี่ยนแปลงไป โดยมีความต้องการใช้ปริมาณ PEG1000 และ โพลีเอทิลีนไกลคอลที่ทำให้เกิดการแยกเป็นสองวัฏภาคน้อยลง สังเกตได้จากเส้นแบ่งวัฏภาคที่มีลักษณะเข้าใกล้จุดกำเนิดมากขึ้น นอกจากนี้ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น (ที่ 4, 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) จะมีผลต่อเส้นแบ่งวัฏภาคด้วย แต่ไม่มากเท่ากับระบบที่ไม่มีและมีการเติมโซเดียมคลอไรด์ (ที่ 0 และ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) แสดงว่าโซเดียมคลอไรด์มีผลต่อองค์ประกอบโดยรวมในทั้งสองวัฏภาคค่อนข้างมาก ในขณะที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อเส้นแบ่งวัฏภาคไม่มากนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ปริมาณโซเดียมคลอไรด์สูง ๆ (ที่ 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ซึ่งอิทธิพลของโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อเส้นแบ่งวัฏภาคที่ได้จากการทดลองในภาวะที่ทำการวิจัยนี้มีลักษณะเช่นเดียวกับการทดลองของ Mistry และคณะ (1996) ที่ศึกษาในระบบ PEG4000 / โพลีเอทิลีนไกลคอล / น้ำ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส



รูปที่ 5.3 แสดงเส้นแบ่งวัฏภาคของระบบ PEG1000 / โพลีเอทิลีนไกลคอล / น้ำ ที่ค่าความเป็นกรด-ต่างเท่ากับ 7.5, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และ ที่ความดันบรรยากาศ

5.3 คำสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โพธิเอสจาก *B. subtilis* NS 99

พฤติกรรมของการแยกตัวถูกละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค อธิบายได้ใน 2 กลไก ดังนี้

1. การแยกตัวถูกละลายเกิดจากแรงจากการดึงดูดหรือการผลักระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายกับพอลิเมอร์ (และเกลือ) ที่มีในวัฏภาค (Brooks, Sharp และ Fisher, 1985 อ้างถึงใน Zaslavsky, 1995)

2. การแยกตัวถูกละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคเกิดจากความแตกต่างของแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายกับสารละลายน้ำที่แตกต่างกันในวัฏภาคทั้งสองของระบบ (Zaslavsky และ Masimov, 1988 อ้างถึงใน Zaslavsky, 1995)

อย่างไรก็ตามลักษณะพื้นฐานของการแยกตัวถูกละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคจะคล้ายกับระบบน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ (aqueous-organic two-phase system) ซึ่งขึ้นกับแรงที่กระทำระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายกับตัวทำละลายในระบบ แต่ความแตกต่างเพียงเล็กน้อยของลักษณะตัวทำละลายในวัฏภาคทั้งสองของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคเป็นสิ่งสำคัญในการแยกตัวถูกละลายที่มีโครงสร้างที่ไม่แตกต่างกันมากนักได้ จึงเป็นข้อได้เปรียบในการแยกสารที่เฉพาะเจาะจงกว่าระบบอื่น ๆ (Zaslavsky, 1995)

แรงที่กระทำระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายที่ไม่มีขั้วกับสารละลายน้ำเป็นแรงแวนเดอร์วาล ส่วนตัวถูกละลายที่มีขั้วจะมีแรงกระทำต่อน้ำซึ่งมีความเฉพาะเจาะจงสูง เช่น แรงไดโพล-ไดโพล, ไดโพล-อินดิวิสต์ ไดโพล, พันธะไฮโดรเจน ฯลฯ สำหรับตัวถูกละลายหรืออนุภาคทางชีวภาพส่วนมากจะถูกแยกในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีประจุ ตัวถูกละลายที่สามารถแตกตัวเป็นไอออนได้เช่น เอนไซม์ จะมีแรงกระทำระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายกับตัวทำละลายเป็นแรงทางไฟฟ้าระหว่างไอออน-ไอออนและไอออน-ไดโพลรวมอยู่ด้วย ซึ่งแรงที่กระทำระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายกับตัวทำละลายที่แตกต่างกันในระบบนี้ จะทำให้พฤติกรรมของการแยกของตัวถูกละลายในระบบแตกต่างกันด้วย

การสกัดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการออกจากสารปนเปื้อนด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคทำได้โดยเตรียมระบบสองวัฏภาคที่องค์ประกอบต่าง ๆ กัน และเติมสารละลายผสมของผลิตภัณฑ์ลง

ไปในระบบ หลังจากผสมระบบให้เข้ากันดีแล้วจะตั้งทิ้งไว้หรือนำไปหมუნเหวียงด้วยความเร็ว เพื่อให้เกิดการแยกวัฏภาค และผลิตภัณฑ์ที่ต้องการจะถูกแยกไปในวัฏภาคใดวัฏภาคหนึ่งตาม ความชอบซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของตัวมันเอง ในขณะที่สารปนเปื้อนจะถูกแยกไปในอีกวัฏภาค หนึ่ง พารามิเตอร์ที่แสดงถึงประสิทธิภาพของระบบในการสกัดเอนไซม์หรือผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ คือ ค่าสัมประสิทธิ์การแยก (partition coefficient, K) ในระบบที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสูง ต้องมีค่าสัมประสิทธิ์การแยกของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสูง ($K_{\text{target}} \gg 1$) ขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์การ แยกขององค์ประกอบอื่นๆ ที่มีในสารละลายผสม (K_i) มีค่าน้อยมากๆ ($K_i \ll 1$) การสกัดจะให้ ผลดีเช่นกันในกรณีที่ $K_{\text{target}} \ll 1$ และ $K_i \gg 1$

พฤติกรรมของการแยกตัวถูกละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคขึ้นกับปัจจัยหลายชนิด ด้วยกัน ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการแยกตัวถูกละลายดังกล่าวแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ ปัจจัยที่มี ผลต่อลักษณะของตัวทำละลายในทั้งสองวัฏภาคและ ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของตัวถูกละลาย ที่มีความสำคัญต่อแรงกระทำระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายกับตัวทำละลายน้ำที่มีในวัฏภาคทั้ง สอง ดังแสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกตัวถูกละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

(Zaslavsky, 1995)

ปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะของตัวทำละลาย	ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของตัวถูกละลาย
ชนิดของพอลิเมอร์ทั้งสองต่อการเกิดวัฏภาค ¹	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
น้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ทั้งสองต่อการเกิดวัฏภาค ¹	ชนิดของสารเติมแต่ง ²
ความเข้มข้นของพอลิเมอร์ทั้งสองต่อการเกิดวัฏภาค ¹	ความเข้มข้นของสารเติมแต่ง ²
ชนิดของสารเติมแต่ง ²	การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของสารเติมแต่ง ³
ความเข้มข้นของสารเติมแต่ง ²	การปรับตัวของโครงสร้าง ⁴
อุณหภูมิ	

¹ ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ใช้พอลิเมอร์ชนิดหนึ่งกับเกลือ ชนิดและความเข้มข้นของเกลือที่ทำให้เกิดวัฏภาค เป็นปัจจัยมีผลเท่า ๆ กับการเกิดวัฏภาคในระบบที่ใช้พอลิเมอร์ 2 ชนิด

² สารเติมแต่งที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น เกลืออนินทรีย์, แซคคาไรด์, ยูเรีย ฯลฯ ที่ไม่มีสัมพรรคภาพเฉพาะ (specific affinity) ต่อตัวถูกละลาย

³ ลิแกนด์ที่มีสัมพรรคภาพ (affinity ligands) เช่น ยา, สี่ไทรอะซีน, กรดไขมัน ฯลฯ

⁴ การเปลี่ยนแปลงทางเคมี, จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ ฯลฯ การตัด การรวมตัวกันหรือการเปลี่ยนโครงสร้างของ ตัวทำละลายที่อยู่ในโมเลกุลของตัวถูกละลาย

ปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะของตัวทำละลายในวัฏภาคทั้งสองดังแสดงในตารางที่ 5.1 โดยทั่วไปจะศึกษาความเข้มข้นและน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ (หรือความเข้มข้นของเกลือ) ที่ทำให้เกิดการแยกวัฏภาค รวมถึงชนิดและความเข้มข้นของสารเติมแต่ง ซึ่งนิยมใช้เกลืออนินทรีย์ อย่างไรก็ตามปัจจัยบางชนิดมีผลต่อทั้ง 2 ประเภท จึงเป็นการยุ่งยากในการทำนายค่าอิทธิพลที่ได้จากปัจจัยเหล่านี้

ค่าสัมประสิทธิ์การแยก (K) ของระบบซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงประสิทธิภาพของระบบ พบว่ามีอิทธิพลมาจากแรงหลาย ๆ ประเภทด้วยกัน ซึ่งเขียนเป็นสมการได้ดังสมการที่ 5.1 (Albertsson, 1986 อ้างถึงใน Cabral และ Aires-Barros, 1993)

$$\ln K = \ln K_{el} + \ln K_{hfob} + \ln K_{hfil} + \ln K_{conf} + \ln K_{lig} \quad (5.1)$$

เมื่อ $\ln K_{el}$, $\ln K_{hfob}$, $\ln K_{hfil}$, $\ln K_{conf}$ และ $\ln K_{lig}$ เป็นค่าสัมประสิทธิ์การแยกที่มีผลจากอิทธิพลของแรงทางไฟฟ้า, แรงไฮโดรโฟบิก, แรงไฮโดรฟิลิก, โครงสร้างของตัวถูกละลายและแรงที่กระทำต่อลิแกนด์ ตามลำดับ

ในงานวิจัยนี้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกตัวถูกละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในรูปของความยาวของเส้นผูก ซึ่งเป็นการเปลี่ยนองค์ประกอบของระบบในทั้งสองวัฏภาค, ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบและปริมาณโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งเป็นสารเติมแต่งที่เติมลงไปในระบบ ค่าสัมประสิทธิ์การแยกและเปอร์เซ็นต์ผลได้ของแอลคาไลโนไฟรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 ในระบบ PEG1000 / โปแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ในภาวะที่ทำการทดลองแสดงในตารางที่ 5.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.2 ค่าสัมประสิทธิ์การแยกและเปอร์เซ็นต์ผลได้ของแอลคาไลน์โพรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 ในระบบ PEG1000 / โพลแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ภาวะต่าง ๆ

X*	Y*	องค์ประกอบของระบบ (%w/w)		ความเข้มข้นของเอนไซม์ (U/ml)		TLL (%w/w)	K (C _T / C _B)	Yield (%)
		PEG 1000	โพลแทสเซียม ฟอสเฟต	วัฏภาคบน (C _T)	วัฏภาคล่าง (C _B)			
0	7.5	20.70	15.29	0.1118	0.0636	48.38	2.00	69.3
		27.39	19.41	0.0132	0.0724	64.30	0.89	57.2
		32.31	25.48	0.0110	0.1031	80.79	0.11	25.7
0	8.5	20.68	13.98	0.0789	0.0066	47.10	12.0	94.9
		25.78	20.12	0.0482	0.0219	63.38	1.72	66.6
		31.87	24.54	0.0658	0.0439	79.89	1.40	68.6
0	9.5	18.00	13.01	0.0439	0.0022	41.26	20.0	95.1
		21.86	14.95	0.0329	0.0241	50.91	1.36	61.0
		22.92	15.82	0.0088	0.0285	53.79	0.56	42.5
0	10.5	37.72	27.43	0.1184	0.0132	92.01	15.3	95.0
		38.63	31.17	0.0592	0.0088	97.94	9.00	92.6
		42.90	37.77	0.0724	0.0132	114.31	5.50	87.6
4	7.5	21.00	17.05	0.0373	0.0197	53.20	1.89	69.4
		26.01	20.36	0.0088	0.0154	65.20	0.57	46.9
		30.69	24.46	0.0088	0.0482	78.06	0.18	19.7
4	8.5	23.68	20.23	0.0285	0.0088	61.23	3.25	77.8
		26.77	20.85	0.0132	0.0811	67.75	0.68	48.4
		30.60	24.03	0.0022	0.0373	77.81	0.16	17.3
4	9.5	22.65	10.52	0.0241	0.0066	49.64	3.67	86.0
		25.35	11.80	0.0022	0.0241	55.66	0.09	13.9
		25.77	13.46	0.0022	0.0285	57.89	0.08	11.5
4	10.5	40.95	16.73	0.0768	0.0044	87.75	13.1	97.0
		42.00	19.65	0.0307	0.0110	92.13	2.25	81.8
		42.60	23.17	0.0460	0.0417	96.34	1.10	65.8

* X คือ เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์

Y คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบ

ตารางที่ 5.2 ค่าสัมประสิทธิ์การแยกและเปอร์เซ็นต์ผลได้ของแอลคาไลนีโพรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 ในระบบ PEG1000 / โพลีเอทิลีนฟอสเฟต / น้ำ ที่ภาวะต่าง ๆ (ต่อ)

X*	Y*	องค์ประกอบของระบบ (%w/w)		ความเข้มข้นของเอนไซม์ (U/ml)		TLL (%w/w)	K (C _T / C _B)	Yield (%)
		PEG 1000	โพลีเอทิลีน ฟอสเฟต	วัฏภาคบน (C _T)	วัฏภาคล่าง (C _B)			
7	7.5	21.02	10.42	0.0285	0.0241	45.77	1.18	64.6
		30.02	14.52	0.0066	0.0154	65.65	0.43	42.1
		30.80	17.19	0.0044	0.0132	69.49	0.25	29.8
7	8.5	22.99	11.96	0.0088	0.0022	50.71	4.00	85.9
		28.64	15.28	0.0263	0.0088	64.14	2.88	81.0
		30.79	20.81	0.0241	0.0504	73.44	0.49	36.0
7	9.5	22.99	11.73	0.0175	0.0044	50.92	4.00	85.1
		24.46	12.45	0.0241	0.0439	54.36	0.50	38.6
		26.01	12.77	0.0197	0.0482	57.51	0.41	38.6
7	10.5	40.87	19.04	0.0329	0.0022	89.48	15.0	97.2
		41.14	20.79	0.0877	0.0154	91.59	5.71	91.1
		41.89	22.24	0.0504	0.0373	94.36	1.35	73.6
10	7.5	22.38	9.78	0.0110	0.0307	47.68	0.36	34.6
		27.06	12.21	0.0022	0.0175	58.34	0.12	15.8
10	8.5	23.28	9.37	0.0132	0.0132	49.06	1.00	62.7
		30.53	14.92	0.0285	0.0373	66.90	0.76	55.8
10	9.5	25.55	10.06	0.0110	0.0022	54.40	5.00	89.5
		28.15	13.60	0.0197	0.0241	62.04	0.82	56.0
		33.63	19.17	0.0044	0.0417	76.94	0.10	14.0
10	10.5	37.82	19.66	0.0241	0.0022	84.49	3.14	86.4
		41.00	21.97	0.0088	0.0175	92.64	0.50	49.0
		42.43	27.47	0.0132	0.1075	100.68	0.12	19.0

* X คือ เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์

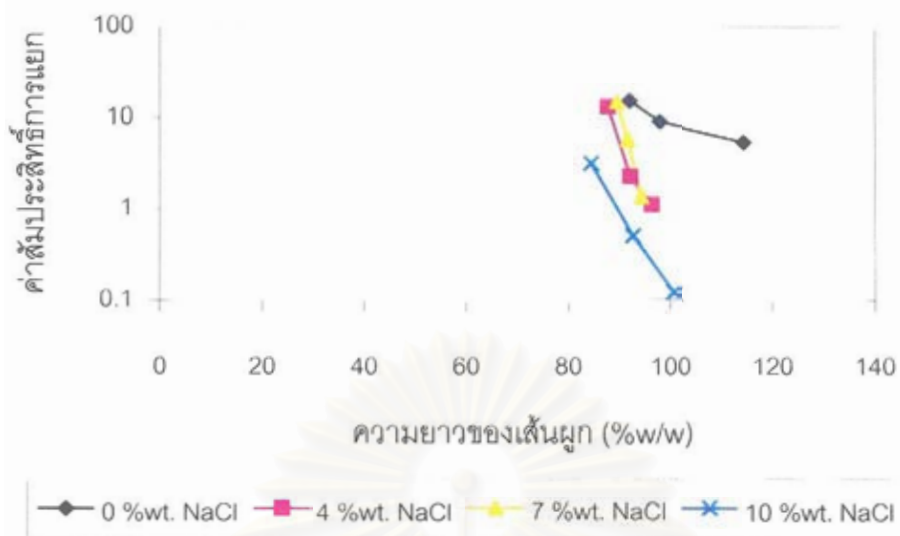
Y คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบ

5.3.1 ผลของความยาวของเส้นผูกต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก

ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบของ PEG และโพแทสเซียมฟอสเฟต ในวัฏภาคบนและล่างเหมือนกัน คือ ระบบที่อยู่บนเส้นผูกเดียวกันแต่มีสัดส่วนปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างต่างกัน ในงานวิจัยนี้เลือกใช้จุดที่เป็นจุดกึ่งกลางของเส้นผูกในภาวะต่าง ๆ เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 จุดที่มีความยาวของเส้นผูกน้อยที่สุด คือ จุดที่มีองค์ประกอบของ PEG และโพแทสเซียมฟอสเฟตน้อยที่สุด และจะให้ความเข้มข้นของสารทั้งสองเพิ่มขึ้นที่ความยาวของเส้นผูกมากขึ้น ดังแสดงในแผนภาพวัฏภาค ซึ่งความเข้มข้นของสารที่ใช้ในระบบจะมีผลต่อลักษณะของระบบที่เกิดขึ้น การเพิ่มความยาวของเส้นผูกแสดงถึงการเพิ่มความเข้มข้นของฟอสเฟตในวัฏภาคล่าง ในขณะที่ความเข้มข้นของฟอสเฟตในวัฏภาคบนจะมีค่าค่อนข้างคงที่และมีขีดจำกัดในการละลายในวัฏภาคบนซึ่งมี PEG อยู่มาก (Sarmiento และคณะ, 1994) เมื่อในวัฏภาคล่างมีความเข้มข้นของฟอสเฟตอยู่มากจะเกิดการ salting-out ของโปรตีน โดยเกิดการกระจายของโมเลกุลของโปรตีนที่มีในวัฏภาคล่างไปในวัฏภาคบนมากขึ้น

Forciniti, Hall และ Kula (1991) ทำการทดลองหาค่าสัมประสิทธิ์การแยกของไลโซไซม์, อัลบูมิน, ไคโมทริปซินในเจน เอ, ทรานเพอรินและคะตะเลสในระบบ PEG / เด็กซ์แทรน / น้ำ พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีนบางชนิดที่มีค่ามากกว่า 1 จะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความยาวของเส้นผูกเพิ่มขึ้น คือ มีการสะสมในวัฏภาคบนได้มากขึ้น ในขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์การแยกที่มีค่าน้อยกว่า 1 จะมีค่าลดลงเมื่อความยาวของเส้นผูกเพิ่มขึ้น แสดงว่ามีการสะสมในวัฏภาคล่างได้มากขึ้น นั่นคือ ความยาวของเส้นผูกที่เพิ่มขึ้นจะมีแนวโน้มในการแยกโปรตีนไปในวัฏภาคใดวัฏภาคหนึ่งได้มากขึ้น

สำหรับผลการทดลองหาค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 ในระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ทำในงานวิจัยนี้ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 5.2 และเมื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของความยาวของเส้นผูกที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกเมื่อระบบมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5 ที่เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ กันแสดงในรูปที่ 5.4 และผลของความยาวของเส้นผูกที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกเมื่อระบบมีเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ กันแสดงในรูปที่ 5.5



รูปที่ 5.4 ผลของความยาวของเส้นฉูกต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก
ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส
และที่ความดันบรรยากาศ



รูปที่ 5.5 ผลของความยาวของเส้นฉูกต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก
ที่เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 0,
อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียสและที่ความดันบรรยากาศ

จากรูปที่ 5.4 และ 5.5 พบว่าเมื่อความยาวของเส้นผูกเพิ่มขึ้น ทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลโนโพรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 ในระบบ PEG / โพลีแซ็กคาไรด์ / น้ำ มีค่าลดลง นอกจากนี้อิทธิพลของความยาวของเส้นผูกที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกในโปรตีนที่มีขนาดเล็ก (เช่น ไลโซไซม์และโคโมทริบซิโนเจน เอ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 13,200 และ 23,200 Da ตามลำดับ) จะมีค่าน้อยมากตามที่ได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 3 (หัวข้อ 3.3.6) สำหรับ แอลคาไลโนโพรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 27,000 Da แต่ให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกแตกต่างกันมาก ดังแสดงในรูปที่ 5.4 และ 5.5 ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวแตกต่างจากผลการทดลองของ Forciniti, Hall และ Kula (1991) ที่ศึกษาการสกัดโปรตีนทั้ง 5 ชนิดในระบบ PEG / เด็กซ์แทรน / น้ำ ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว อย่างไรก็ตามความยาวของเส้นผูกที่แตกต่างกันในระบบทั้งสอง (PEG / โพลีแซ็กคาไรด์ / น้ำ และ PEG / เด็กซ์แทรน / น้ำ) อาจมีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีนที่ทำการศึกษา สำหรับผลของความยาวของเส้นผูกที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลโนโพรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 ในระบบ PEG / โพลีแซ็กคาไรด์ / น้ำ ที่ได้จากงานวิจัยนี้ สอดคล้องกับผลจากการทดลองของ Hotha และ Banik (1997) ที่ศึกษาการสกัดแอลคาไลโนโพรทีเอสในระบบ PEG / โพลีแซ็กคาไรด์ / น้ำ ซึ่งมีลักษณะขององค์ประกอบของระบบและตัวถูกละลายใกล้เคียงกับระบบที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เปรียบเทียบผลดังกล่าวกับผลที่ได้จากงานวิจัยนี้แสดงในตารางที่ 5.3

ตารางที่ 5.3 ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอสในระบบ PEG / โฟสเฟต / น้ำ ที่อุณหภูมิห้อง

MW. ของ PEG	เส้นผูก เส้นที่	องค์ประกอบของระบบ (%w/w)		K	เอกสารอ้างอิง
		PEG	โฟสเฟตเชื่อมฟอสเฟต		
9000	1	14.60	9.42	2.274	Hotha และ Banik, 1997
	2	15.05	9.45	1.622	
	3	15.45	9.48	1.439	
6000	1	14.30	11.25	3.824	
	2	14.60	11.43	2.596	
	3	15.00	11.55	2.213	
4000	1	13.60	13.75	4.976	
	2	14.40	13.75	3.492	
	3	15.00	13.75	3.373	
1000	1	20.68	13.98	12.0	ผลจากงานวิจัยนี้ (ความเป็นกรด-ต่างเท่ากับ 8.5)
	2	25.78	20.12	1.72	
	3	31.87	24.54	1.40	

เมื่อความยาวของเส้นผูกเส้นที่ $1 < 2 < 3$

แสดงว่ามีปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก เช่น องค์ประกอบของระบบที่เป็นพอลิเมอร์ 2 ชนิดหรือพอลิเมอร์กับเกลือ รวมถึงชนิดของโปรตีนหรือเอนไซม์ที่ต้องการสกัด ซึ่งในการศึกษาผลของความยาวของเส้นผูกที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกยังมีไม่มากนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบที่เป็น PEG / โฟสเฟตเชื่อมฟอสเฟต / น้ำ ที่ใช้ในการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอส ดังนั้นจึงยังไม่สามารถสรุปเป็นข้อสรุปโดยทั่วไปได้ ผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลหนึ่งที่ใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาระบบต่อไปได้

5.3.2 ผลของความเป็นกรด-ต่างต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก

ความเป็นกรด-ต่างของระบบมีผลโดยตรงต่อคุณสมบัติของตัวถูกละลายในระบบ (ดังแสดงในตารางที่ 5.1) โดยเฉพาะตัวถูกละลายไอออนิก ซึ่งจะมีผลต่อประจุรวมของโมเลกุลของตัวถูกละลาย จึงทำให้มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 ในระบบ PEG1000 / โฟสเฟตเชื่อมฟอสเฟต / น้ำ เป็นอย่างมาก โดยทั่วไปค่าสัมประสิทธิ์การแยกจะขึ้นกับองค์ประกอบหลัก 2 ส่วนด้วยกัน ดังแสดงในสมการ 5.2 (Tanuja และคณะ, 1997)

$$\log K = \log K_0 + \log K_{ei} \quad (5.2)$$

เมื่อ K คือ ค่าสัมประสิทธิ์การแยก

$\log K_{ei}$ หาได้จากปัจจัยหลัก 2 ปัจจัยคือ ศักย์ไฟฟ้าที่อยู่ระหว่างภูมิภาค (interfacial potential) และประจุสุทธิของโปรตีน

$\log K_0$ เป็นการวัดแรงระหว่างโมเลกุลเมื่อไม่มีศักย์ไฟฟ้าเข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งเป็นการวัดภายใต้ภาวะที่ $\log K_{ei}$ มีค่าเท่ากับ 0 โดยเมื่อเทียบกับสมการ 5.1 คือ ผลรวมของ $\ln K_{hfob}$, $\ln K_{hfil}$, $\ln K_{conf}$ และ $\ln K_{lig}$ ในข้างขวาของสมการ

นอกจากนี้ในการทำนายค่าสัมประสิทธิ์การแยกเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบยังสามารถอธิบายได้จากสมการดังต่อไปนี้ (Zaslavsky, 1995)

$$\ln K = \ln K(0) + \gamma Z \quad (5.3)$$

เมื่อ $K(0)$ คือ ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของตัวถูกละลายโปรตีนที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเท่ากับจุดไอโซอิเล็กทริกของโปรตีนนั้น

Z คือ ประจุสุทธิของโปรตีน

γ คือ ลักษณะเฉพาะของโปรตีน ขึ้นกับพารามิเตอร์ภายนอก เช่น อุณหภูมิ, องค์ประกอบของพอลิเมอร์และเกลือในระบบ, สารเติมแต่งเกลือที่ใช้ ฯลฯ

พบว่าสมการที่ 5.2 และ 5.3 มีลักษณะคล้ายกัน โดยที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบจะมีผลต่อเทอม γZ หรือ $\log K_{ei}$ เท่านั้น คือ มีผลต่อประจุสุทธิของโปรตีน และเนื่องจาก γ มีความเฉพาะเจาะจงสูง ดังนั้นพารามิเตอร์ภายนอก เช่น อุณหภูมิ, องค์ประกอบของพอลิเมอร์และเกลือในระบบ, สารเติมแต่งเกลือที่ใช้ ฯลฯ ที่มีผลต่อลักษณะเฉพาะของโปรตีนจะมีอิทธิพลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกมากกว่าอิทธิพลจากประจุสุทธิของโปรตีน โดยพารามิเตอร์ดังกล่าวจะมีผลต่อศักย์ไฟฟ้าระหว่างภูมิภาคทั้งสอง อย่างไรก็ตาม สมการดังกล่าวจะทำนายผลได้ไม่ถูกต้องเสมอไป เนื่องจากต้องพิจารณาถึงแรงที่กระทำระหว่างโมเลกุลที่มีประจุและไม่มีประจุในตัวทำละลายน้ำของภูมิภาคทั้งสองด้วย ซึ่งแรงดังกล่าวจะเปลี่ยนไปเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของโมเลกุลที่มีประจุหรือไม่มีประจุ นอกจากนี้การเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบ ทำให้โครงสร้างโมเลกุลของตัวถูกละลายเปลี่ยนไปด้วย เช่น เกิดการรวมตัวกัน หรือแยกออกเป็นหน่วยย่อย ๆ และค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบที่ต่างกันยังแสดงถึงความเข้มข้นของเกลือที่ใช้ในระบบต่างกัน

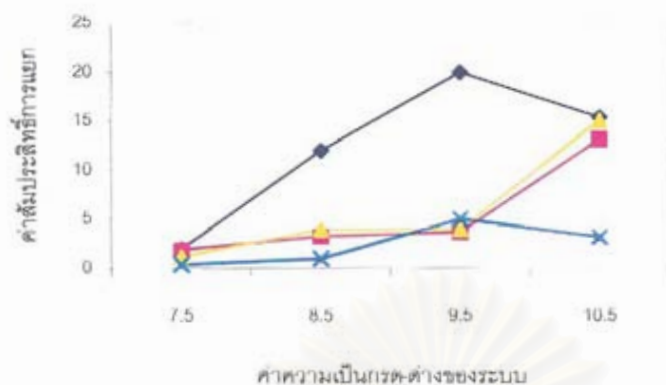
ด้วย จึงเป็นการแสดงผลร่วมกันของปัจจัยทั้งสองที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก การศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก จึงศึกษาจากการทดลองได้ง่ายกว่าการทำนายค่าจากทฤษฎี (Zaslavsky, 1995)

ผลการทดลองหาค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลไนโตรที่เอสจาก *B. subtilis* NS 99 ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ศึกษาในภาวะต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 5.2 เมื่อศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกเมื่อมีปริมาณโซเดียมคลอไรด์เท่ากัน ให้ผลดังรูปที่ 5.6

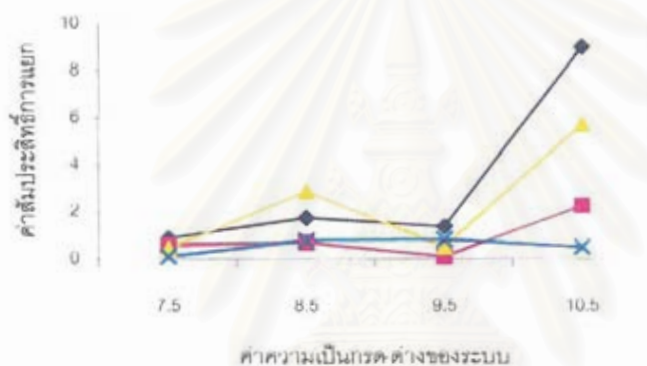


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

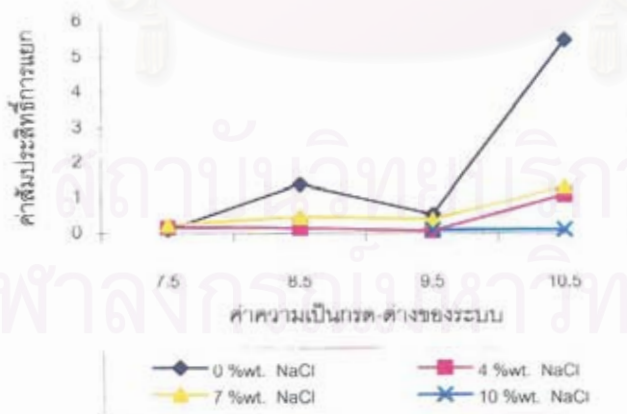
(ก)



(ข)



(ค)



รูปที่ 5.6 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก ที่ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ โดยที่ (ก), (ข) และ (ค) คือ ระบบของเส้นผูกเส้นที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ เมื่อความยาวของเส้นผูกเส้นที่ $1 < 2 < 3$

จากรูปที่ 5.6 พบว่าในระบบที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากัน การเพิ่มความ เป็นกรด-ด่างของระบบให้สูงขึ้น จะทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลโนโพรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 เพิ่มขึ้นด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบที่ไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ อธิบายได้ ว่า เมื่อความเป็นกรด-ด่างสูงขึ้น องค์ประกอบของฟอสเฟตจะมากขึ้น ซึ่งฟอสเฟตไอออนจะ สะสมอยู่ในวัฏภาคกลาง จึงทำให้วัฏภาคกลางมีประจุลบมากขึ้น ดังนั้นโปรตีนหรือเอนไซม์ที่มีประจุ ลบจึงถูกแยกไปอีกวัฏภาคหนึ่งได้มาก ค่าสัมประสิทธิ์การแยกจึงเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน ระบบที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่าจุดไอโซอิเล็กทริก (pI) ของโปรตีน สำหรับแอลคาไลโนโพรที- เอสทั่วไปมีจุดไอโซอิเล็กทริกประมาณ 9.0 (Owen, 1983) ดังนั้นในระบบที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง สูงกว่า 9.0 จึงทำให้โปรตีนมีประจุเป็นลบและถูกแยกไปอยู่ในวัฏภาคบนได้มากขึ้น ค่าสัมประสิทธิ์ การแยกจึงสูงขึ้น ซึ่งเห็นได้ชัดในระบบที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5 แต่อย่างไรก็ตามผล ดังกล่าวยังไม่ถูกต้องในทุกกรณีเนื่องจากค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบจะเป็นตัวกำหนดความ เข้มข้นของโพแทสเซียมฟอสเฟตในระบบด้วย และความเข้มข้นของโพแทสเซียมฟอสเฟตก็เป็น ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก ดังนั้นในการศึกษาถึงผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง ของระบบที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกจึงเป็นการศึกษาอิทธิพลร่วมกันของค่าความเป็นกรด-ด่าง ของระบบและความเข้มข้นของโพแทสเซียมฟอสเฟตที่ใช้ในระบบ นอกจากนี้แรงกระทำระหว่าง โมเลกุลชนิดต่าง ๆ นอกเหนือไปจากแรงทางไฟฟ้า และพาราเมเตอร์ภายนอกซึ่งมีผลต่อลักษณะ เฉพาะของโปรตีน จะมีอิทธิพลเหนือกว่าอิทธิพลจากค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์ การแยกดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะกล่าวถึงเฉพาะอิทธิพลจากค่าความเป็น กรด-ด่างของระบบที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก

5.3.3 ผลของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก

ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่เกิดจากพอลิเมอร์หรือเกล็ดชนิดเดียวกันและมีสารเติม แต่งเกล็ดชนิดเดียวกัน แต่มีความเข้มข้นของสารเติมแต่งเกล็ดต่างกัน ถ้าว่าเป็นระบบที่แตกต่าง กัน ดังนั้นค่าสัมประสิทธิ์การแยกของระบบดังกล่าวย่อมแตกต่างกันด้วย อิทธิพลของปริมาณ โซเดียมคลอไรด์ซึ่งเป็นสารเติมแต่งเกล็ดที่เติมลงในระบบต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีน และกรดนิวคลีอิก ยังไม่สามารถทำนายค่าได้ เนื่องจากสารเติมแต่งเกล็ดที่เติมลงไปในระบบจะมี อิทธิพลทั้งกับลักษณะของตัวทำละลายในวัฏภาคและสมบัติของโมเลกุลทางชีวภาพที่ควบคุม พฤติกรรมในการแยก ดังแสดงในตารางที่ 5.1 ผลของเกล็ดที่เฉพาะเจาะจงต่อโปรตีนนี้ มีผลต่อ แรงที่กระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับเกล็ด จึงทำให้โปรตีนบางชนิดมีการแยกดีขึ้นหรือแย่ลง เมื่อมีการเติมสารเติมแต่งเกล็ดลงไป (Zaslavsky, 1995)

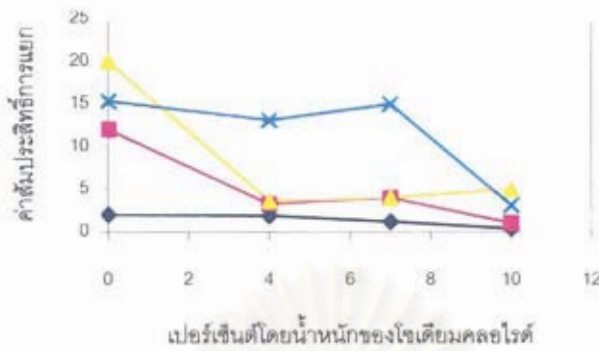
ดังนั้นการหาอิทธิพลของไซโตมัลลิวไรต์จึงหาได้ง่ายจากการทดลอง ซึ่งระบบแต่ละระบบจะมีความเฉพาะเจาะจงต่างกัน ทำให้อิทธิพลของไซโตมัลลิวไรต์ต่อระบบที่มีความเฉพาะเจาะจงนี้มีความแตกต่างกันตามแต่ลักษณะของระบบและผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสกัด สำหรับผลของไซโตมัลลิวไรต์ต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลโนโปรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 ที่ศึกษาในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคซึ่งประกอบด้วย PEG1000 / โปแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษาไว้

ในการทดลองหาค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลโนโปรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ศึกษาในภาวะต่าง ๆ ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 5.2 เมื่อศึกษาผลของปริมาณไซโตมัลลิวไรต์ที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกเมื่อมีปริมาณไซโตมัลลิวไรต์เท่ากัน ให้ผลดังรูปที่ 5.7

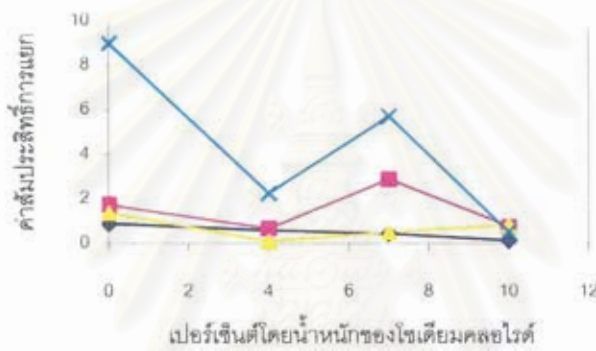


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ก)



(ข)



(ค)



รูปที่ 5.7 ผลของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบต่าง ๆ โดยที่ (ก), (ข) และ (ค) คือ ระบบของเส้นผูกเส้นที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ เมื่อความยาวของเส้นผูกเส้นที่ $1 < 2 < 3$

ฟอสเฟตซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของระบบที่ทำให้เกิดการแยกวัฏภาค จะสะสมอยู่ในวัฏภาคล่างมากกว่าในวัฏภาคบน ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์จะกระจายอยู่ในวัฏภาคทั้งสองเท่า ๆ กัน (Tjerneld, 1992) การกระจายไอออนของฟอสเฟตไปในวัฏภาคทั้งสองไม่เท่ากันนี้เป็นการเพิ่มความแตกต่างของศักย์ไฟฟ้าระหว่างวัฏภาค การที่ฟอสเฟตไอออนสะสมอยู่ในวัฏภาคล่างทำให้ในวัฏภาคนี้มีศักย์ไฟฟ้าเป็นลบ จึงเกิดการผลักโมเลกุลของโปรตีนที่มีประจุลบไปในวัฏภาคบนได้ การเติมโซเดียมคลอไรด์ลงในระบบเป็นการลดค่าความต่างศักย์ของวัฏภาคทั้งสองลง เนื่องจากโซเดียมคลอไรด์มีผลทำให้การกระจายตัวที่ไม่เท่ากันของฟอสเฟตในทั้งสองวัฏภาคมีค่าลดลง ซึ่งมีอิทธิพลต่อแรงที่กระทำระหว่างโมเลกุลที่มีขั้วในวัฏภาคทั้งสอง อีกทั้งยังไปลดความแตกต่างของลักษณะไฮโดรโฟบิกระหว่างวัฏภาคทั้งสองด้วย (Zaslavsky, 1995) ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 ในระบบที่ทำการทดลองจึงลดลงเมื่อมีการเติมโซเดียมคลอไรด์ หมายความว่าประสิทธิภาพในการสกัดของระบบที่มีโซเดียมคลอไรด์จะน้อยกว่าในระบบที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ และประสิทธิภาพจะยิ่งลดลงเมื่อปริมาณโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในระบบที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างสูง ๆ ดังที่เห็นในรูปที่ 5.7

ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูง ๆ และความยาวของเส้นผูกมามีค่ามาก (มีองค์ประกอบของ PEG และโพแทสเซียมฟอสเฟตสูง) พบว่าแอลคาไลน์โพรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 จะสะสมอยู่ในวัฏภาคล่างมากกว่าในวัฏภาคบน ($K < 1$)

ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ เป็นค่าที่ได้จากการทดลองสกัดเอนไซม์เกือบบริสุทธิ์ จึงเป็นการศึกษาถึงลักษณะเฉพาะของการสกัดเอนไซม์ชนิดนี้ต่อระบบในภาวะที่ทำการทดลอง ซึ่งพบว่าระบบที่ให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกสูงสุด คือ ระบบที่ประกอบด้วย PEG1000, โพแทสเซียมฟอสเฟต และโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณ 18.00, 13.01 และ 0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักตามลำดับ และมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9.5 ซึ่งให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกเท่ากับ 20.0 และมีเปอร์เซ็นต์ผลได้เท่ากับ 95.1

อย่างไรก็ตามค่าสัมประสิทธิ์การแยกขึ้นกับปัจจัยหลายชนิดซึ่งมีความสัมพันธ์กันกับการเกิดลักษณะของวัฏภาคและชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ จึงเป็นการยากที่จะทำนายหรือคำนวณค่าดังกล่าว ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์การแยกของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดในแต่ละภาวะ จะได้จากการทดลองด้วยการลองผิดลองถูก (trial and error) เท่านั้น ในการศึกษาค่าสัมประสิทธิ์การแยกของ

โปรตีนในระบบ PEG / เกลือ / น้ำ ที่ผ่านมา มีผู้ศึกษาและได้ระบบที่มีค่าสัมประสิทธิ์การแยกสูงที่สุดและเปอร์เซ็นต์ผลได้ดังแสดงในตารางที่ 5.4

ตารางที่ 5.4 ค่าสัมประสิทธิ์การแยกสูงที่สุดและเปอร์เซ็นต์ผลได้ที่มีผู้ศึกษาแล้ว

องค์ประกอบของระบบ (%w/w)	ชนิดของโปรตีน	K_{max}	%Yield	เอกสารอ้างอิง
19.7%PEG400 + 17.7% potassium phosphate ที่ pH 9.6	Cytochrome b_5	750	100	Sarmento และคณะ, 1994
30%PEG1000 + 10% phosphate ที่ pH 9	Cutinase	303	99.8	Sebastiao, Cabral และ Aires-Barros, 1994
13.60%PEG4000 + 13.75% potassium phosphate	Alkaline protease	4.976	-	Hotha และ Banik, 1997
18.00%PEG1000 + 13.01% potassium phosphate ที่ pH 9.5	Alkaline protease จาก <i>B. subtilis</i> NS 99	20.0	95.1	ผลจากงานวิจัยนี้

จากตารางที่ 5.4 พบว่างานวิจัยของ Hotha และ Banik (1997) มีลักษณะองค์ประกอบของระบบที่ให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกสูงที่สุด และชนิดของโปรตีนที่ทำการศึกษาก็ใกล้เคียงกับงานวิจัยในครั้งนี้นี้มาก คือ ทำการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสในระบบ PEG / โพลีแซคคาไรด์ / น้ำ งานวิจัยทั้งสองแตกต่างกันเพียงน้ำหนักโมเลกุลของ PEG, ความเข้มข้นของ PEG และโพลีแซคคาไรด์ที่ใช้ ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวมีผลทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกที่ได้ต่างกันมาก จากผลการทดลองสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสในระบบ PEG / โพลีแซคคาไรด์ / น้ำ พบว่าการเพิ่มความยาวของเส้นผุก ซึ่งเป็น การเพิ่มความเข้มข้นของ PEG และ/หรือ โพลีแซคคาไรด์ จะทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกลดลงตามที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 5.3.1 อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความเข้มข้นของ PEG และโพลีแซคคาไรด์ที่ใช้ในงานวิจัยทั้งสอง พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้นน้ำหนักโมเลกุลของ PEG ที่ต่างกันจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ได้จากงานวิจัยทั้งสอง ซึ่งในระบบที่ใช้ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าจะให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกสูงกว่าตามที่ได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 3 (หัวข้อ 3.3.4) สำหรับงานวิจัยนี้ใช้ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1000 ในขณะที่งานวิจัยของ Hotha และ Banik ใช้ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 4000 จึงทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ได้จากงานวิจัยนี้มีค่าสูงกว่าค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ได้จากงานวิจัยของ Hotha และ Banik ด้วย

อย่างไรก็ตามค่าสัมประสิทธิ์การแยกที่มีค่าสูง ($K \gg 1$) อาจไม่ใช่ค่าที่แสดงถึงประสิทธิภาพที่ดีที่สุดของการสกัด ต้องคำนึงถึงค่าสัมประสิทธิ์การแยกของสารปนเปื้อนที่มีในระบบด้วย ในระบบที่มีประสิทธิภาพในการแยกสูงต้องมีค่าสัมประสิทธิ์การแยกของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสูงมาก ๆ ($K_{\text{target}} \gg 1$) ในขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของสารปนเปื้อนควรมีค่าน้อยมาก ๆ ($K_{\text{cont}} \ll 1$) หรือในทางตรงกันข้ามคือ $K_{\text{target}} \ll 1$ และ $K_{\text{cont}} \gg 1$ เช่นในการศึกษาการสกัดแอลคาไลไนโซลานเนสโดย Duarte และคณะ (1999) พบว่าระบบที่ประกอบด้วย PEG6000 16 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และ K_2HPO_4 8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จะมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อมีโซเดียมคลอไรด์อยู่ 12 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ซึ่งให้ค่า K_{target} เท่ากับ 0.7 และ K_{cont} เท่ากับ 108 ในขณะที่ระบบที่ใช้โซเดียมคลอไรด์ 9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จะให้ค่า K_{target} เท่ากับ 3.0 แต่มีค่า K_{cont} เท่ากับ 2.0 จะเห็นได้ว่าค่า K_{target} และ K_{cont} ในระบบดังกล่าวมีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่าทั้งผลิตภัณฑ์ที่ต้องการและสารปนเปื้อนอยู่ในวัฏภาคเดียวกัน ดังนั้นระบบดังกล่าวจึงมีประสิทธิภาพในการแยกที่ไม่ดีแม้ว่าจะมีค่าสัมประสิทธิ์การแยกของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสูงมากก็ตาม

นอกจากค่าสัมประสิทธิ์การแยกสูงสุดที่ต้องการแล้ว ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ยังต้องการให้ได้เปอร์เซ็นต์ผลได้ (% yield) ที่มีค่าสูงด้วย จากสมการ 2.5 เห็นได้ว่าสามารถคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้จากค่าสัมประสิทธิ์การแยกและสัดส่วนปริมาตรของระบบ สำหรับในงานวิจัยนี้กำหนดจุดที่เป็นระบบที่ใช้ในการหาค่าสัมประสิทธิ์การแยกที่จุดกึ่งกลางของเส้นผูก ซึ่งที่จุดดังกล่าวจะมีสัดส่วนปริมาตรของระบบประมาณ 1 ดังนั้นทุกภาวะที่ทำการทดลองในงานวิจัยนี้จึงมีค่าสัดส่วนปริมาตรใกล้เคียงกัน เปอร์เซ็นต์ผลได้จึงขึ้นกับค่าสัมประสิทธิ์การแยกเป็นหลัก ดังแสดงในตารางที่ 5.2 ซึ่งระบบที่ให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกสูงสุดที่ได้ในงานวิจัยนี้จะให้ค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้เท่ากับ 95.1 อย่างไรก็ตามหากภาวะที่ให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกสูงแต่มีเปอร์เซ็นต์ผลได้ต่ำ สามารถปรับปรุงค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ดังกล่าวได้จากการเปลี่ยนองค์ประกอบของระบบที่อยู่บนเส้นผูกเดียวกันแต่มีค่าสัดส่วนปริมาตรต่าง ๆ กันได้ โดยให้ปริมาตรของวัฏภาคล่างมีค่าน้อยกว่าปริมาตรในวัฏภาคบนมาก ๆ เพื่อเป็นการเพิ่มเปอร์เซ็นต์ผลได้ของระบบ โดยที่ค่าสัมประสิทธิ์การแยกไม่เปลี่ยนแปลง

บทที่ 6

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการทดลอง

1. จากการศึกษาแผนภาพวัฏภาคของระบบ PEG1000 / โพลเทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) และความดันบรรยากาศ สรุปผลของปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะของเส้นแบ่งวัฏภาคได้ดังนี้

1.1 ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบมีผลต่อเส้นแบ่งวัฏภาคเพียงเล็กน้อย ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่ใช้คือ 7.5, 8.5, 9.5 และ 10.5 และที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5 เส้นแบ่งวัฏภาคจะเข้าใกล้จุดกำเนิดมากที่สุด นั่นคือใช้ปริมาณ PEG1000 และโพลเทสเซียมฟอสเฟตในการแยกวัฏภาคน้อยที่สุด

1.2 เมื่อปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในระบบมีมากขึ้น ความต้องการพอลิเมอร์และเกลือที่ใช้ในการเกิดวัฏภาคจะมีค่าลดลง โดยเส้นแบ่งวัฏภาคจะเข้าใกล้จุดกำเนิดมากขึ้น และลดลงอย่างเห็นได้ชัดในภาวะที่มีและไม่มีโซเดียมคลอไรด์

2. จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 ในระบบ PEG1000 / โพลเทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) และความดันบรรยากาศ สรุปได้ดังนี้

2.1 ความยาวของเส้นผูกที่เพิ่มขึ้น มีผลทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 ลดลงในทุกภาวะที่ทำการทดลอง

2.2 ความเป็นกรด-ด่างของระบบที่เพิ่มขึ้นในช่วงของค่าความเป็นกรด-ด่างที่ทำการทดลอง (7.5, 8.5, 9.5 และ 10.5) เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของระบบโดยให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกสูงขึ้นในบางกรณี

2.3 ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่เติมลงในระบบมีผลทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยก ลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5

3. ภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการสกัดแอลคาไลโนไฟรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 ในระบบที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (7.5, 8.5, 9.5 และ 10.5) และเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์ (0, 4, 7 และ 10) ที่ทำการทดลองในงานวิจัยนี้คือ ที่ความเข้มข้นของ PEG1000, โพลีแซ็กคาไรด์ และโซเดียมคลอไรด์เป็น 18.00, 13.01 และ 0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักตามลำดับ, ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเท่ากับ 9.5, อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) และความดันบรรยากาศ ซึ่งให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลโนไฟรทีเอสจาก *B. subtilis* NS 99 เท่ากับ 20.0 และให้ค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้เท่ากับ 95.1

6.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในงานวิจัยนี้ใช้เอนไซม์เกือบบริสุทธิ์ในการศึกษาค่าสัมประสิทธิ์การแยกในระบบ PEG1000 / โพลีแซ็กคาไรด์ / น้ำ ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) และความดันบรรยากาศ ซึ่งควรทำการทดลองหาค่าดังกล่าวในน้ำหมักหรือสารละลายเอนไซม์หรือโปรตีนที่มีสารปนเปื้อนอยู่ด้วย เพื่อให้เห็นความแตกต่างอย่างชัดเจนในการแยกเอนไซม์และเซลล์ออกจากกัน จะได้ทราบภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดเอนไซม์อย่างแท้จริง

2. น่าจะมีการศึกษาถึงการใช้สารเติมแต่งเกลือชนิดอื่น ซึ่งอาจทำให้ระบบมีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยการศึกษาดังกล่าวจะใช้วิธีลองผิดลองถูกหรือค้นคว้าจากงานวิจัยที่มีผู้ศึกษาไว้แล้วในระบบที่ใช้สกัดแอลคาไลโนไฟรทีเอสเช่นเดียวกัน

3. เนื่องจากระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ใช้ในการสกัดแอลคาไลโนไฟรทีเอสยังมีผู้ศึกษาไว้ไม่มากนัก จึงควรมีการศึกษาถึงระบบอื่น ๆ นอกเหนือไปจากระบบ PEG / โพลีแซ็กคาไรด์ / น้ำ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เช่น ระบบ PEG / ซัลเฟต / น้ำ, PEG / ซิเตรต / น้ำ ซึ่งอาจทำให้การสกัดแอลคาไลโนไฟรทีเอสมีประสิทธิภาพสูงขึ้น

4. วิธีการหาแอมโนโตซีนของเอนไซม์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ หาได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ซึ่งกรดอะมิโนที่เป็นอะโรมาติก (aromatic amino acid) ได้แก่ ทริปโตเฟน, ไทโรซีน และฟีนิลอะลานีนจะถูกดูดกลืนได้ในช่วงคลื่นดังกล่าว แต่จากการกำหนดค่า

หน่วยของเอนไซม์เป็นการเทียบจากปริมาณของไทโรซีนเท่านั้น ดังนั้นแอกติวิตีจริงของเอนไซม์จึงน่าจะมีค่าสูงกว่าค่าที่หาได้ และสำหรับ *B. subtilis* NS 99 มีค่า optimum pH เท่ากับ 9.5 แต่ในการทดลองนี้ทำการหาแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5 ซึ่งแอกติวิตีจริงของเอนไซม์จะมีค่าสูงกว่าค่าที่หาได้จากการทดลอง ดังนั้นจึงควรหาค่าแอกติวิตีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9.5 ซึ่งเป็นค่าที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด

5. การหาแอกติวิตีของเอนไซม์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร อาจมีความผิดพลาดสูง เนื่องจากตัวอย่างที่ใช้ในวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่นดังกล่าวไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งหากมีสิ่งปนเปื้อนเพียงเล็กน้อยที่อาจมองเห็นหรือมองไม่เห็นปนอยู่ในตัวอย่าง จะทำให้การอ่านค่าผิดพลาดไปได้มาก ดังนั้นการทดลองจึงต้องมีความแม่นยำสูง สำหรับวิธีการอีกวิธีหนึ่งซึ่งอยู่ในช่วงการพัฒนาเพื่อใช้หาค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ได้สะดวกกว่า จะใช้สารละลายเอโซเคซีน (azocasein) 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรแทนการใช้สารละลายเคซีน 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในขณะที่การเตรียมสารเคมีชนิดอื่นและวิธีการหาแอกติวิตียังคงเหมือนเดิม ซึ่งวิธีนี้จะทำให้ได้ตะกอนสีเหลืองแยกออกมาอย่างชัดเจนและไม่กระจายตัวง่ายเหมือนตะกอนที่เกิดจากการทดลองที่ใช้เคซีน ส่วนน้ำใส (สีเหลือง) ที่นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงสามารถวัดค่าได้ในช่วงที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (ที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร) โดยกำหนด 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตรเปลี่ยนแปลงไป 0.1 หน่วย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กฤษณา โพธิสารัตนะ. 2535. การศึกษาสมบัติของอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus spp.* ชนิด **ทนต่อสภาวะต่าง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นภา ศิวรังสรรค์ และ สุดา เกียรติกำจรวงศ์. 2540. การตรึงแอลคาไลน์โปรตีเอสบนปิดโพลีอะคริลาไมด์และโพลิ (อะคริลาไมด์-โค-กรดเมทาคริลิก) โดยวิธีอินเวอร์สซัสเพนชันโพลิ-เมอไรเซชัน. ทุนโครงการเร่งด่วนและสนับสนุนโครงการใหม่เพื่อพัฒนางานวิจัยพื้นฐาน (นำร่อง) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ และ พีรดา สิริจินตกานต์. 2530. การศึกษาเอนไซม์โปรตีเอสจาก *บาซิลลัส สายพันธุ์ในประเทศไทย*. ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วรพัฒน์ อรรถยุกติ. 2526. การศึกษากระบวนการสกัดของเหลวที่จะเป็นประโยชน์ต่อการอุตสาหกรรมในประเทศไทย. กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยและพัฒนาของคณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สมบัติ คงวิทยา. 2541. การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและลักษณะสมบัติทางโปรตีนจาก **ป่านครนารายณ์ AGAVE SISALANA**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีวเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Albertsson, P. -A. 1986. Partitioning of cell particles and macromolecules. 3rd ed. New York : John Wiley&Sons.
- Bayoudh, A. , Gharsallah, N. , Chamkha, M. , Dhoub, A. , Ammar, S. , and Nasri, M. 2000. Purification and characterization of an alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* MN1. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 24 : 291-295.
- Beynon, R. J. , and Bond, J. S. , eds. 1990. Proteolytic enzymes : a practical approach. 2nd ed. England : IRL Press.
- Brooks, D. E. , Sharp, K. A. , and Fisher, D. 1985. In : Partitioning in aqueous two-phase systems : theory, methods, uses, and applications to biotechnology Orlando :

- Academic Press, pp. 11-84. cited in Zaslavsky, B. Y. **Aqueous two-phase partitioning: physical chemistry and bioanalytical applications**. New York : MARCEL DEKKER, 1995.
- Cabral, J. M. S. , and Aires-Barros, M. R. 1993. Liquid-liquid extraction of biomolecules using aqueous two-phase systems. In J. F. Kennedy, and M. S. Cabral (eds.), **Recovery processes for biological materials**, pp. 273-302. New York : John Wiley & Sons.
- Cliffe, K. 1988. Down-stream processing. In A. Seragg (ed.), **Biotechnology for engineers : biological systems in technological processes**, pp. 302-321. England : Ellis Horwood.
- Duarte, M. C. T. , Portugal, E. P. , Ponezi, A. N. , Bim, M. A. , Tagliari, C. V. , and Franco, T. T. 1999. Production and purification of alkaline xylanases. **Bioresource Technology** 68 : 49-53.
- Forciniti, D. , Hall, C. K. , and Kula, M. R. 1991. Protein partitioning at the isoelectric point : influence of polymer molecular weight and concentration and protein size. **Biotechnol. Bioeng.** 38(9) : 986-994.
- Grimonprez, B. , and Johansson, G. 1995. Liquid-liquid partitioning of some enzymes, especially phosphofructokinase, from *Saccharomyces cerevisiae* at subzero temperature. **J. Chromatogr. B.** 680 : 55-63.
- Hotha, S. , and Banik, R. M. 1997. Production of alkaline protease by *Bacillus thuringiensis* H14 in aqueous two-phase systems. **J. Chem. Tech. Biotechnol.** 69 : 5-10.
- Huddleston, J. , Veide, A. , Kohler, K. , Flanagan, J. , Enfors, S. -O. , and Lyddiatt, A. , 1991. The molecular basis of partitioning in aqueous two-phase systems. **Tib Tech.** 9 : 381-388.
- Hustedt, H. 1986 Extractive enzyme recovery with simple recycling of phase forming chemicals. **Biotechnol. Letters** 8(11) : 791-796.
- Hutadilok- Towatana, N. , Painupong, A. , and Suntinanalert, P. 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. PS719. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 87(5) : 581-587.

- Ilieva, M. P. , Bakalova, A. , Mihneva, M. , Pavlov, A. , and Dolapchiev, L. 1996. Production of phosphomonoesterases by *Nicotiana tabacum* 1507 in an aqueous two-phase systems. **Biotechnol. Bioeng.** 51(4) : 488-493.
- Jain, A. , and Johri, B. N. 1999. Partitioning of an extracellular xylanase produced by a thermophilic fungus *Melanocarpus albomyces* IIS-68 in an aqueous two-phase system. **Bioresource Technology** 67 : 205-207.
- Johansson, G. 1992. Affinity partitioning in PEG-containing two-phase systems. In J. M. Harris (ed.), **Poly(Ethylene Glycol) Chemistry : biotechnical and biomedical applications**, pp. 73-84. New York : Plenum Press.
- Johansson, G. , and Tjerneld, F. 1994. Affinity partitioning. In G. Street (ed.), **Highly selective Separations in Biotechnology**, pp. 55-85 . London : Chapman & Hall.
- Kaul, A. , and Asenjo, J. A. 1994. Partition of soluble proteins from *E.coli* in polyethylene glycol-salt two-phase systems. In D. L. Pyle (ed.), **Separations for biotechnology 3**, pp. 235-241. London : Bookcraft.
- Kroner, K. H. , Hustedt, H. , and Kula, M. R. 1982. Evaluation of crude dextran as phase-forming polymer for the extraction of enzymes in aqueous two-phase systems in large scale. **Biotechnol. Bioeng.** 24(5) : 1015-1045.
- Kula, M. -R. , Kroner, K. H. , and Hustedt, H. 1982. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. In A. Flechter (ed.), **Advances in Biochem. Eng.** 24 Vols, pp. 73-118. Berlin : Springer-Verlag.
- Kwon, Y. J. , Kaul, R. , and Mattiasson, B. 1996. Extractive lactic acid fermentation in poly(ethyleneimine)-based aqueous two-phase system. **Biotechnol. Bioeng.** 50(3) : 280-290.
- Lantz, P. , -G. , Tjerneld, F. , Hahn-Hagerdal, B. , and Radstrom, P. 1996. Use of aqueous two-phase systems in sample preparation for polymerase chain reaction-based detection of microorganisms. **J. Chromatogr. B** 680 : 165-170.
- Larcher, G. , Cimon, B. , Symoens, F. , Tronchin, G. , Chabasse, D. , and Bouchara, J. P. 1996. A 33 kDa serine proteinase from *Scedosporium apiospermum*. **Biochemical Journal** 315 : 119-126.

- Larsson, M. , Arasaratnam, V. , and Mattiasson, B. 1988. Integration of bioconversion and downstream processing : starch Hydrolysis in an aqueous two-phase systems. **Biotechnol. Bioeng.** 33(6) : 758-766.
- Lee, E. G. , Park, E. H. , and Hyun, H. H. 2000. Purification and characterization of two alkaline protease produces by *Pseudomonas* sp BK7. **J. Microb. Biotech.** 10(5) : 677-684.
- Lee, Y. H. , and Chang, H. N. 1990. Production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in an aqueous two-phase system. **J. Ferment. Bioeng.** 69(2) : 89-92.
- Li, M. , Zhu, Z. -Q. , and Mei, L. -H. 1997. Partitioning of amino acids by aqueous two-phase systems combined with temperature-induced phase formation. **Biotechnol. Prog.** 13(1) : 105-108.
- Liakopoulou-Kyriakides, M. , Karakatsanis, A. , and Stamatoudis, M. 1996. Enzymic hydrolysis of starch in agitated PEG-dextran aqueous two-phase system. **Starch/Starke** 48 : 291-294.
- Lu, M. , Albertsson, P. -A. , Johansson, G. , and Tjerneld, F. 1996. Ucon-benzoyl dextran aqueous two-phase systems : protein purification with phase component recycling. **J. Chromatogr. B** 680 : 65-70.
- Mehrotra, S. , Pandey, P. K. , Gaur, R. , and Darmwal, N. S. 1999. The production of alkaline protease by a *Bacillus* species isolate. **Bioresource Technology** 67 : 201-203.
- Mistry, S. L. , Kaul, A. , Merchuk, J. C. , and Asenjo, J. A. 1996. Mathematical modelling and computer simulation of aqueous two-phase continuous protein extraction. **J. Chromatogr. A** 741 : 151-163.
- Morita, Y. , Hasan, Q. , Sakaguchi, T. , Murakami, Y. , Yokoyama, K. , and Tamiya, E. 1998. Properties of a cold-active protease from psychrotrophic : *Flavobacterium balustinum* P104. **Applied Microbiology and Biotechnology** 50(6) : 669-675.
- Morita, Y. , Kondoh, K. ,et. al. 1997. Purification and characterization of a cold-active protease from psychrotropic *Serratia marcescens* AP3801. **Journal of The American Oil Chemists Society** 74(11) : 1377-1383.

- Owen, P. W. 1983. Proteinases. In W. M. Fogarty (ed.), **Microbial enzymes and biotechnology**, p. 270. London : Applied Science.
- Papamichael, N. , Borner, B. , and Hustedt, H. 1991. Continuous aqueous phase extraction of proteins : automated on-line monitoring of fumarase activity and protein concentration. **J. Chem. Tech. Biotechnol.** 50 : 457-467.
- Paquet, V. , Myint, M. , Roque, C. , and Soucaille, P. 1994. Partitioning of pristinamycins in aqueous two-phase systems : a first step toward the development of antibiotic production by extractive fermentation. **Biotechnol. Bioeng.** 44(4) : 445-451.
- Park, D. H. , Lee, H. J. , and Lee, E. K. 1997. Crystallization of alkaline protease as a means of purification process. **Korean J. Chem. Eng.** 14(1) : 64-68.
- Pawar, P. A. , Veera, U. P. , Sawant, S. B. , and Joshi, J. B. 1997. Enzyme mass transfer coefficient in aqueous two-phase systems : modified spray extraction columns. **The Canadian J. of Chemical Engineering** 75 : 751-758.
- Planas, J. , Lefebver, D. , Tjerneld, F. , and Hahn-Hagerdal, B. 1997. Analysis of phase composition in aqueous two-phase systems using a two-column chromatographic method : application to lactic acid production by extractive fermentation. **Biotechnol. Bioeng.** 54(4) : 303-311.
- Planas, J. , Radstrom, P. , Tjerneld, F. , and Hahn-Hagerdal, B. 1996. Enhanced production of lactic acid through the use of a novel aqueous two-phase system as an extractive fermentation system. **Appl. Microbial. Biotechnol.** 45 : 737-743.
- Rodier, M. H. , ElMoudni, B. , Kauffman L. C. , and Jacquemin, J. L. 1997. Purification of an intracellular metalloproteinase of M-r 45000 in *Fusarium moniliforme*. **Mycological Research** 101 : 678-682.
- Sarmiento, M. J. , Pires, M. J. , Cabral, J. M. S. , and Aires-Barros, M. R. 1994. Liquid-liquid extraction of a recombinant protein, cytochrome b_5 , with aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate salts. **J. Chromatogr. A.** 668 : 117-120.

- Schmidt, A. S. , Andrews, B. A. , and Asenjo, J. A. , 1996. Correlations for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems : effect of overall protein concentration. **Biotechnol. Bioeng.** 50(6) : 617-626.
- Sebastiao, M. J. , Cabral, J. M. S. , and Aires-Barros, M. R. 1993. *Fusarium solani pisi* recombinant cutinase partitioning in PEG/potassium phosphate aqueous two-phase systems. **Biotechnol. Techn.** 7(9) : 631-634.
- Sebastiao, M. J. , Cabral, J. M. S. , and Aires-Barros, M. R. 1994. Partitioning of recombinant *Fusarium solani pisi* cutinase in polyethylene glycol-aqueous salt solution two-phase systems. **J. Chromatogr. A** 668 : 139-144.
- Sebastiao, M. J. , Cabral, J. M. S. , and Aires-Barros, M. R. 1995. Simultaneous quantification of polymer and salt in polyethylene glycol/phosphate aqueous two-phase systems by HPLC. **Biotechnol. Tech.** 9(7) : 503-508.
- Sebastiao, M. J. , Cabral, J. M. S. , and Aires-Barros, M. R. 1996. Improved purification protocol of a *Fusarium solani pisi* recombinant cutinase by phase partitioning in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and phosphate. **Enzyme Microb. Technol.** 18 : 251-260.
- Sebastiao, M. J. , Martel, P. , Baptista, A. , Petersen, S. B. , Cabral, J. M. S. , and Aires-Barros, M. R. 1997. Predicting the partitioning coefficients of a recombinant cutinase in polyethylene glycol/phosphate aqueous two-phase systems. **Biotechnol. Bioeng.** 56(3) : 248-257.
- Sinha, R. , Singh, S. P. , Ahmed, S. , and Garg, S. K. 1996. Partitioning of a *Bacillus* alkaline protease in aqueous two-phase systems. **Bioresource Technology** 55(2) : 163-166.
- Su, Z. -G. , and Feng, X. -L. 1999. Process integration of cell disruption and aqueous two-phase extraction. **J. Chem. Tech. Biotechnol.** 74 : 284-288.
- Takac, S. , Elmas, S. , Calik, P. , and Ozdamar, T. H. 2000. Separation of the protease enzymes of *Bacillus licheniformis* from the fermentation medium by cross flow ultrafiltration. **J. Chem. Tech. Biotechnol.** 75(6) : 491-499.

- Tanuja, S. , Srinivas, N. D. , Rao, K. S. M. S. R. , and Gowthaman, M. K. , 1997. Aqueous two-phase extraction for downstream processing of amyloglucosidase. **Process Biochemistry**. 32(8) : 635-641.
- Tjerneld, F. 1992. Aqueous two-phase partitioning on an industrial scale. In J. M. Harris (ed.), **Poly(Ethylene Glycol) chemistry : biotechnical and biomedical applications**, pp. 85-102. New York : Plenum Press.
- Tjerneld, F. , Johansson, G. , and Joelsson, M. 1987. Affinity Liquid-liquid extraction of lactate dehydrogenase on a large scale. **Biotechnol. Bioeng.** 30(7) : 809-816.
- Videira, M. , and Aires-Barros, M. R. 1994. Liquid-liquid extraction of clavulanic acid using an aqueous two-phase system of polyethylene glycol and potassium phosphate. **J. Chromatogr. A** 668 : 237-240.
- Yang, W. -Y. , Lin, C. -D. , Chu, I. -M. , and Lee, C.-J. 1994. Extraction of cephalosporin C from whole broth and separation of desacetyl cephalosporin C by aqueous two-phase partition. **Biotechnol. Bioeng.** 43(6) : 439-445.
- Zaslavsky, B. Y. 1995. **Aqueous two-phase partitioning : physical chemistry and bioanalytical applications** New York : MARCEL DEKKER.
- Zaslavsky, B. Y. , and Masimov, E. A. 1988. **Topics Curr. Chem.** 146 : 171. cited in Zaslavsky, B. Y. **Aqueous two-phase partitioning: physical chemistry and bioanalytical applications**. New York : MARCEL DEKKER, 1995.
- Zaslavsky, B. Y. , Miheeva, L. M. , Rodnikova, M. N. , Spivak, G. V. , Harkin, V. S. , and Mahmudov, A. U. 1989. **Faraday Trans. I. J. Chem. Soc.** 85 : 2857. cited in Zaslavsky, B. Y. **Aqueous two-phase partitioning: physical chemistry and bioanalytical applications**. New York : MARCEL DEKKER, 1995.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

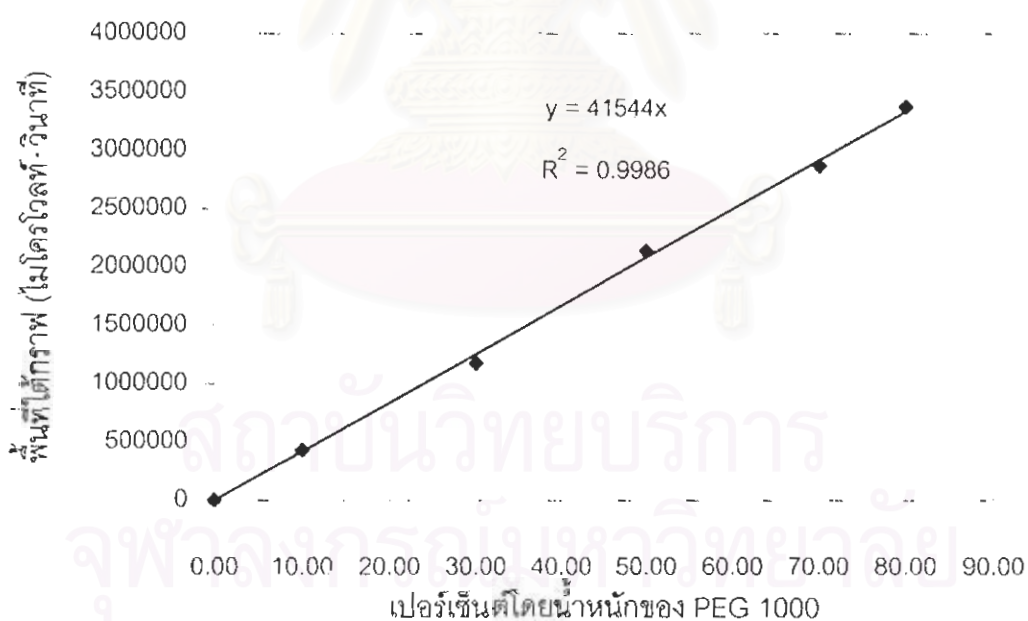


ภาคผนวก ก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก.1 ค่ามาตรฐานของ PEG1000 จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC โดยใช้คอลัมน์
Lichrocart C₈

เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของ PEG1000	พื้นที่ใต้กราฟ (ไมโครโวลท์·วินาที)
0.00	0
10.08	429200
30.09	1172454
50.08	2132554
70.20	2865384
80.11	3368203



รูปที่ ก.1 ค่ามาตรฐานของ PEG1000 จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC
โดยใช้คอลัมน์ Lichrocart C₈

ตารางที่ ก.2 ค่ามาตรฐานของโพแทสเซียมฟอสเฟต จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC
โดยใช้คอลัมน์ Lichrocart C₈

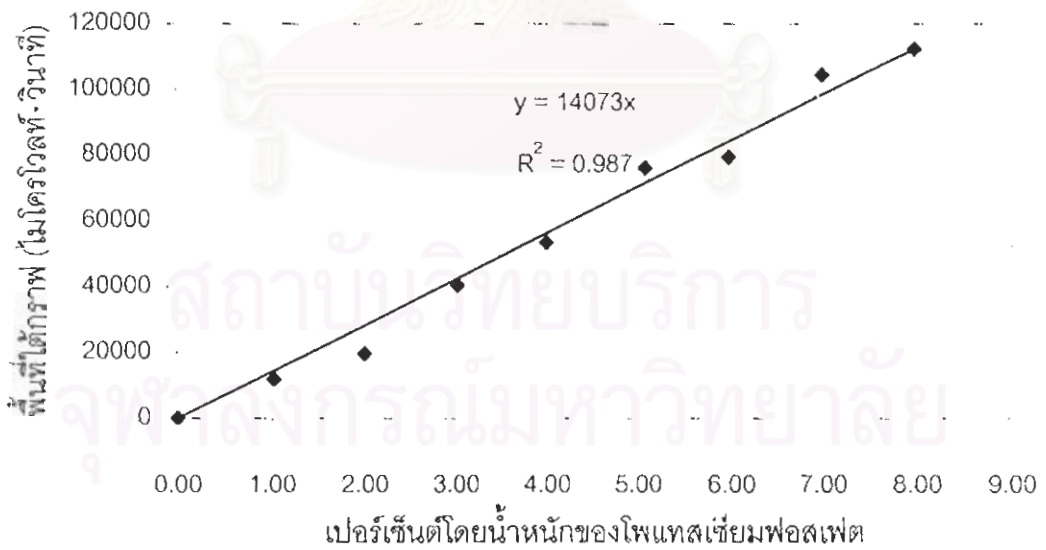
เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของ โพแทสเซียมฟอสเฟต	พื้นที่ใต้กราฟ (ไมโครโวลท์·วินาที)
0.00	0
9.99	251494
20.13	734859
30.23	1219279
39.85	1568514
48.38	2014295



รูปที่ ก.2 ค่ามาตรฐานของโพแทสเซียมฟอสเฟต จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC
โดยใช้คอลัมน์ Lichrocart C₈

ตารางที่ ก.3 ค่ามาตรฐานของโพแทสเซียมฟอสเฟต จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC
โดยใช้คอลัมน์ Zorbax-Sax

เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของ โพแทสเซียมฟอสเฟต	พื้นที่ใต้กราฟ (ไมโครโวลท์·วินาที)
0.00	0
1.02	11837
2.00	19597
3.01	40343
3.99	53350
5.08	75927
5.97	79263
6.99	104396
7.97	112265



รูปที่ ก.3 ค่ามาตรฐานของโพแทสเซียมฟอสเฟต จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC
โดยใช้คอลัมน์ Zorbax-Sax

ตารางที่ ก.4 ค่ามาตรฐานของการดูดกลืนแสงของไทโรซีนในสารละลายคาร์บอนेट-ไบคาร์บอนेट บัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้นของไทโรซีน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงของไทโรซีน ที่ 280 นาโนเมตร
0	0.000
20	0.125
40	0.283
60	0.442
80	0.603
100	0.765
120	0.918



รูปที่ ก.4 ค่ามาตรฐานของการดูดกลืนแสงของไทโรซีนในสารละลายคาร์บอนेट-ไบคาร์บอนेट บัฟเฟอร์ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

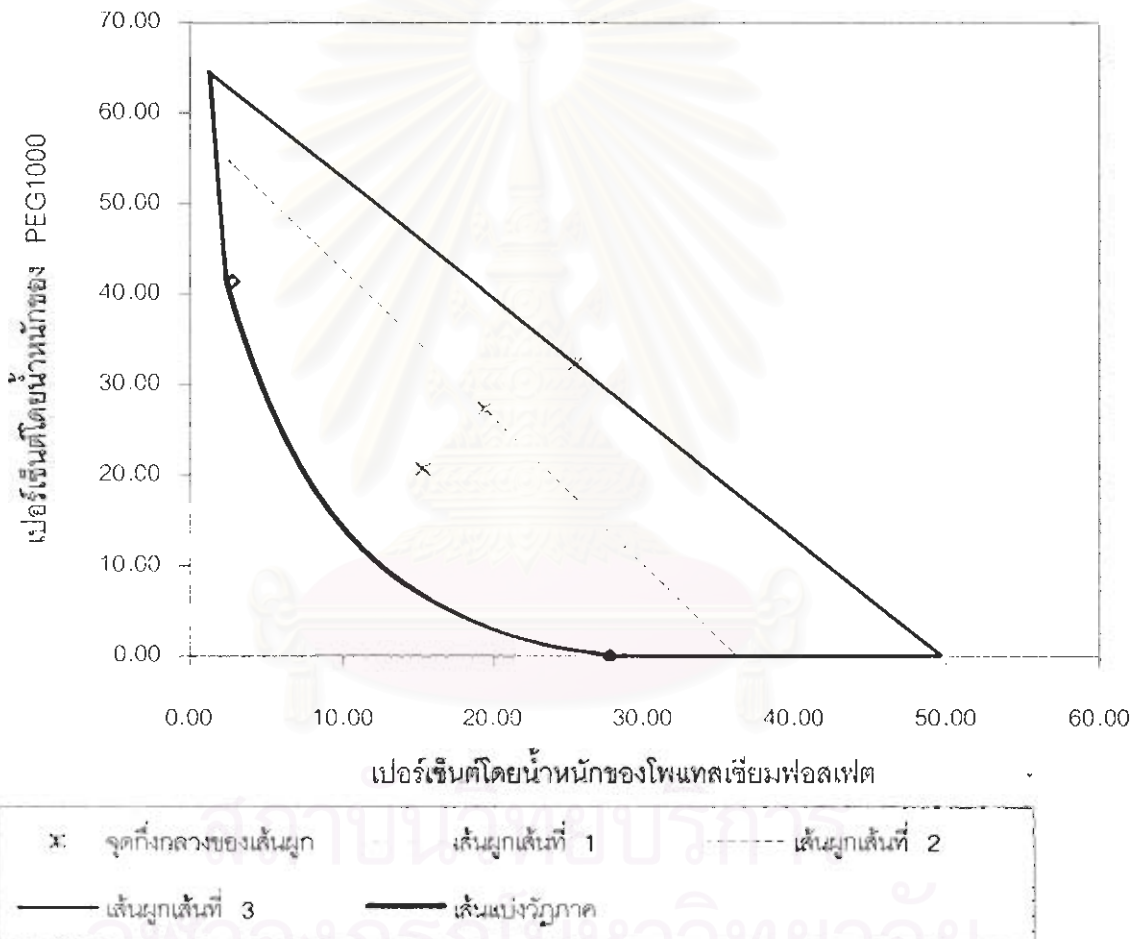


ภาคผนวก ข

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

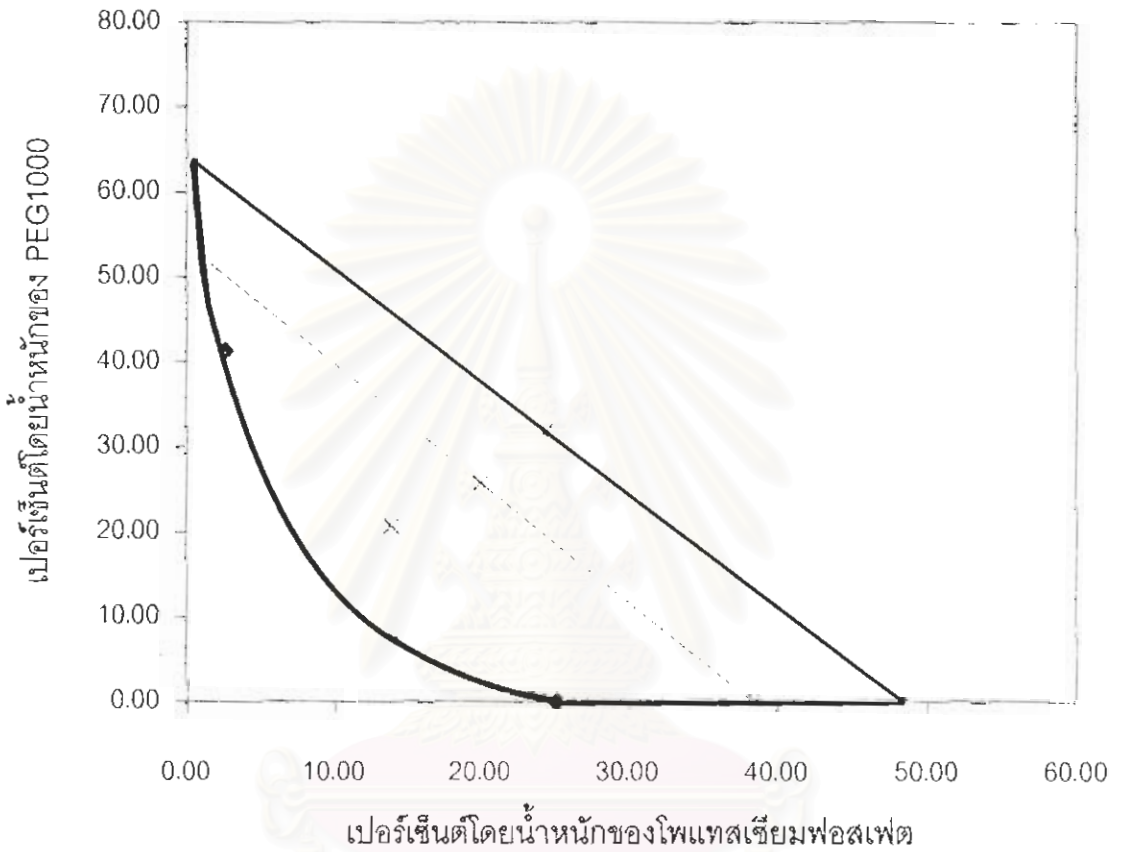
แผนภาพวัฏภาคของระบบ PEG1000 / โพลทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ภาวะต่าง ๆ
 ที่ทำการทดลอง

- ที่ 0 เเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5



รูปที่ ข.1 แผนภาพวัฏภาคของระบบ PEG1000 / โพลทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ 0 เเปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ

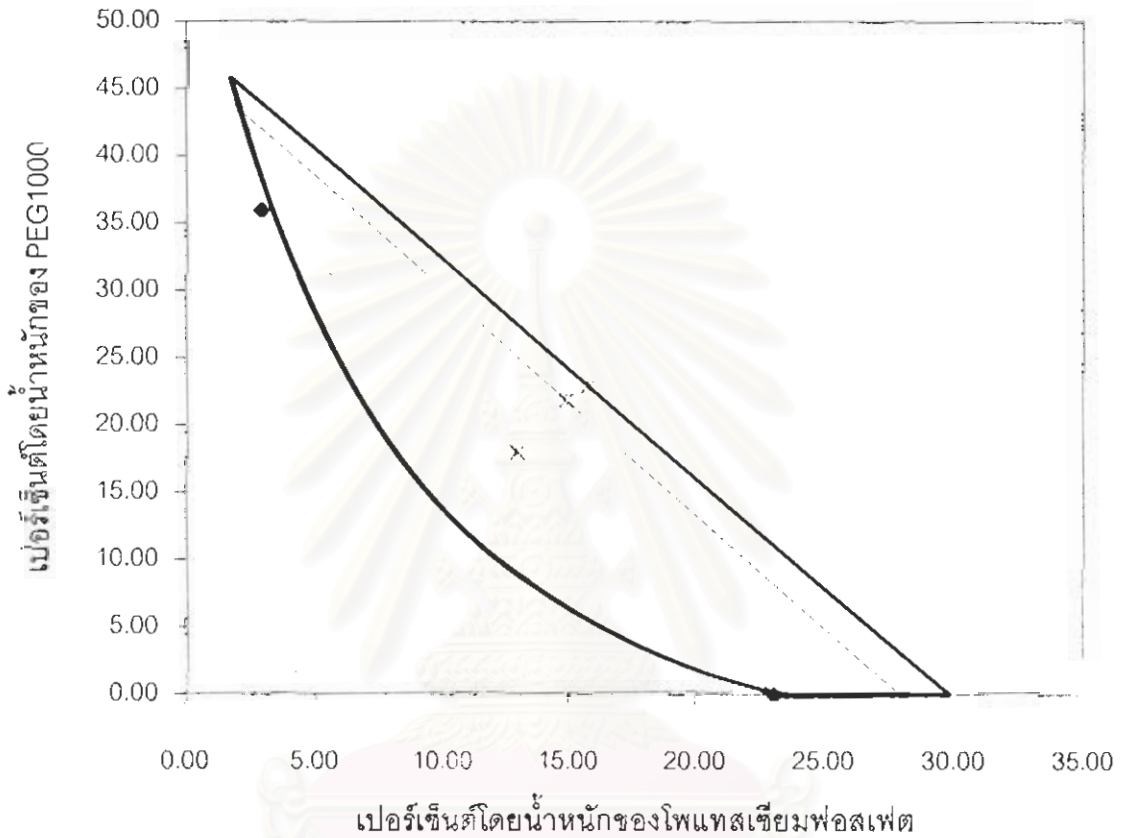
- ที่ 0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.5



× จุดกึ่งกลางของเส้นผูก เส้นผูกเส้นที่ 1 - - - เส้นผูกเส้นที่ 2
 ——— เส้นผูกเส้นที่ 3 ——— เส้นแบ่งวัฏภาค

รูปที่ ข.2 แผนภาพวัฏภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ 0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.5, อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ

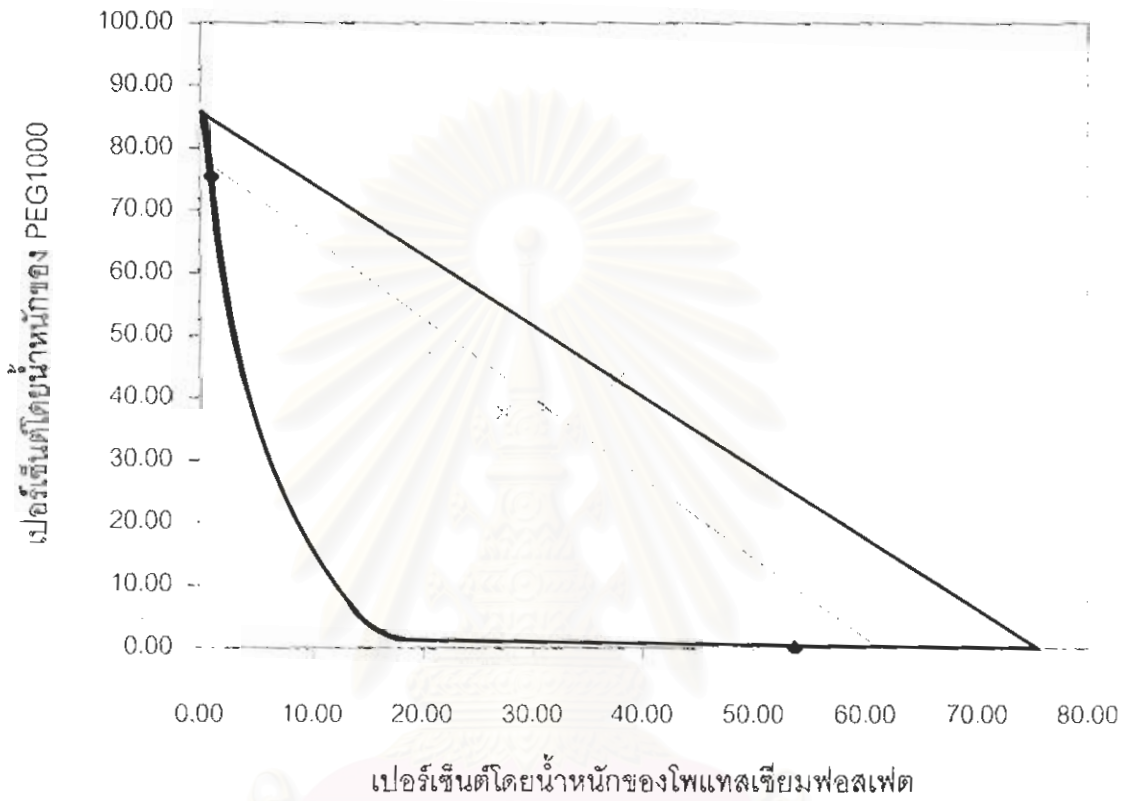
- ที่ 0 เเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9.5



× จุดกึ่งกลางของเส้นผูก เส้นผูกเส้นที่ 1 - - - - - เส้นผูกเส้นที่ 2
 ———— เส้นผูกเส้นที่ 3 ———— เส้นแบ่งภูมิภาค

รูปที่ ข.3 แผนภาพภูมิภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ 0 เเปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9.5, อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ

- ที่ 0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5

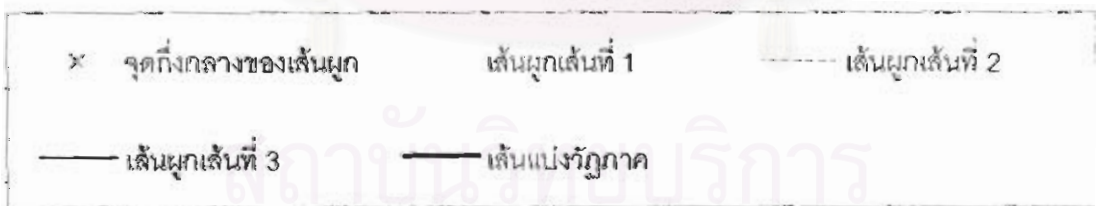
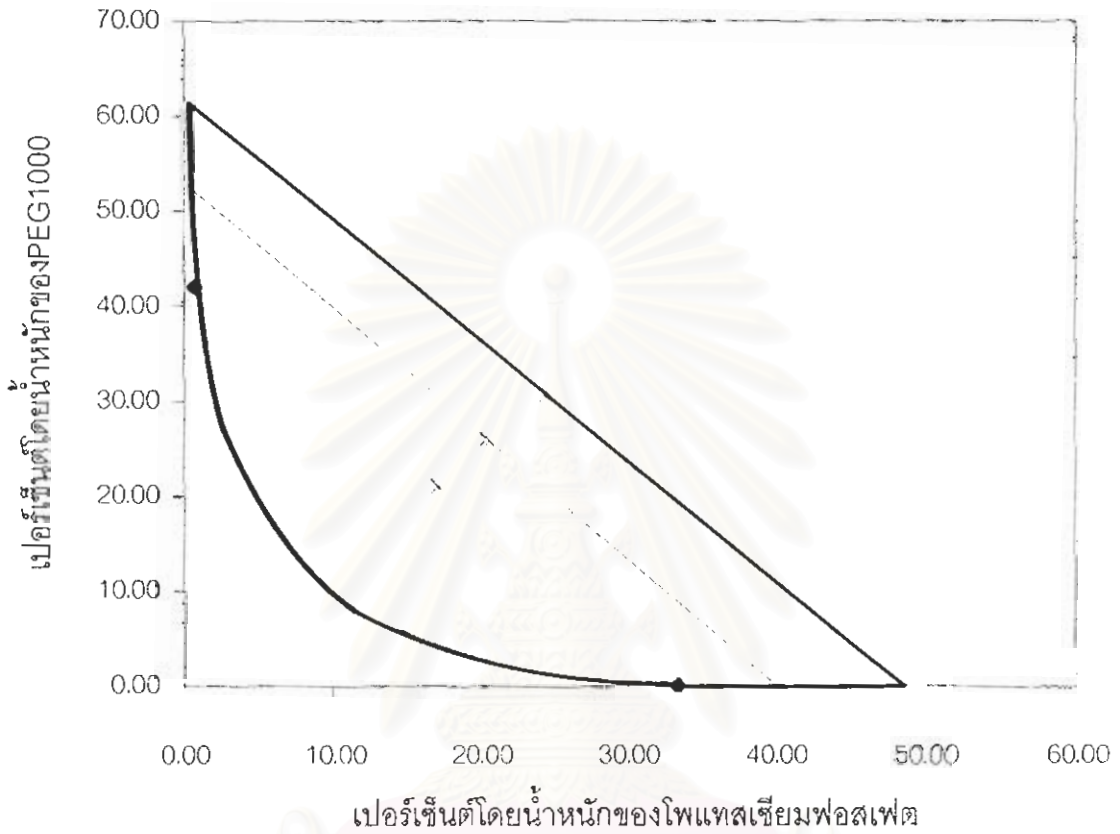


● จุดกึ่งกลางของเส้นผูก - - - - - เส้นผูกเส้นที่ 1 - - - - - เส้นผูกเส้นที่ 2

— เส้นผูกเส้นที่ 3 ———— เส้นแบ่งภูมิภาค

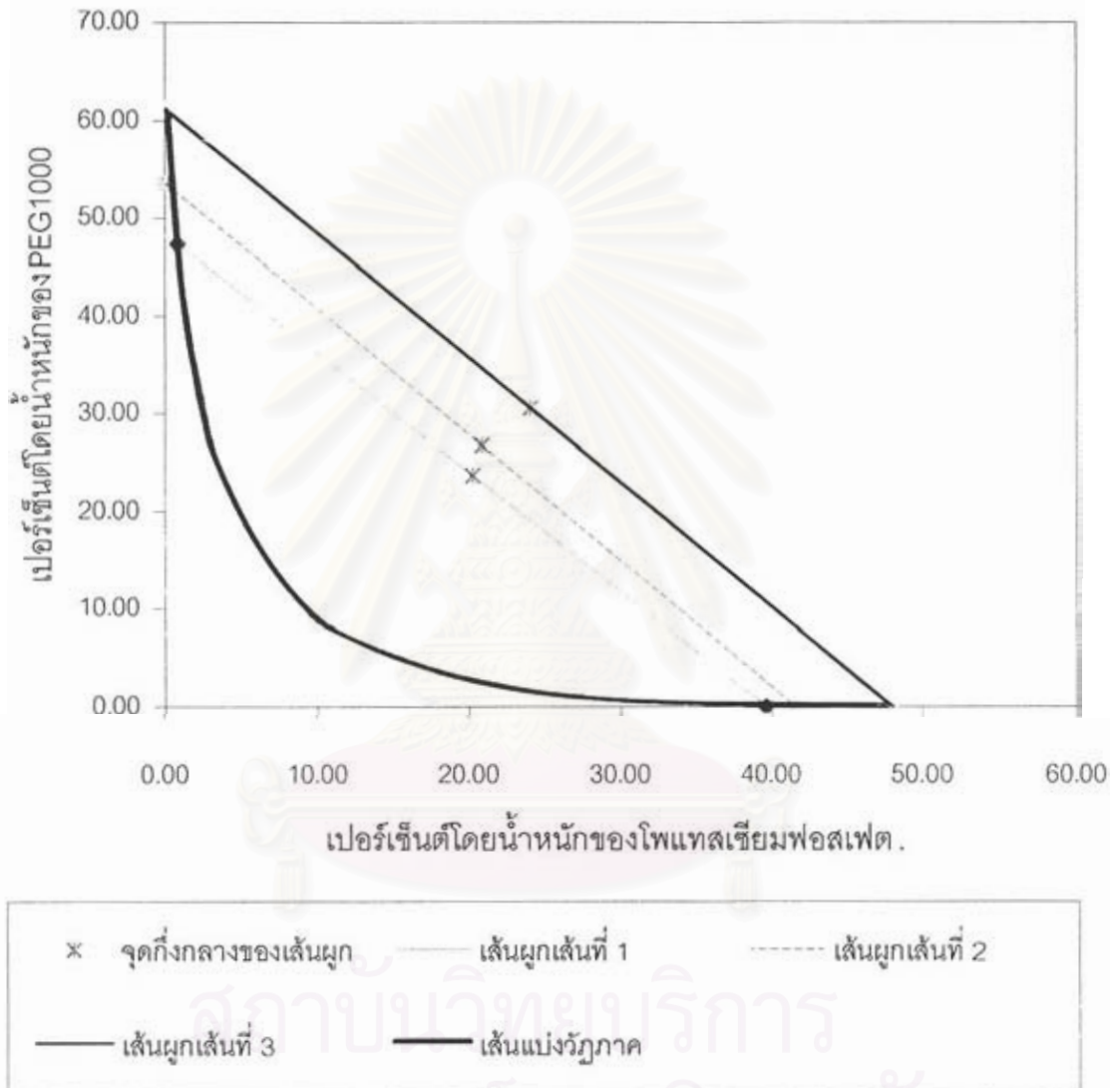
รูปที่ ข.4 แผนภาพภูมิภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ 0 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ

- ที่ 4 เเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5



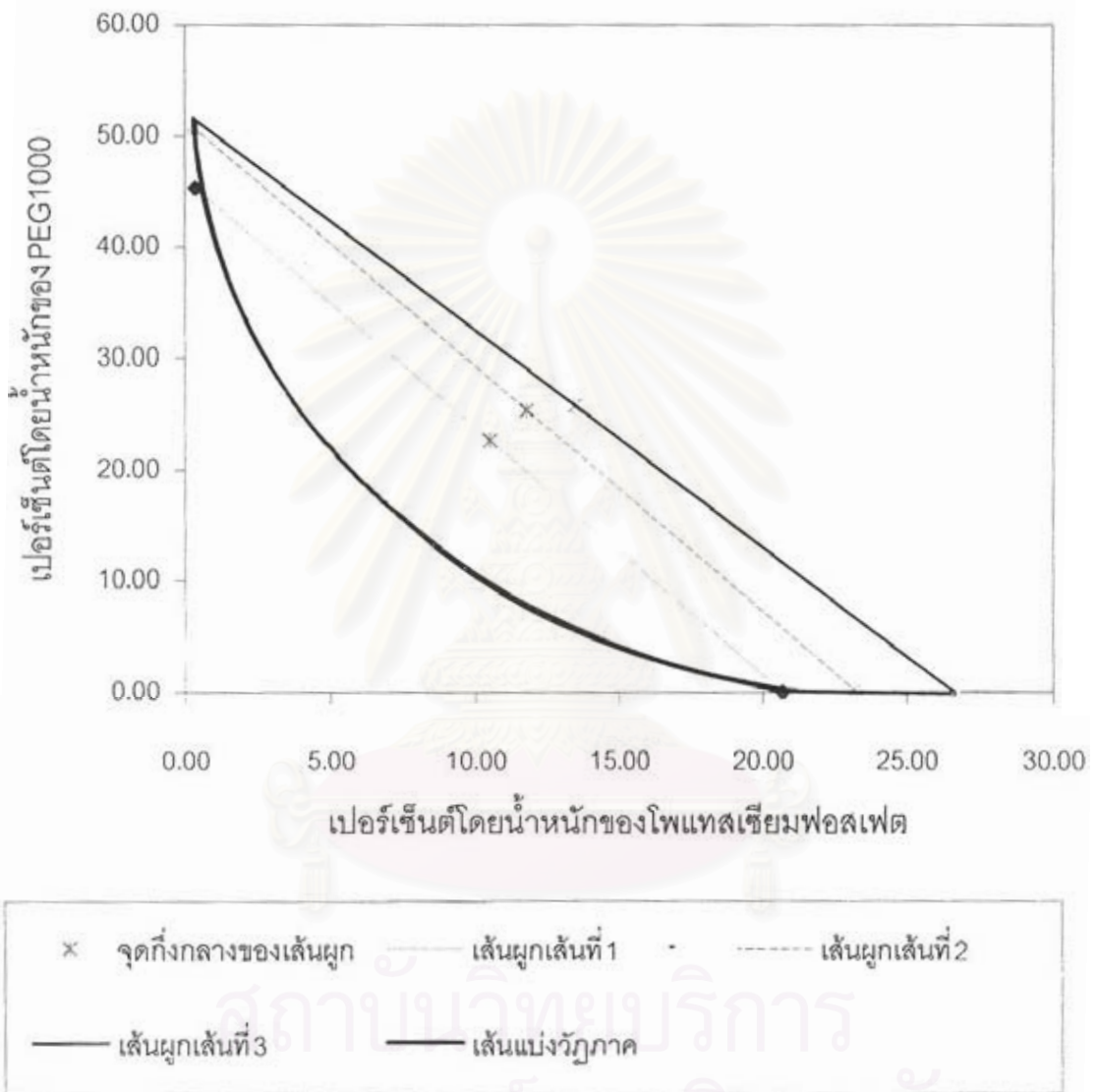
รูปที่ ข.5 แผนภาพภูมิภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ 4 เเปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ

- ที่ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.5



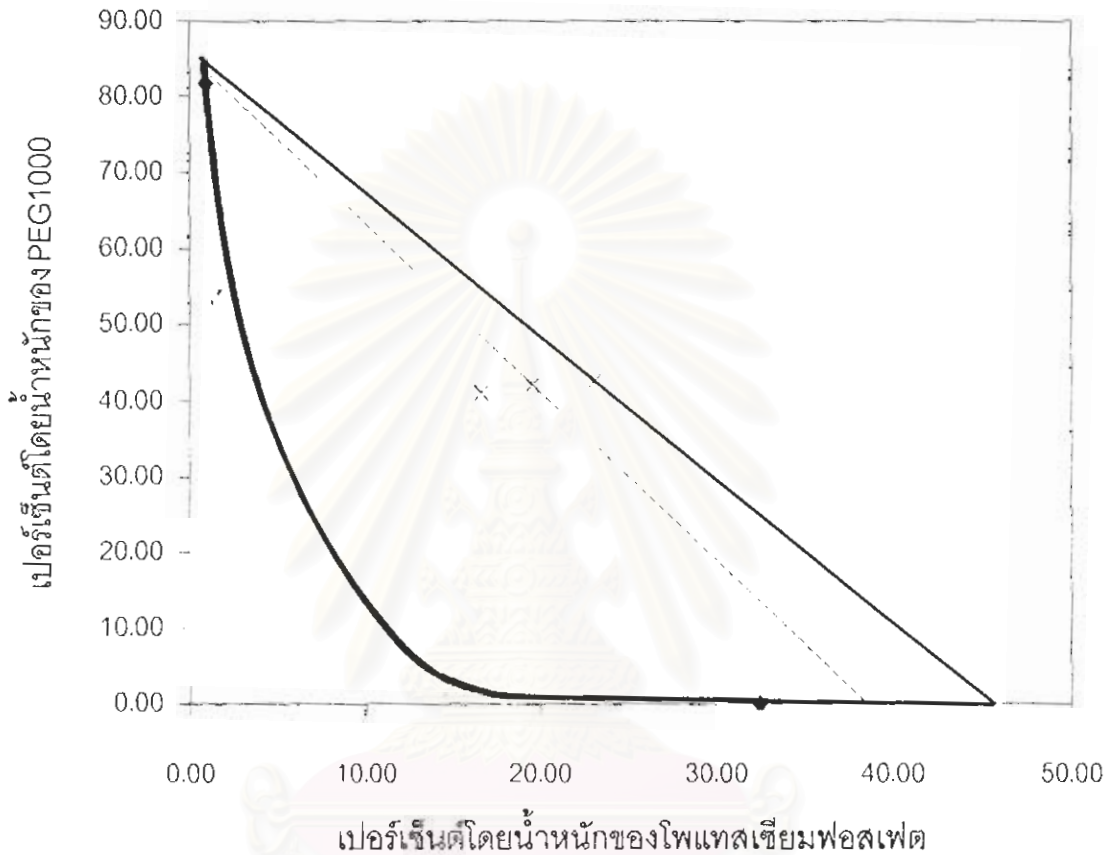
รูปที่ ข.6 แผนภาพวัฏภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.5, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ

- ที่ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9.5



รูปที่ ข.7 แผนภาพวัฏภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ 4 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9.5, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ

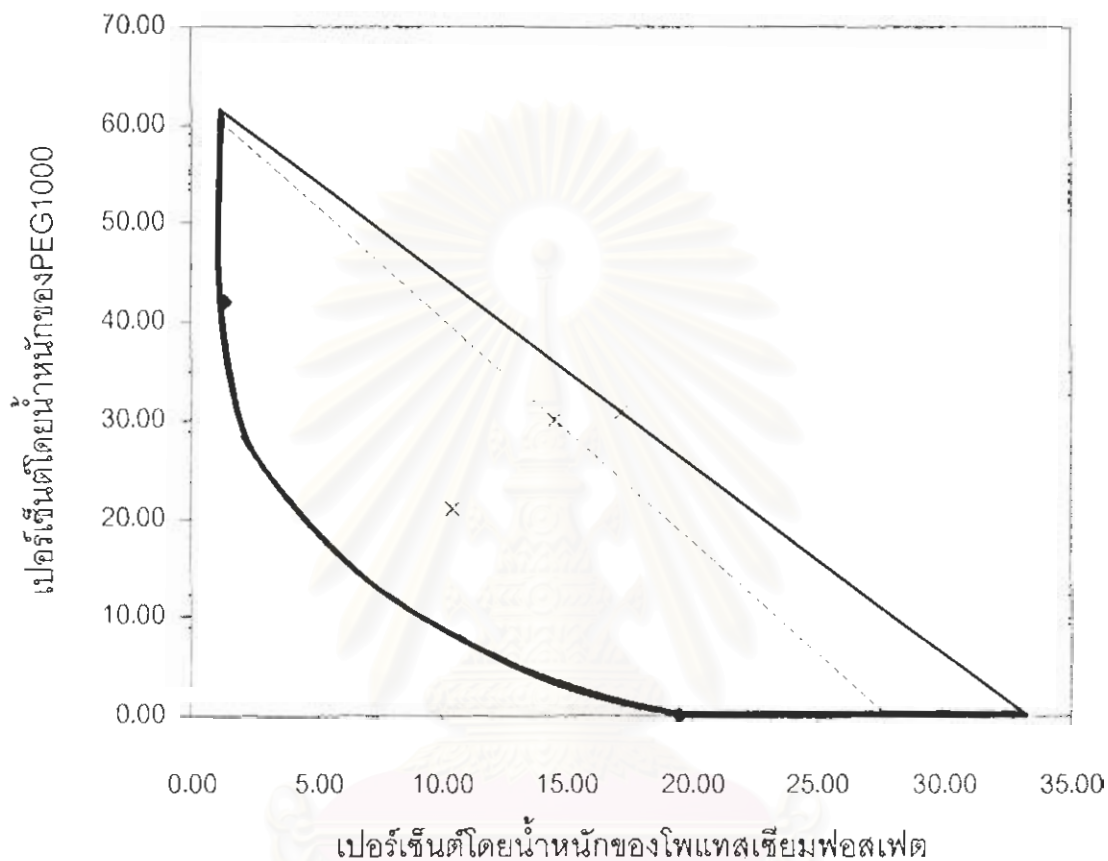
- ที่ 4 เเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5



x จุดกึ่งกลางของเส้นผูก เส้นผูกเส้นที่ 1 - - - เส้นผูกเส้นที่ 2
 ——— เส้นผูกเส้นที่ 3 ——— เส้นแบ่งวัฏภาค

รูปที่ ข.8 แผนภาพวัฏภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ 4 เเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ

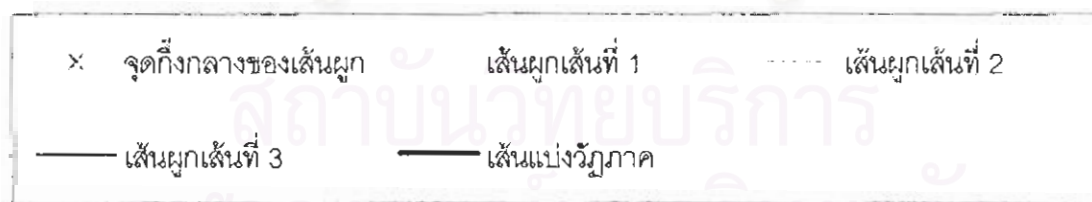
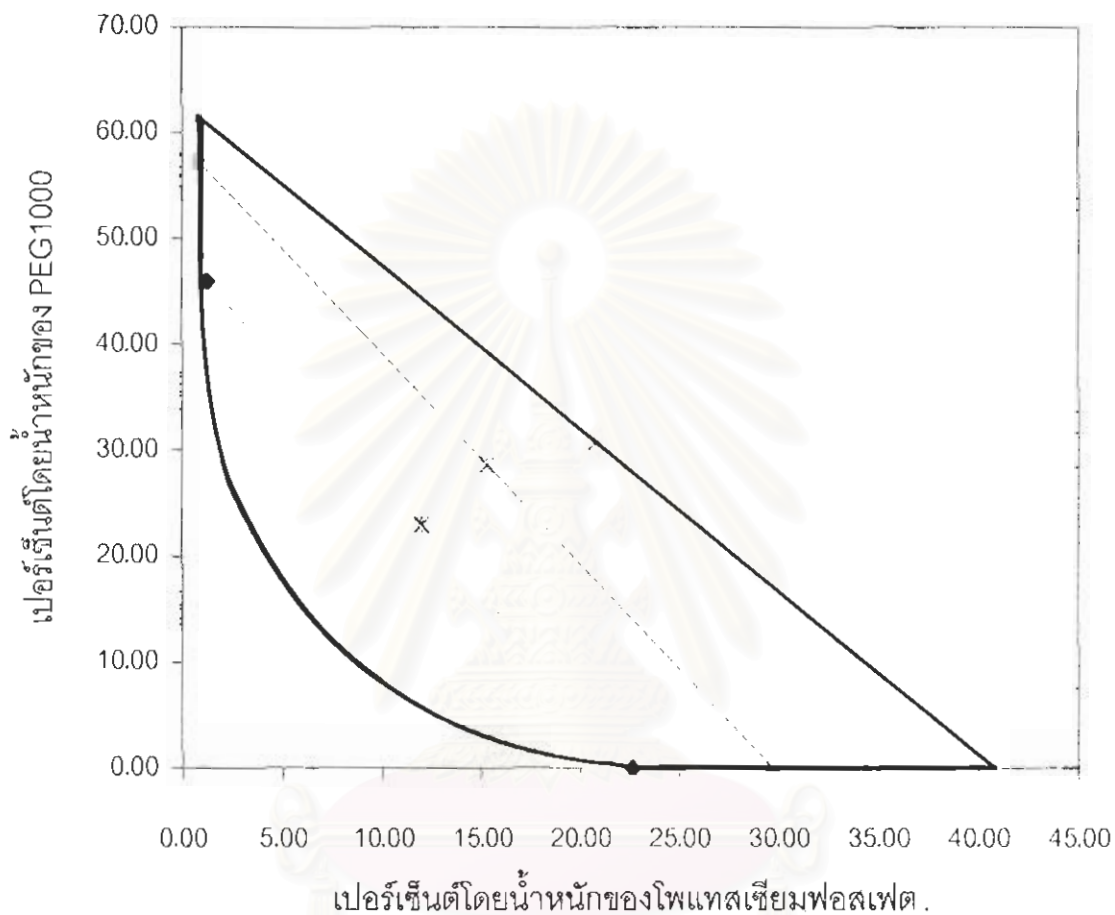
- ที่ 7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5



× จุดกึ่งกลางของเส้นผูก เส้นผูกเส้นที่1 เส้นผูกเส้นที่2
 ——— เส้นผูกเส้นที่3 ——— เส้นแบ่งวิฎภาค

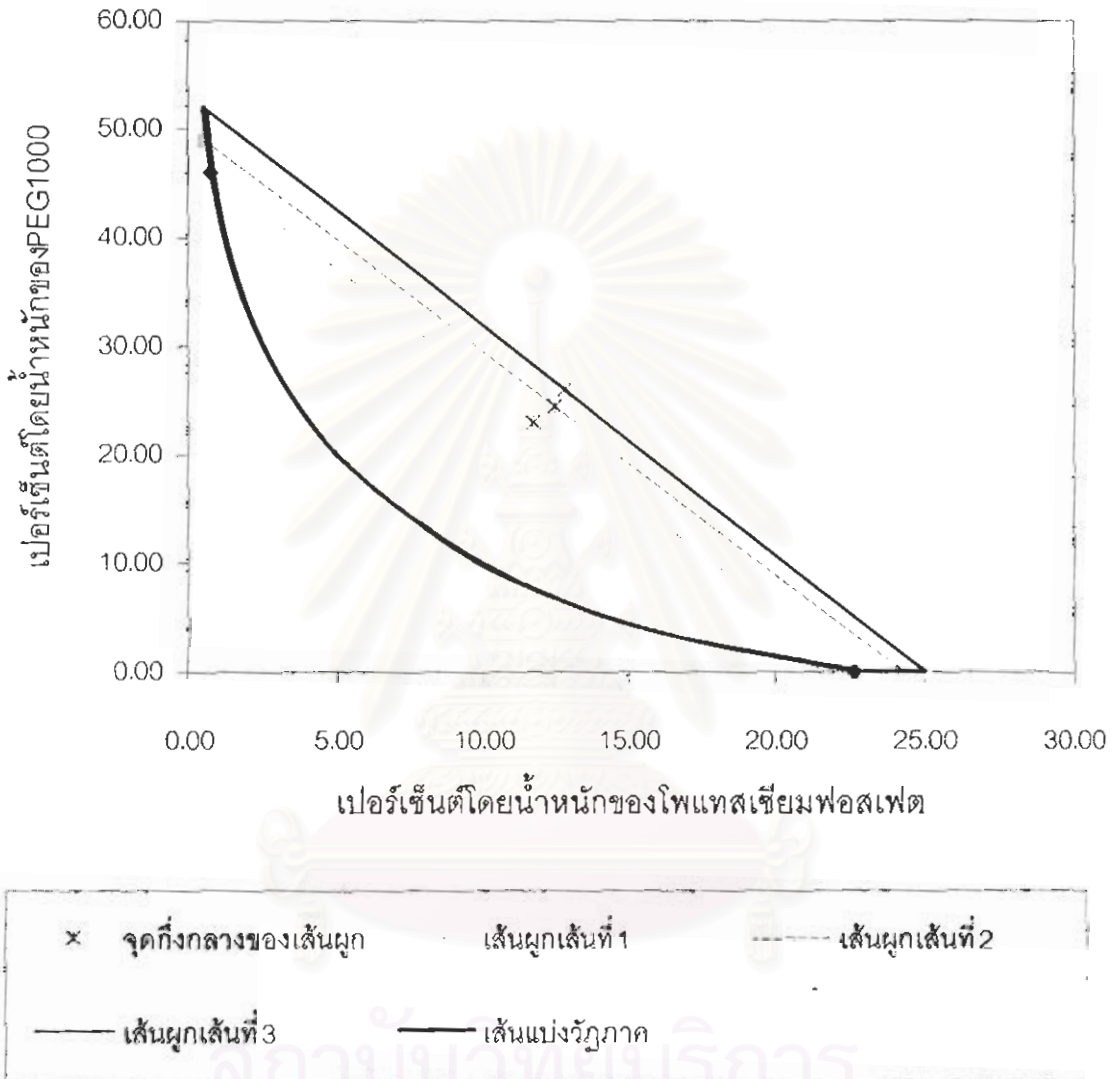
รูปที่ ๑.9 แผนภาพวิฎภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ 7 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ

- ที่ 7 เเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.5



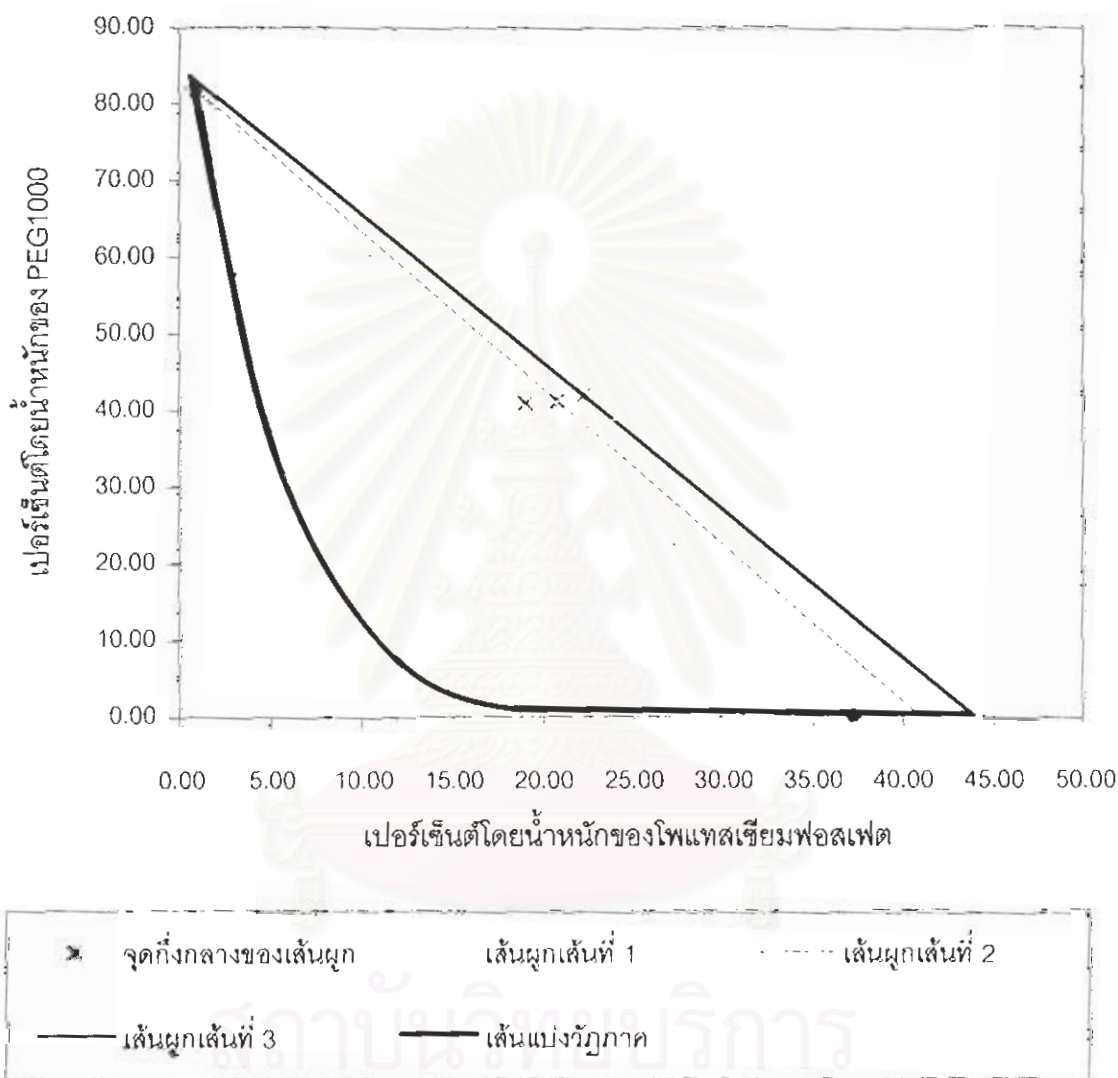
รูปที่ ข.10 แผนภาพวิฎภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ 7 เเปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.5, อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ

- ที่ 7 เเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9.5



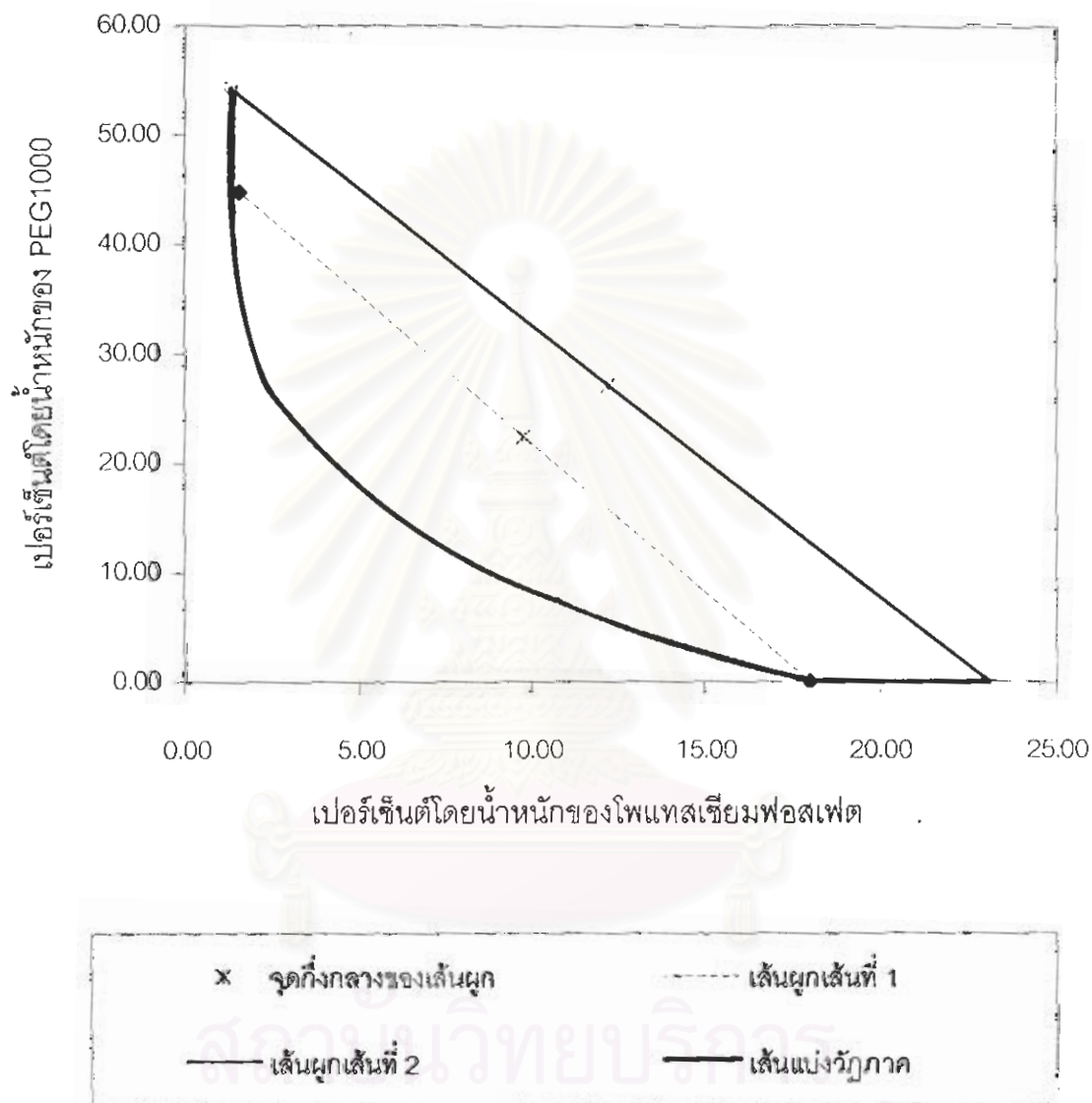
รูปที่ ข.11 แผนภาพวัฏภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ 7 เเปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9.5, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ

- ที่ 7 เเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5



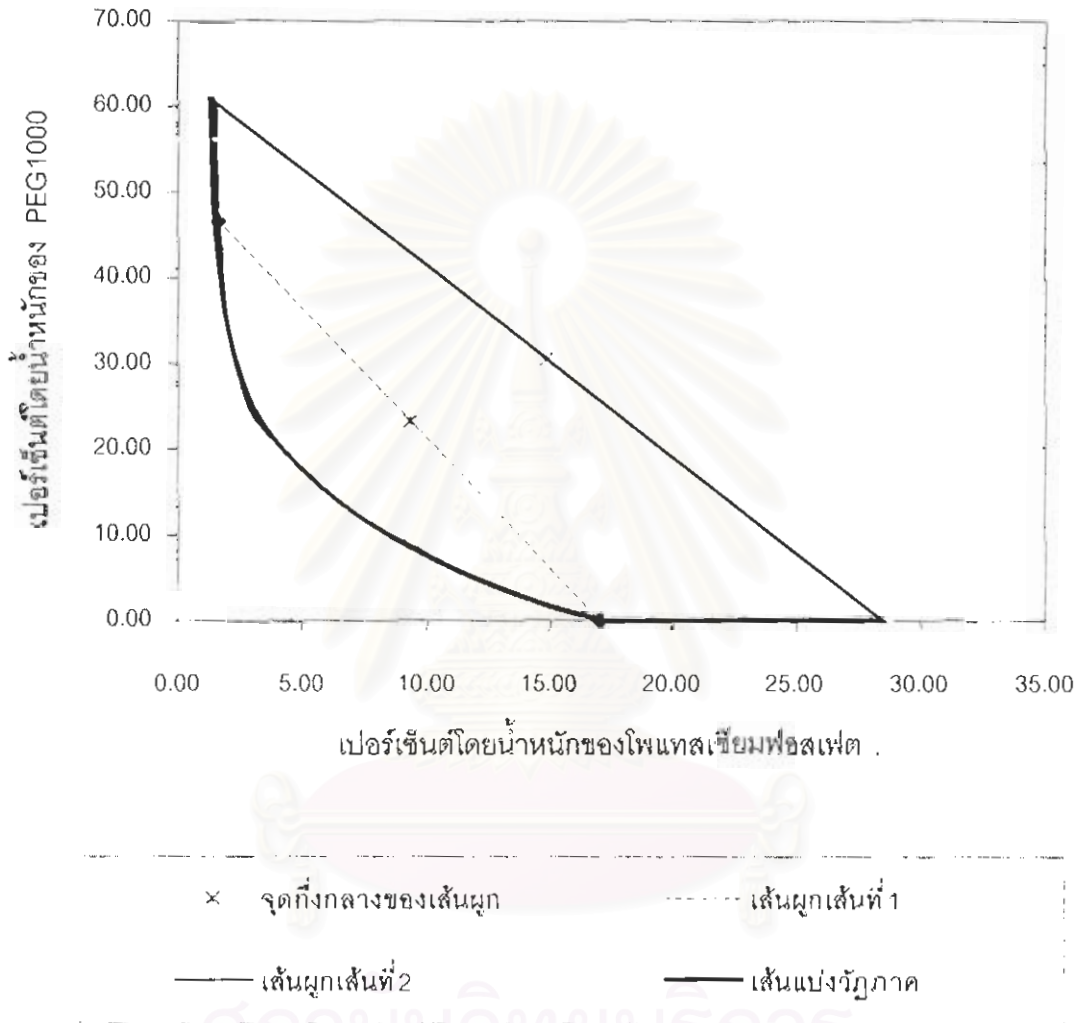
รูปที่ ข.12 แผนภาพวิภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ 7 เเปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ

- ที่ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5



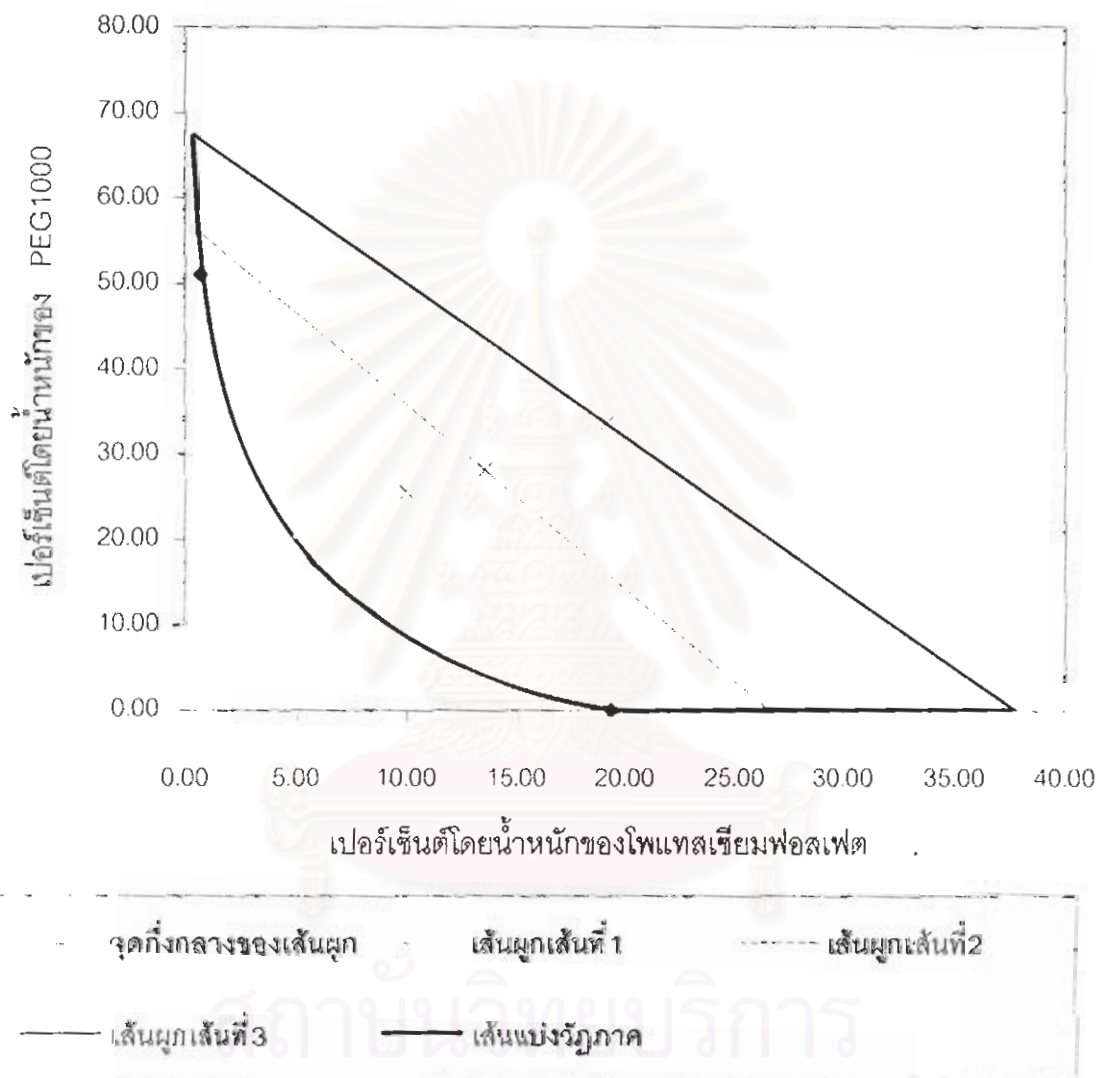
รูปที่ ข.13 แผนภาพวิฎภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5, อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ

- ที่ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.5



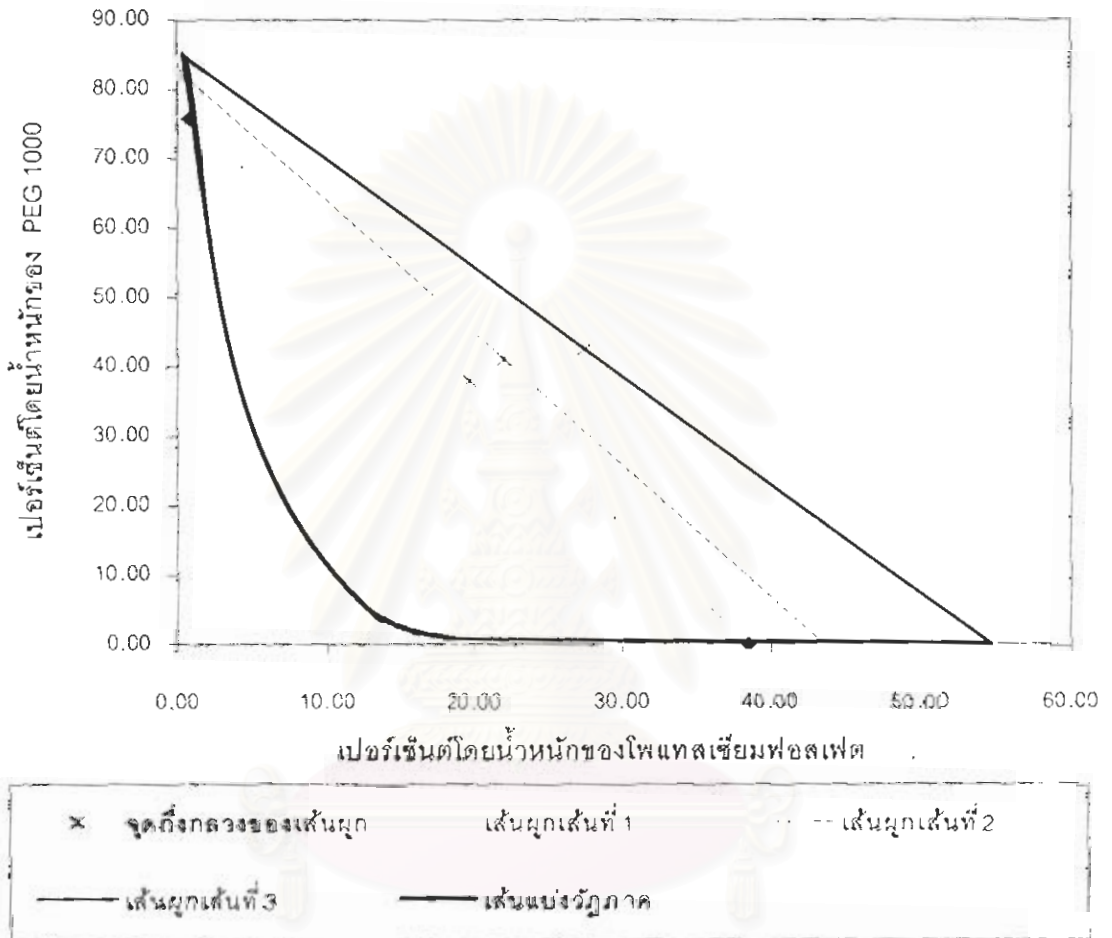
รูปที่ ข.14 แผนภาพวัฏภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.5, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ

- ที่ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9.5



รูปที่ ข.15 แผนภาพวิภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9.5, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ

- ที่ 10 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5



รูปที่ ข.16 แผนภาพวัฏภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ

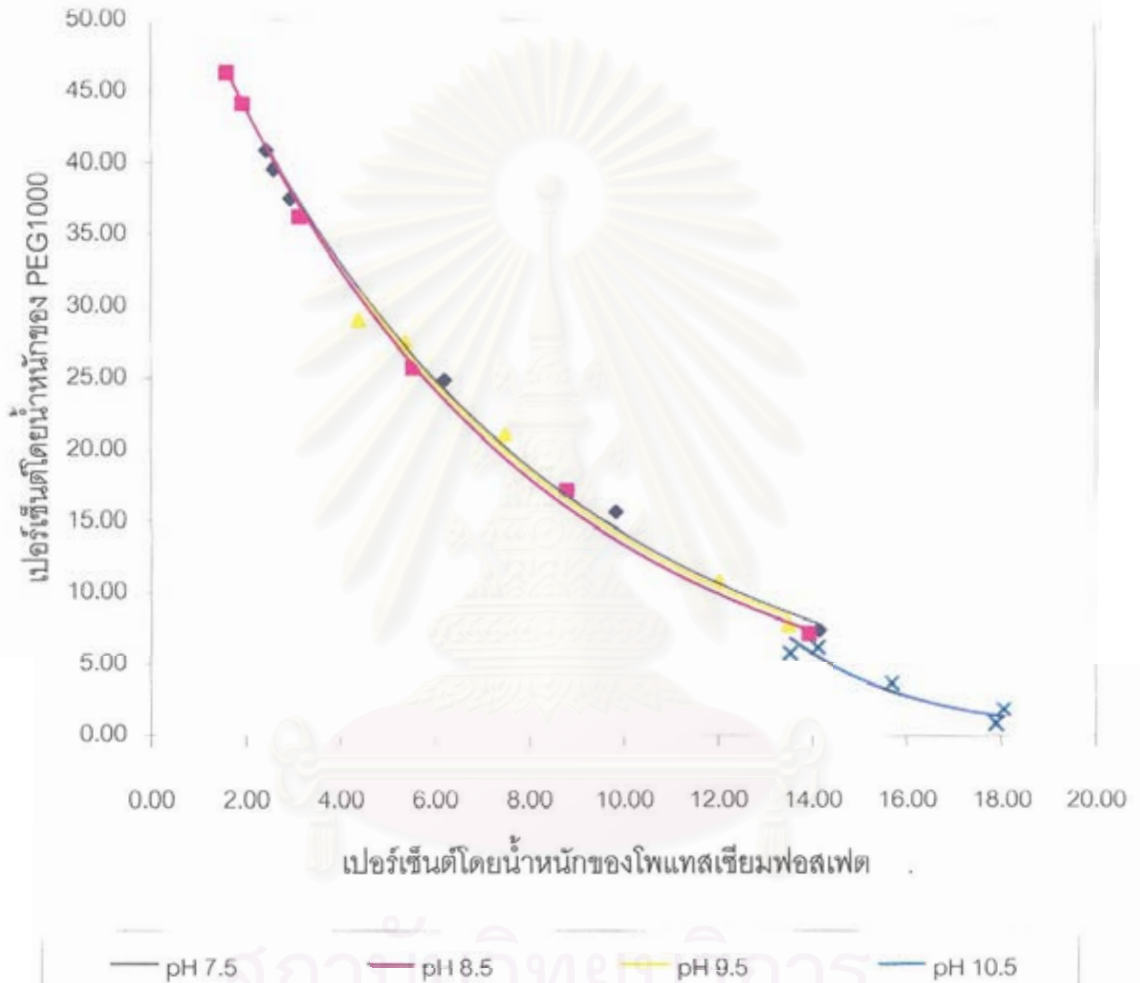


ภาคผนวก ค

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

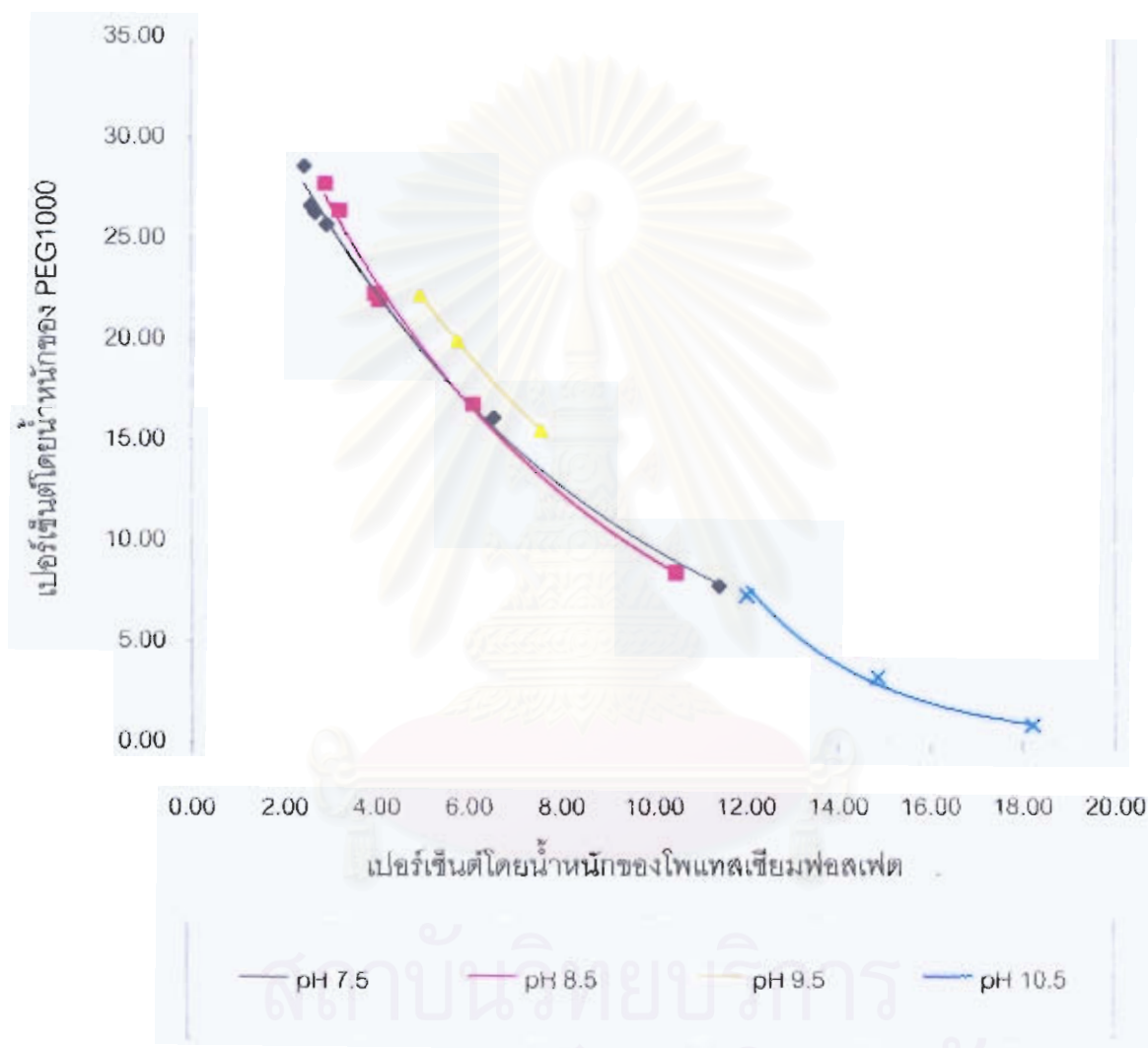
ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อเส้นแบ่งวัฏภาค

- ที่ 0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์



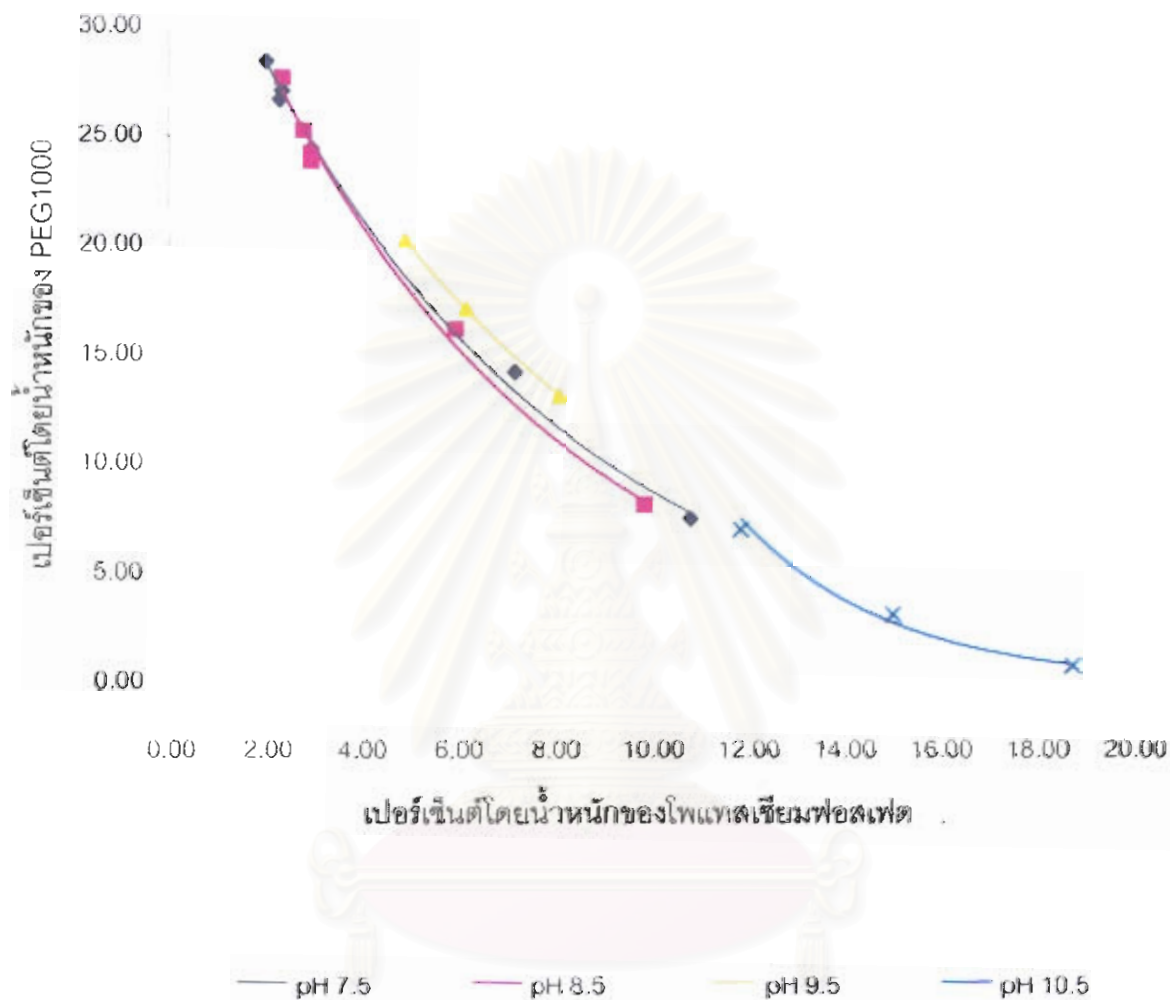
รูปที่ ค.1 แสดงเส้นแบ่งวัฏภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ 0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ

- ที่ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์



รูปที่ ค.2 แสดงเส้นแบ่งวิภูภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ
ที่ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส
และที่ความดันบรรยากาศ

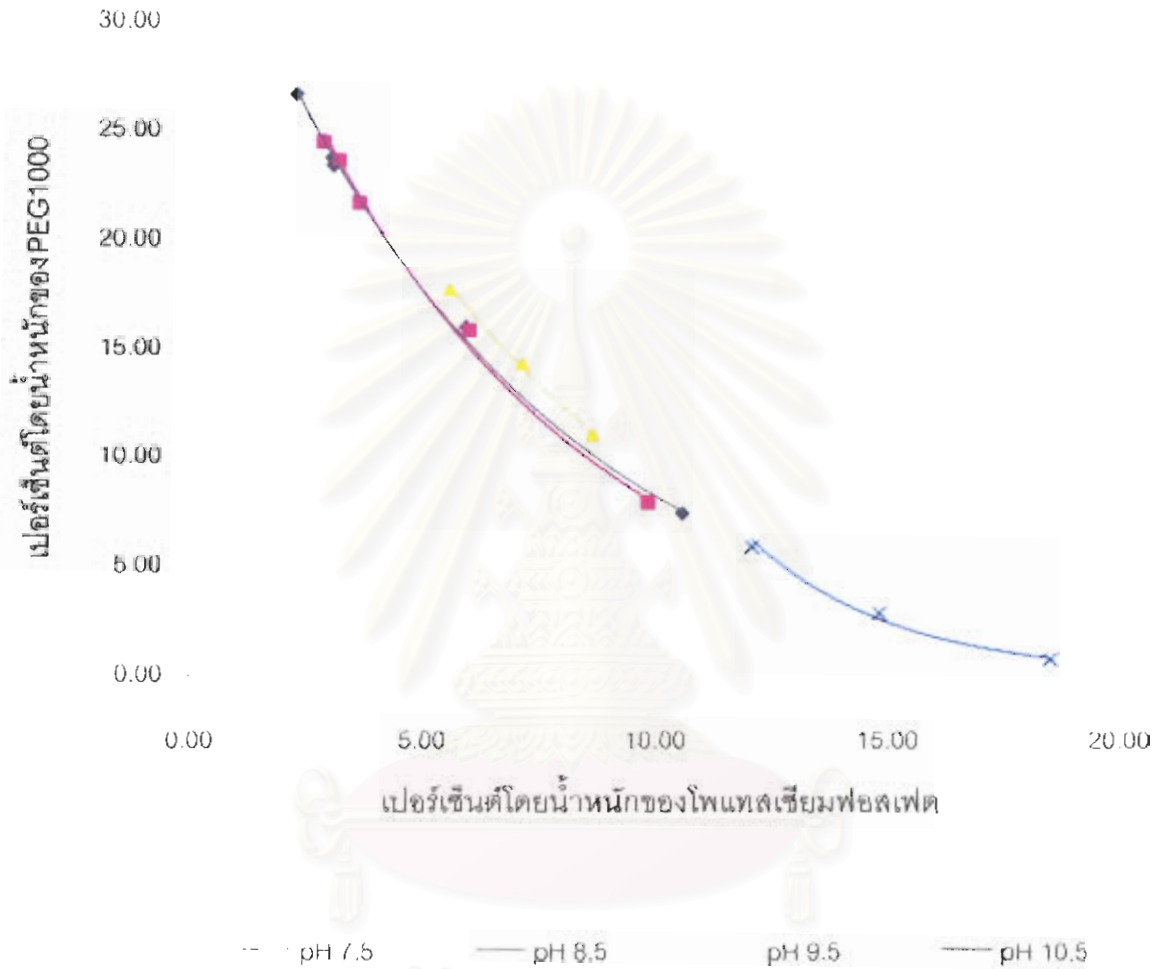
- ที่ 7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์



รูปที่ ๓.3 แสดงเส้นแบ่งวิภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ

ที่ 7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ

ที่ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์



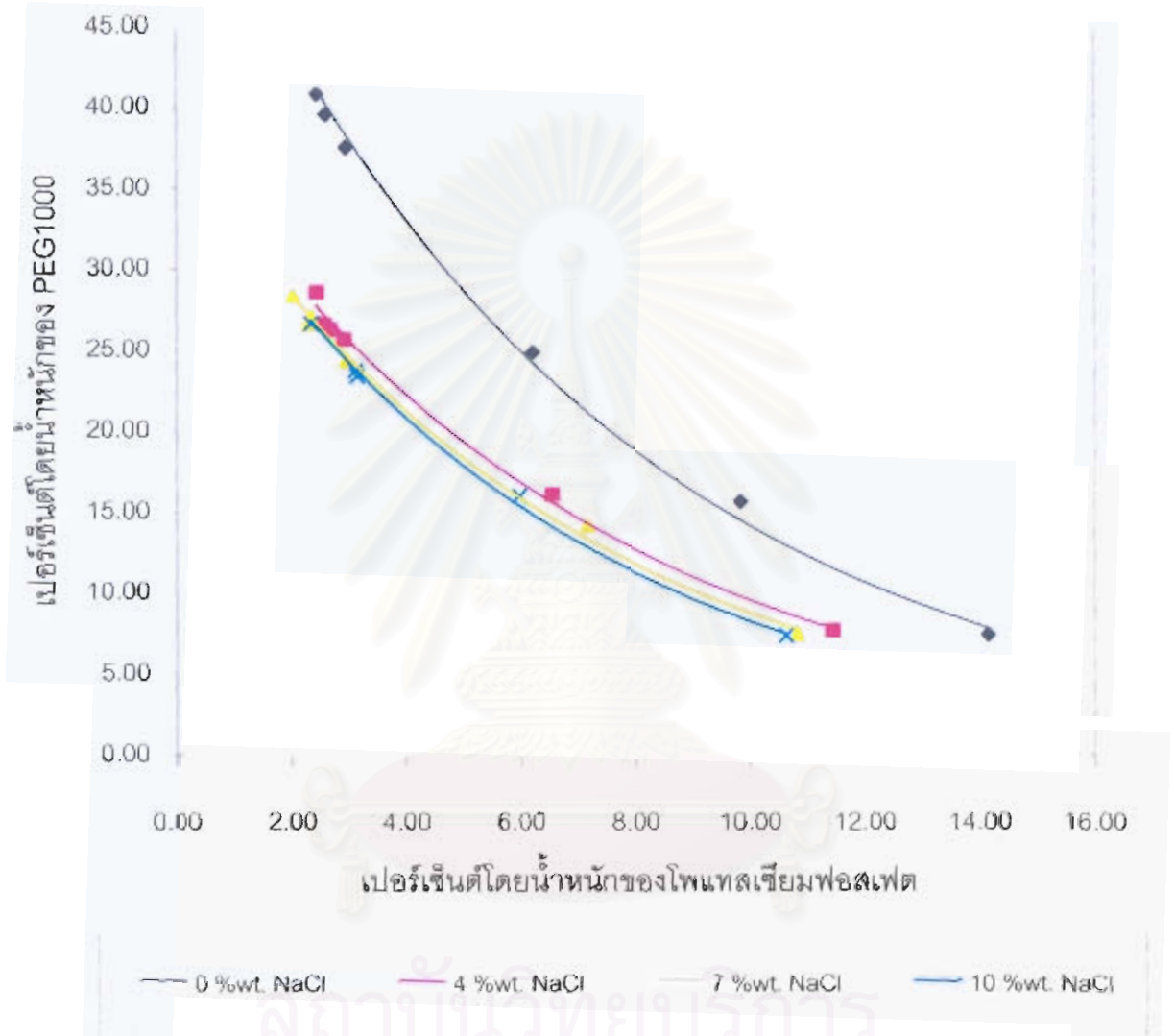
รูปที่ ค.4 แสดงเส้นแบ่งวิภากาศของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ
ที่ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, จุดหนุมมี 30 ± 2
องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

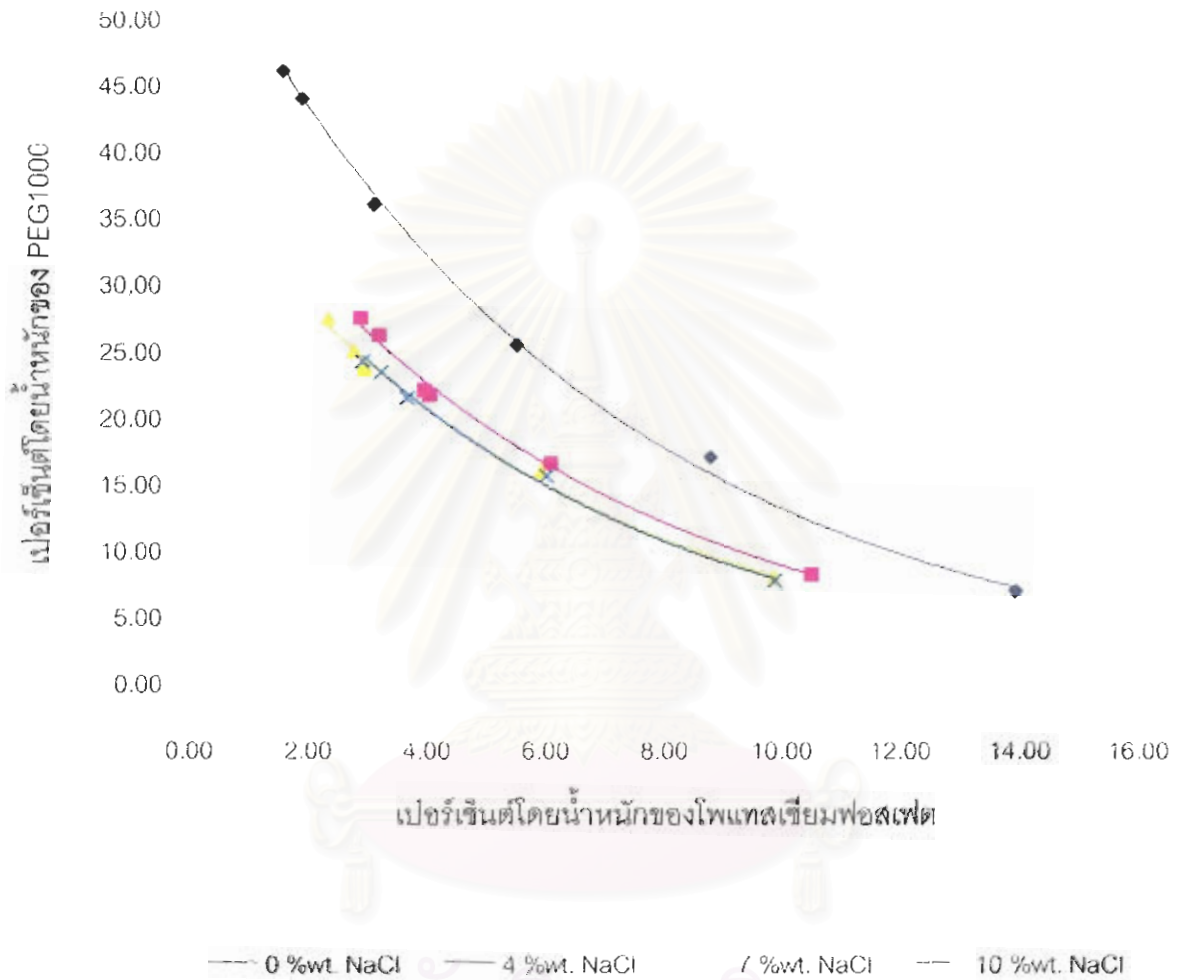
ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อเส้นแบ่งวิกฤต

- ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเท่ากับ 7.5



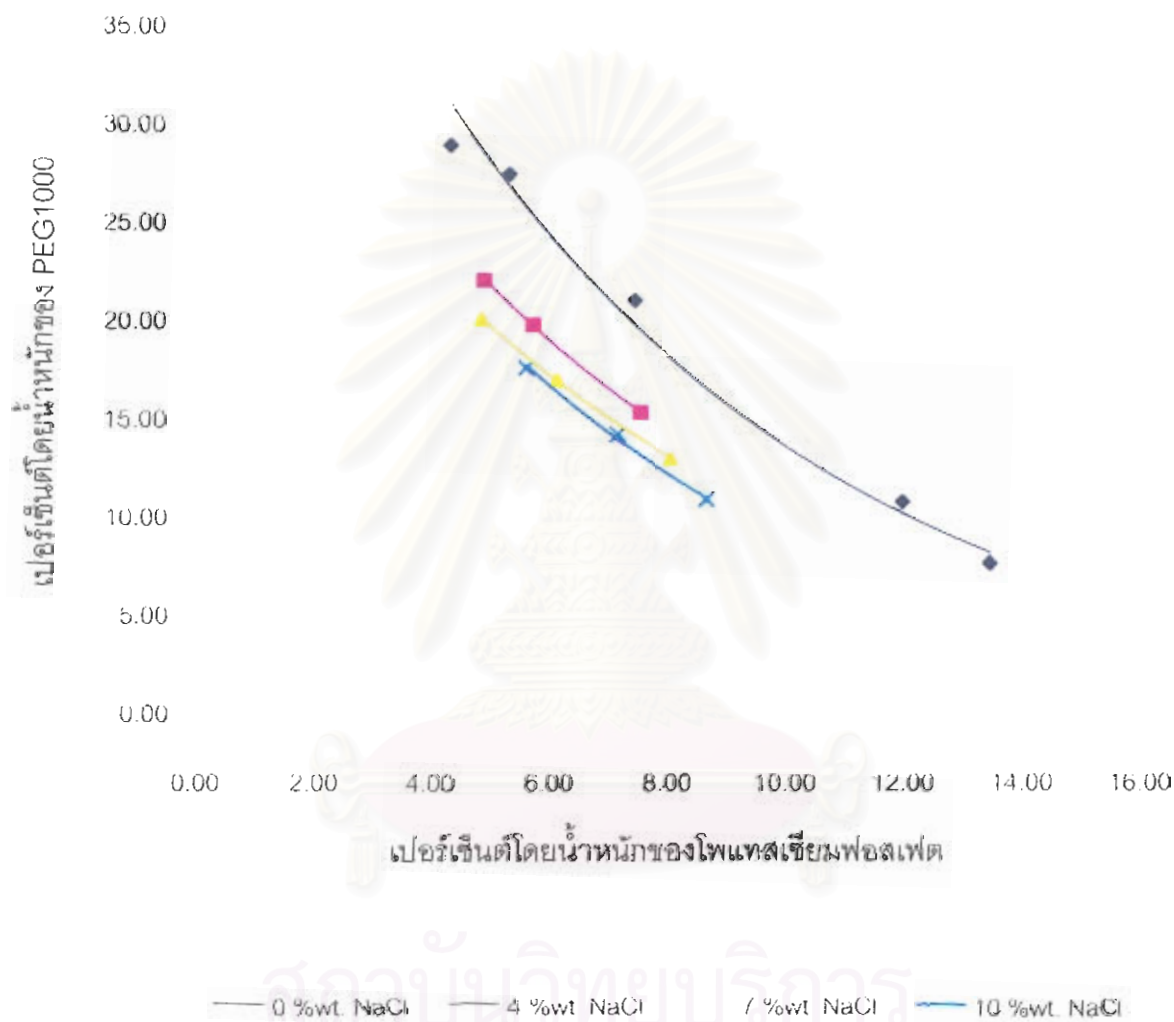
รูปที่ ง.1 แสดงเส้นแบ่งวิกฤตของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5, อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และ ที่ความดันบรรยากาศ

- ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเท่ากับ 8.5



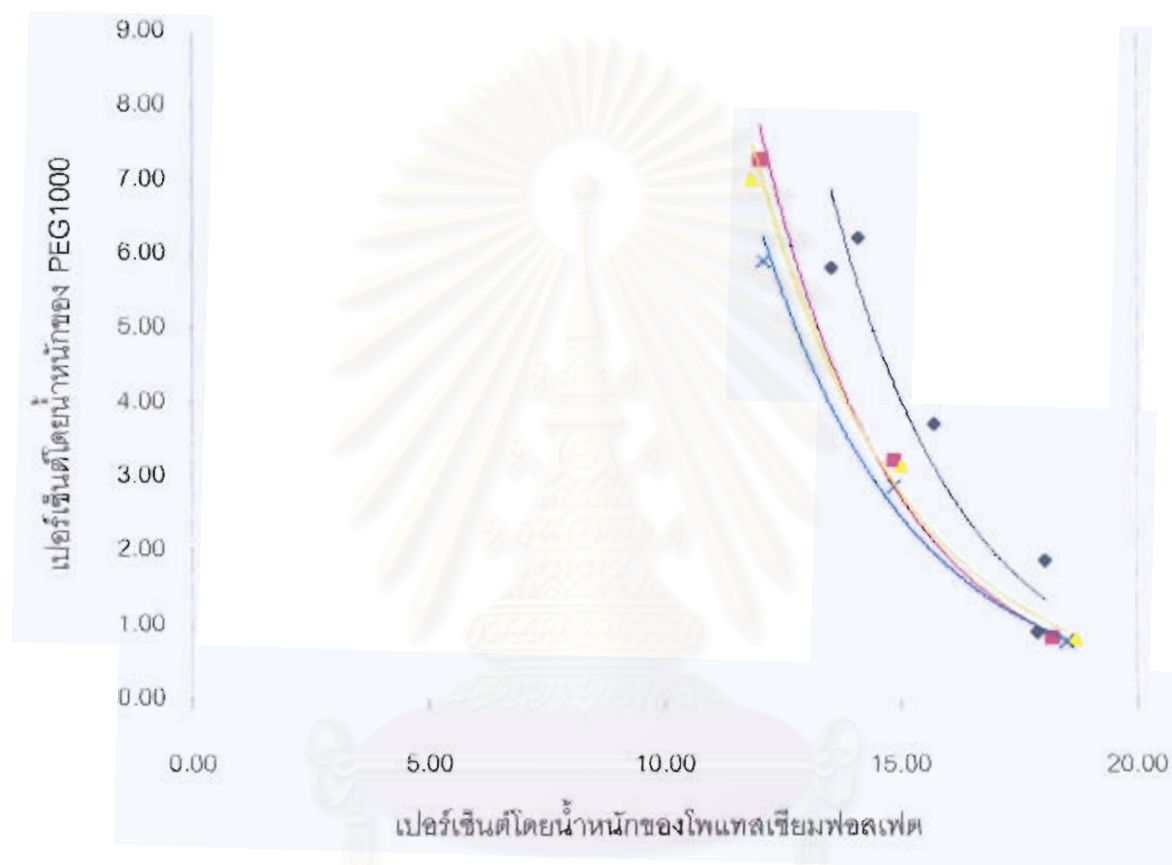
รูปที่ ๓.2 แสดงเส้นแบ่งภูมิภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.5 , อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และ ที่ความดันบรรยากาศ

- ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเท่ากับ 9.5



รูปที่ ๓.3 แสดงเส้นแบ่งวัฏภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9.5 , อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และ ที่ความดันบรรยากาศ

- ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเท่ากับ 10.5



รูปที่ ง.4 แสดงเส้นแบ่งวิภาคของระบบ PEG1000 / โพแทสเซียมฟอสเฟต / น้ำ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5 , อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส และ ที่ความดันบรรยากาศ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง

ตารางที่ ง.1 องค์ประกอบของสารในแต่ละวัฏภาคที่แสดงเส้นผูกในภาวะต่าง ๆ ที่ทำการทดลอง

X'	Y'	เส้นผูก เส้นที่	วัฏภาคบน (%w/w)		วัฏภาคล่าง (%w/w)	
			PEG1000	โพแทสเซียมฟอสเฟต	PEG1000	โพแทสเซียมฟอสเฟต
0	7.5	1	41.41	2.78	0.00	27.79
		2	54.77	2.57	0.00	36.25
		3	64.61	1.23	0.00	49.72
0	8.5	1	41.37	2.72	0.00	25.24
		2	51.56	1.68	0.00	38.55
		3	63.74	0.45	0.00	48.62
0	9.5	1	35.99	2.93	0.00	23.09
		2	43.72	1.91	0.00	27.98
		3	45.85	1.75	0.00	29.88
0	10.5	1	75.44	1.09	0.00	53.76
		2	77.26	1.07	0.00	61.27
		3	85.80	0.00	0.00	75.54
4	7.5	1	42.01	0.73	0.00	33.37
		2	52.02	0.70	0.00	40.01
		3	61.38	0.35	0.00	48.58
4	8.5	1	47.37	0.83	0.00	39.64
		2	53.54	0.09	0.00	41.61
		3	61.21	0.01	0.00	48.04
4	9.5	1	45.30	0.38	0.00	20.67
		2	50.71	0.33	0.00	23.27
		3	51.55	0.29	0.00	26.64
4	10.5	1	81.91	0.98	0.00	32.47
		2	84.00	0.73	0.00	38.58
		3	85.20	0.69	0.00	45.66

X คือ เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์

Y คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบ

ความยาวของเส้นผูกเส้นที่ 1 < 2 < 3

ตารางที่ ง.1 องค์ประกอบของสารในแต่ละภูมิภาคที่แสดงเส้นผูกในภาวะต่าง ๆ ที่ทำการทดลอง
(ต่อ)

X'	Y'	เส้นผูก เส้นที่	ภูมิภาคบน (%w/w)		ภูมิภาคล่าง (%w/w)	
			PEG1000	โพแทสเซียมฟอสเฟต	PEG1000	โพแทสเซียมฟอสเฟต
7	7.5	1	42.03	1.35	0.00	19.48
		2	60.04	1.24	0.00	27.81
		3	61.59	1.10	0.00	33.28
7	8.5	1	45.98	1.26	0.00	22.66
		2	57.28	0.85	0.00	29.72
		3	61.58	0.80	0.00	40.81
7	9.5	1	45.97	0.78	0.00	22.68
		2	48.92	0.59	0.00	24.31
		3	52.02	0.51	0.00	25.04
7	10.5	1	81.74	0.83	0.00	37.24
		2	82.28	0.68	0.00	40.91
		3	83.79	0.54	0.00	43.94
10	7.5	1	44.75	1.55	0.00	18.00
		2	54.13	1.34	0.00	23.09
10	8.5	1	46.57	1.65	0.00	17.09
		2	61.06	1.25	0.00	28.59
10	9.5	1	51.10	0.73	0.00	19.39
		2	56.29	0.56	0.00	26.63
		3	67.26	0.49	0.00	37.85
10	10.5	1	75.65	0.84	0.00	38.47
		2	82.01	0.43	0.00	43.52
		3	84.86	0.38	0.00	54.57

X คือ เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์

Y คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบ

ความยาวของเส้นผูกเส้นที่ 1 < 2 < 3

ตารางที่ ง.2 องค์ประกอบของระบบที่ใช้ในการหาค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอส
จาก *B. subtilis* NS 99 ในทุกภาวะที่ทำการทดลอง

X'	Y'	เส้นผูก เส้นที่	PEG1000 (%w/w)	โพแทสเซียมฟอสเฟต (%w/w)	
				K ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄
0	7.5	1	20.70	10.73	4.56
		2	27.39	12.62	6.79
		3	32.31	13.00	12.48
0	8.5	1	20.68	13.10	0.88
		2	25.78	18.53	1.59
		3	31.87	20.90	3.64
0	9.5	1	18.00	12.99	0.02
		2	21.86	14.88	0.07
		3	22.92	15.61	0.21
0	10.5	1	37.72	27.43	0.00
		2	38.63	31.17	0.00
		3	42.90	37.77	0.00
4	7.5	1	21.00	15.34	1.71
		2	26.01	18.01	2.35
		3	30.69	20.85	3.61
4	8.5	1	23.69	19.88	0.35
		2	26.77	20.45	0.40
		3	30.60	23.29	0.74
4	9.5	1	22.65	10.52	0.00
		2	25.35	11.80	0.00
		3	25.77	13.40	0.06
4	10.5	1	40.95	16.73	0.00
		2	42.00	19.65	0.00
		3	42.60	23.15	0.02

X' คือ เบียร์เริ่มต้นโดยน้ำหนักของโพรตีนเคสซีน, Y' คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบ

ความยาวของเส้นผูกเส้นที่ 1 < 2 < 3

ตารางที่ ง.2 องค์ประกอบของระบบที่ใช้ในการหาค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอส จาก *B. subtilis* NS 99 ในทุกภาวะที่ทำการทดลอง (ต่อ)

X	Y	เส้นผูก เส้นที่	PEG1000 (%w/w)	โพแทสเซียมฟอสเฟต (%w/w)	
				K ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄
7	7.5	1	21.02	9.72	0.70
		2	30.02	13.50	1.02
		3	30.80	15.70	1.49
7	8.5	1	22.99	11.94	0.02
		2	28.64	15.28	0.00
		3	30.79	20.81	0.00
7	9.5	1	22.99	11.73	0.00
		2	24.46	12.45	0.00
		3	26.01	12.77	0.00
7	10.5	1	40.87	19.04	0.00
		2	41.14	20.79	0.00
		3	41.89	22.24	0.00
10	7.5	1	22.38	9.16	0.62
		2	27.06	11.40	0.81
10	8.5	1	23.28	9.37	0.00
		2	30.53	14.92	0.00
10	9.5	1	25.55	10.06	0.00
		2	28.15	13.60	0.00
		3	33.63	19.17	0.00
10	10.5	1	37.82	19.66	0.00
		2	41.00	21.97	0.00
		3	42.43	27.47	0.00

X คือ เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโซเดียมคลอไรด์, Y คือ ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบ

ความยาวของเส้นผูกเส้นที่ 1 < 2 < 3

ประวัติผู้เขียน

นางสาวนันทิญา วงษ์มงคล เกิดเมื่อวันที่ 22 พฤศจิกายน พ.ศ. 2517 ที่ กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร และโภชนาการ ภาควิชาคหกรรมศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ในปีการศึกษา 2538 หลังจากนั้นได้เข้าศึกษาในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2540



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย