

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 แหล่งของเอนไซม์แลคเคส (Source of Laccase)

เอนไซม์ชนิดนี้พบใน พืชชั้นสูง แมลงบางชนิด และเชื้อรา (Riva, 2006; Sadhasivam et al., 2008) โดยเฉพาะจากพวกไวท์รอต (white-rot) เป็นราที่ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตและลิกนินในเนื้อไม้ได้เร็วและสมบูรณ์ แสดงให้เห็นว่าราในกลุ่มนี้ผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโกลติกได้ดี (ligninolytic enzyme) เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ แลคเคส (Laccase), แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase), ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase) เป็นต้น อย่างไรก็ตามแลคเคสเป็นเอนไซม์ที่ได้รับความนิยมมากกว่าเอนไซม์ตัวอื่นในกลุ่มลิกนินโกลติก เนื่องจากสามารถออกซิไดส์โดยใช้ออกซิเจน ในขณะที่กลุ่มเปอร์ออกซิเดสจะอาศัยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นโคแฟกเตอร์ และมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นมากกว่า (Thurston, 1994) เอนไซม์นี้เป็นได้ทั้ง extra- และ intracellular enzyme ขึ้นอยู่กับแหล่งกำเนิดที่พา

แลคเคสถูกศึกษามากในกลุ่มเชื้อรา (Couto and Toca-Herrera, 2007; Wesenberg et al., 2003) เนื่องจากให้ปริมาณผลผลิตที่สูง ใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสั้นกว่าพืชและแมลง จับกับสารตั้งต้นหลากชนิด สามารถกำจัดสีข้อมได้ในหลายกลุ่ม เช่น แลคเคสจาก *Panus rudis* 0.016 µg/ml สามารถกำจัดสีข้อมกลุ่มแอนทราควิโนนได้ 74% ใน 30 นาที สีกุ่มอะโซและอินดิโกคาไมด์ ได้ 26 และ 12% ตามลำดับ ใน 1 ชั่วโมง (Zhang et al., 2006) แลคเคสจาก *Cerrena unicolor* ถูกนำมาใช้ย่อยสลายสีข้อมในกลุ่มสีอะโซและแอนทราควิโนน (Michniewicz et al., 2008) *Cyathus bulleri* ผลิตแลคเคส และ ถูกนำมาใช้ในการกำจัดสีข้อมเบสิกและสีแอซิด (Chhabra et al., 2009) ส่วนใหญ่มวลโมเลกุลของแลคเคสที่พบในกลุ่มเชื้อรามีขนาด 59-110 kDa (Wesenberg et al., 2003) และมีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ 10-45 % ทำให้เสถียรภาพของเอนไซม์เพิ่มขึ้น (Claus, 2004) ปัจจุบันแลคเคสยังพบในโพรคาริโอติกเซลล์ พวกแบคทีเรีย เช่น *Klebsiella pneumoniae* (Wong and Yuen, 1996), *Streptomyces psammoticus* (Niladevi and Prema, 2008), *Bacillus subtilis* (Wang et al., 2008) และ *Pseudomonas desmolyticum* (Kalme et al., 2009)

ในการศึกษาครั้งนี้เลือกแหล่งเอนไซม์จาก *Lentinus polychrous* Lev. ซึ่งรู้จักกันในชื่อของเห็ดขอนดำ เห็ดลม เห็ดกระด้าง หรือเห็ดบด พบและนิยมนำมาบริโภคมากในเขตภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ เป็นเชื้อราในกลุ่มไวท์รอตชนิดที่สร้างเอนไซม์แลคเคสแล้วขับออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ลักษณะของเห็ดชนิดนี้ประกอบด้วย

1. หมวกดอก (Cap หรือ Pileus) หมวกดอกมีสีน้ำตาลหรือน้ำตาลอมเทาอ่อน ลักษณะรูปทรงคล้ายแตร บริเวณกลางหมวกดอกปุ่มลึกลงเป็นทรงกรวย หมวกดอกเหนียว ฉีกขาดยาก ผิวหมวกดอกขรุขระ มีขนเล็กๆ

ปกคลุมทั่วผิวหมวกดอก ขอบหมวกดอกแผ่กางออก บางดอกขอบหมวกดอกงอกลงและหยักเป็นคลื่น บางดอก ขอบหมวกดอกมีก้นขาด ขนาดหมวกดอกกว้าง 4.0-6.0 เซนติเมตร ยาว 4.0-7.0 เซนติเมตร

2. ครีบอก (Gill หรือ Lamella) ครีบอกมีสีน้ำตาลอ่อนหรือน้ำตาลอมดำ ลักษณะครีบอกเรียงตัวกันถี่ ฐานไปตามก้านดอก ครีบอกยึดติดเป็นแผ่นเดียวกับก้านดอก

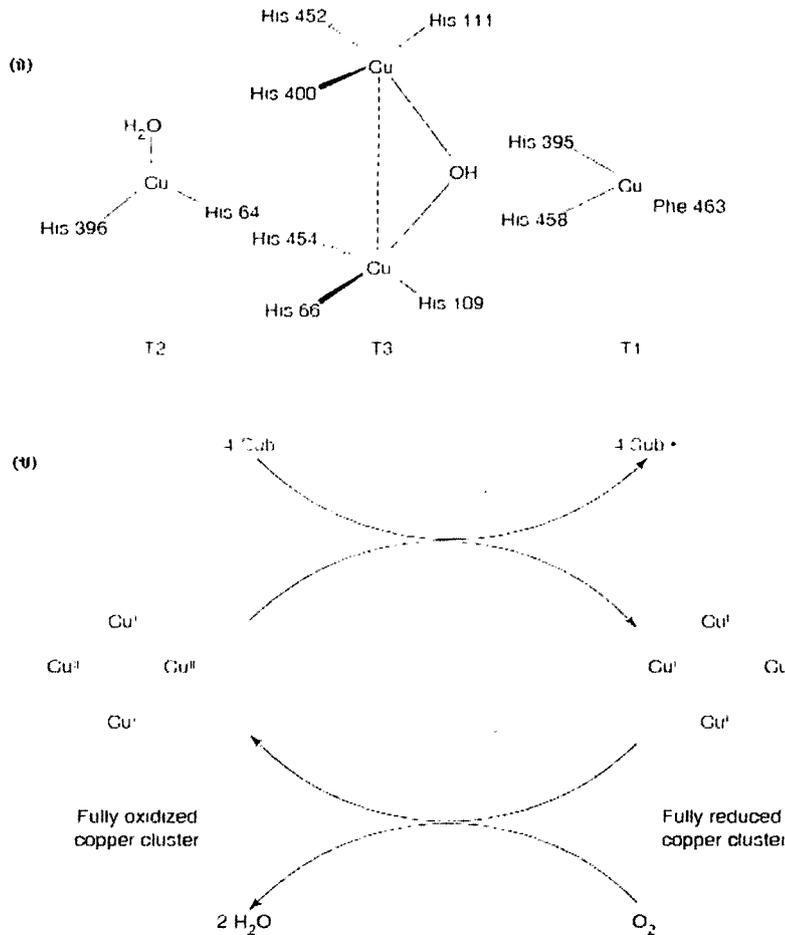
3. ก้านดอก (Stalk หรือ Stipe) ก้านดอกมีสีน้ำตาลอมเหลืองหรือน้ำตาลอมดำ ก้านดอกมีรูปทรงเป็น ทรงกระบอก ภายในก้านดอกตัน เนื้อภายในก้านดอกมีสีขาวหรือขาวอมน้ำตาลอ่อน มีลักษณะเป็นเส้นใยเรียง ตัวตามยาวอัดตัวแน่น ก้านดอกเหนียวและฉีกขาดยาก บริเวณโคนก้านดอกโป่งพองออกเล็กน้อย ขนาดก้านดอก กว้าง 0.5-0.8 เซนติเมตร ยาว 2.5-3.5 เซนติเมตร

4. สปอร์ (Basidiospore) สปอร์มีลักษณะเป็นรูปวงรี ผิวสปอร์เรียบ ขนาดสปอร์มีขนาด 2.7 4.0 x 4.0-5.4 ไมโครเมตร สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในน้ำกลั่นใสไม่มีสี ไม่สามารถทำพิมพ์สปอร์ได้

## 2.2 การทำงานของแลคเคส

แลคเคสเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม benzenediol: oxygen oxidoreductase (EC 1.10.3.2) ประกอบด้วยไกลโค โปรตีนและส่วนมากพบว่ามีโมเลกุลของคอปเปอร์ประมาณ 4 โมเลกุลเป็นองค์ประกอบโดยจับกับกรดอะมิโน ซีสเทอีน 1 โมเลกุลและกรดอะมิโนซิสทีน 10 โมเลกุล (ดังรูปที่ 2.1) บางครั้งจึงเรียกเอนไซม์ชนิดนี้ว่า blue copper oxidase (Riva, 2006)

หน้าที่ของแลคเคสคือจะเร่งปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันในสารตั้งต้น และเนื่องจากแลคเคสมี ความจำเพาะเจาะจงต่อวงแหวนอะโรมาติก (aromatic rings) น้อยจึงสามารถออกซิไดส์สารตั้งต้นได้หลากหลายชนิด (D'Annibale et al., 2000; Rodríguez Couto and Toca Herrera, 2006; Rosconi et al., 2005) เช่น สารอินทรีย์ (organic substance), สารอนินทรีย์ (inorganic substance), ไดฟีนอล (diphenol), โพลีฟีนอล (polyphenols), ไดเอมีน (diamines), อะโรมาติกเอมีน (aromatic amines) และ แอสคอเบท (ascorbate) (Kalme et al., 2009; Rodríguez Couto and Toca Herrera, 2006) โดยอิเล็กตรอนในสารตั้งต้นจะถูกขนย้ายไปยังคอปเปอร์ในโมเลกุลของ เอนไซม์ จากนั้นโมเลกุลของออกซิเจนจะรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายไปเป็นน้ำ (Saito et al., 2003)



รูปที่ 2.1 แสดง (ก) โครงสร้างของแลคเคส และ (ข) การเกิดปฏิกิริยาระหว่างสับสเตอร์กับเอนไซม์และเกิดน้ำ 2 โมเลกุลจากการรีดักชัน โมเลกุลของออกซิเจน (Riva, 2006)

### 2.3 การประยุกต์ใช้แลคเคส

จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้ปัจจุบันแลคเคสได้รับความสนใจและถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างมาก ในด้านสิ่งแวดล้อมและทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น นำมาใช้ในการย่อยสลายหรือช่วยเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบพวก xenobiotics สารประกอบอะโรมาติก (Michniewicz et al., 2008) การนำแลคเคสมาช่วยลดความเป็นพิษและย่อยสลายพวกสีย้อมที่เกิดในอุตสาหกรรมฟอกย้อม (Wesenberg et al., 2003) การย่อยสลายลิกนินในไม้เนื้อแข็งสำหรับอุตสาหกรรมเยื่อไม้และกระดาษ เนื่องจากโครงสร้างของลิกนินส่วนใหญ่ประกอบด้วยโพลีเมอร์ของวงแหวนอะโรมาติกคล้ายกับสีย้อมสังเคราะห์ (Archibald et al., 1997) การลด

ปริมาณฟีนอลิกที่อยู่ในน้ำผลไม้ เบียร์และไวน์ อุตสาหกรรมผลิตเครื่องสำอางค์ (Rodríguez Couto and Toca Herrera, 2006)

## 2.4 ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (Aqueous Two Phase Systems; ATPS)

ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค เกิดจากการผสมสารละลายโพลิเมอร์สองชนิด หรือระหว่างโพลิเมอร์กับสารละลายเกลือ เมื่อระบบเข้าสู่สมดุลและความเข้มข้นอยู่เหนือจุดวิกฤตสารละลายทั้งสองจะเกิดการแยกชั้น โดยที่ในวัฏภาคหนึ่งจะมีโพลิเมอร์ชนิดหนึ่งอยู่มาก ส่วนอีกวัฏภาคจะมีโพลิเมอร์อีกชนิดหรือเกลืออยู่มาก และทั้งสองวัฏภาคนี้นี้จะมีน้ำเป็นตัวทำละลาย ตัวอย่างสารที่ใช้ในการสร้างระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (Aqueous Two-Phase System, ATPS) (Zaslavsky, 1995)

1. Nonionic polymer (P) - Nonionic polymer (Q) - Water	
Polypropylenc 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

Methylcellulose	Dextran Hydroxypropyl-dextran
Ethylhydroxyethylcellulose	Dextran
Hydroxypropyl-dextran	Dextran
Ficoll	Dextran
2. Polyelectrolyte (P) - Nonionic polymer (Q) - Water	
Sodium dextran sulphate	Polypropylene glycol Methoxypolyethylene glycol NaCl Polypropylene glycol NaCl Polyvinyl alcohol NaCl Polyvinylpyrrolidone NaCl Methylcellulose NaCl Ethylhydroxyethylcellulose NaCl Hydroxypropyl-dextran NaCl Dextran NaCl
DEAE dextran-hydrochloric acid	Polypropylene glycol NaCl Polyethylene glycol $\text{Li}_2\text{SO}_4$ Polyvinyl alcohol Methylcellulose
Casein	Dextran Pectin Ficoll Amylopectin
Sodium carboxymethyl-dextran	Methoxypolyethylene glycol NaCl Polypropylene glycol NaCl Polyvinyl alcohol NaCl Polyvinylpyrrolidone NaCl Methylcellulose NaCl

	Ethylhydroxyethylcellulose NaCl Hydroxypropyl dextran NaCl
Sodium carboxymethylcellulose	Polypropylene glycol NaCl Methoxypolyethylene glycol NaCl Polypropylene glycol NaCl Polyvinyl alcohol NaCl Polyvinylpyrrolidone NaCl Methylcellulose NaCl Ethylhydroxyethylcellulose NaCl Hydroxypropyl dextran NaCl
3. Polyelectrolyte (P) -- Polyelectrolyte (Q) - Water	
Sodium dextran sulphate  Sodium carboxymethyl dextran Casein  Ovalbumin (pH 6.6)	DEAE dextran-hydrochloric acid NaCl Sodium carboxymethyl dextran Sodium carboxymethyl dextran Sodium carboxymethyl dextran 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,

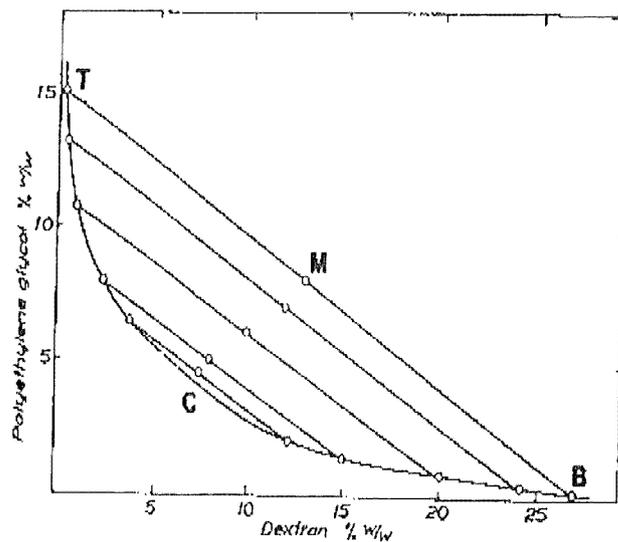
	Maltotriose, iso-maltotriose, $\beta$ -cyclodextrin
Polyvinylpyrrolidone	Butylcellosolve Potassium phosphate
Polyvinyl alcohol	Butylcellosolve Butylcellosolve Propyl alcohol, Iso-propyl alcohol
Sodium dextran sulphate	Sodium chloride (0°C)

ตัวอย่างของโพลิเมอร์ เช่น polyethylene glycol (PEG), dextran, polypropylene glycol, polyvinylpyrrolidone และ hydroxypropyl dextran ดังแสดงในตารางที่ 2.1 โพลิเมอร์ที่นิยมใช้คือ PEG ร่วมกับเด็กซ์แทรน เนื่องจากไม่เป็นพิษ และส่งผลกระทบต่อเสถียรภาพของตัวเร่งทางชีวภาพน้อย (Sinha *et al.*, 2000) แต่ด้วยข้อจำกัดด้านราคาที่สูงเมื่อนำมาใช้จริงในระดับอุตสาหกรรม จึงอาจใช้ครูดเด็กซ์แทรน (crude dextran) ซึ่งมีราคาถูกกว่าและให้ผลใกล้เคียงกับการใช้เด็กซ์แทรนบริสุทธิ์ อย่างไรก็ตามการจัดการและกำจัดเด็กซ์แทรนที่ปนเปื้อนออกจากผลิตภัณฑ์หลังการแยกค่อนข้างยุ่งยากเนื่องจากสารดังกล่าวมีความหนืดสูง จึงได้มีการเปลี่ยนมาใช้โพลิเมอร์ร่วมกับสารละลายเกลือแทน โดยเมื่อเทียบสารละลายเกลือกับเด็กซ์แทรน พบว่ามีราคาถูกกว่า ความหนืดต่ำกว่าดังนั้นจึงง่ายต่อการจัดการและระยะเวลาที่ใช้ในการแยกเฟสสั้นกว่า (van Berlo *et al.*, 1998) ตัวอย่างเกลือ เช่น potassium dihydrogen phosphate, potassium chloride, sodium dihydrogen phosphate, sodium carbonate, sodium citrate, magnesium sulphate และ ammonium sulphate (Banik *et al.*, 2003) โดยทั่วไปสารละลายที่นิยมใช้ในการฟอร์มระบบ ATPS คือ PEG และสารละลายเกลือในรูปฟอสเฟต เนื่องจากราคาถูก ช่วงพีเอชอยู่ในช่วง 6-9 ซึ่งเป็นช่วงที่ทำให้ ระบบ ATPS มีความเสถียร (Rito-Palomares, 2004) ในระบบของ PEG กับเกลือจะพบ PEG มากในวัฏภาคบน และเกลือจะมีมากในวัฏภาคล่าง อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของเกลือก็ยิ่งสูงในทั้งสองวัฏภาค โดยเกลือที่เหมาะสมต่อการเกิดการแยกวัฏภาคกับ PEG ได้แก่ เกลือฟอสเฟตและเกลือซัลเฟต

#### 2.4.1 แผนภาพวัฏภาค (Phase diagram)

การเขียนแผนภาพวัฏภาคจะให้แนวตั้ง (y) แสดงเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโพลิเมอร์ที่มีมากในวัฏภาคบน ส่วนแนวนอน (x) แสดงเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโพลิเมอร์อีกชนิดหรือเกลือที่มีมากในวัฏภาคล่าง โดยองค์ประกอบของสารในแต่ละวัฏภาคและช่วงของความเข้มข้นของสารทั้งสองชนิดที่ทำให้เกิดการแยกวัฏภาคสามารถอธิบายดังรูปที่ 2.2 เมื่อโพลิเมอร์สองชนิดถูกผสมเข้าด้วยกันที่ความเข้มข้นต่างๆกัน จะได้กราฟเส้นโค้ง

ดังรูป! เส้นโค้งนี้เรียกว่า เส้นแบ่งวัฏภาค (binodal curve) ซึ่งจะแบ่งวัฏภาคที่เกิดขึ้นในระบบ เมื่อสารละลายผสมนี้มีองค์ประกอบอยู่เหนือเส้นโค้ง ระบบจะมีลักษณะเป็นของเหลว 2 วัฏภาค และองค์ประกอบของสารละลายที่ได้เส้นโค้ง จะทำให้ของเหลวอยู่ในวัฏภาคเดียว จากแผนภาพวัฏภาคของ PEG และเด็กซ์แทรน วัฏภาคบนจะมีความเข้มข้นของ PEG อยู่มาก ส่วนเด็กซ์แทรนจะสะสมอยู่ในวัฏภาคล่าง พบว่าที่ตำแหน่ง M จะมีส่วนประกอบของวัฏภาคบนเหมือนองค์ประกอบในจุด T และในวัฏภาคล่างจะมีส่วนประกอบเหมือนองค์ประกอบในจุด B ที่จุด T และจุด B เรียกว่า nodes เส้นเชื่อมระหว่างจุดทั้งสองนี้เรียกว่าเส้นผูก (tie line) พบว่าสารละลายผสมที่แสดงบนเส้นผูกเดียวกันจะมีส่วนประกอบในแต่ละวัฏภาคเหมือนกัน แต่สัดส่วนของปริมาณในวัฏภาคบนต่อปริมาณในวัฏภาคล่างจะต่างกัน และสัดส่วนของปริมาณจะมีความสัมพันธ์กับสัดส่วนของเส้นตรง MB/MT และจากรูปจุด C จะเรียกว่าจุดวิกฤต (critical point) เป็นจุดที่มีองค์ประกอบและปริมาณของทั้งสองวัฏภาคไม่ต่างกัน ดังนั้นองค์ประกอบของระบบที่มีค่าใกล้จุด C จะมีความแตกต่างระหว่างสองวัฏภาคน้อยมาก



รูปที่ 2.2 แผนภาพวัฏภาคของระบบที่มีองค์ประกอบของ PEG และเด็กซ์แทรน

#### 2.4.2 ลักษณะทางเคมีฟิสิกส์ที่ใช้บอกลักษณะที่แตกต่างกันของวัฏภาค

ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคประกอบด้วยสารละลายของโพลิเมอร์สองชนิด หรือ โพลิเมอร์ชนิดหนึ่งกับเกลือ โดยโมเลกุลของสารทั้งสองชนิดจะถูกล้อมรอบด้วยโมเลกุลของน้ำซึ่งเป็นตัวทำละลาย และมีโครงสร้างแตกต่างกันตามพันธะที่เกิดขึ้นกับสารชนิดนั้น ๆ ส่วนที่สามารถผสมกันได้จะเกิดการรวมตัวกันในขณะที่ส่วนที่ผสมกันไม่ได้และไม่รวมตัวกันนี้ทำให้เกิดความขุ่นและการแยกวัฏภาคขึ้น ระบบจึงมีลักษณะเป็นสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ไม่ผสมกันซึ่งมีลักษณะคล้ายกับการใช้ตัวทำละลายสองชนิดไม่ผสมกัน และ



ระบบจะพยายามเข้าสู่สมดุล คือ ไม่สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ตามธรรมชาติ ไม่มีแรงขับ (driving force) ระหว่างวัฏภาคที่จะไปเปลี่ยนแปลงสมบัติในแต่ละวัฏภาคได้ กล่าวคือ อุณหภูมิ, ความดันและศักย์เคมี (Chemical potential) ขององค์ประกอบในแต่ละวัฏภาคมีค่าเท่ากัน

ลักษณะทางเคมีฟิสิกส์ที่ใช้บอกลักษณะที่แตกต่างกันของวัฏภาคทั้งสองได้แก่

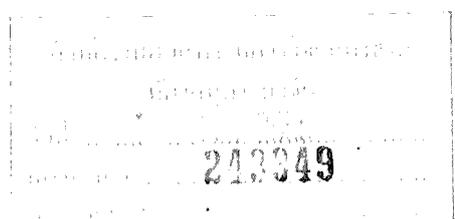
1 ความมีขั้วของตัวทำละลาย (solvent polarity) ขึ้นกับความเข้มข้นของโพลิเมอร์และเกลือ ที่มีในวัฏภาค ซึ่งความมีขั้วของวัฏภาคทั้งสองจะแตกต่างกันน้อยลงเมื่อความเข้มข้นของโพลิเมอร์ลดลง ดังนั้นระบบที่ใช้โพลิเมอร์และเกลือต่างชนิดกันจึงมีความมีขั้วต่างกัน ลักษณะของตัวทำละลายในทั้งสองวัฏภาคจึงต่างกันด้วย

2 ความสามารถในการเคลื่อนที่ของน้ำ (water mobility) ซึ่งความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของน้ำ ระหว่างวัฏภาคทั้งสองของวัฏภาคที่มีความเข้มข้นของ PEG มีค่าเท่ากับ  $0.7 \times 10^{-12}$  วินาที ซึ่งแตกต่างจากความสามารถในการเคลื่อนที่ของน้ำบริสุทธิ์ที่มีค่าเท่ากับ  $8.25 \times 10^{-12}$  วินาที แสดงว่าสมบัติของน้ำที่มีโพลิเมอร์ผสมอยู่ในวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคจะแตกต่างจากสมบัติเดิมของน้ำบริสุทธิ์

3 ลักษณะไฮโดรโฟบิกของวัฏภาคมีผลต่อโครงสร้างของน้ำในวัฏภาคทั้งสองของระบบ ความแตกต่างของไฮโดรโฟบิกของวัฏภาคขึ้นกับชนิดของโพลิเมอร์ที่ใช้ในระบบและขึ้นกับความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นของโพลิเมอร์ในวัฏภาคทั้งสองด้วย สำหรับระบบที่ใช้โพลิเมอร์และเกลือจะมีค่าไฮโดรโฟบิกของวัฏภาคบนมากกว่าในวัฏภาคล่าง

ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคประกอบด้วยน้ำเป็นส่วนใหญ่ โดยโพลิเมอร์ชนิดแรกจะมาอยู่ในวัฏภาคหนึ่ง และโพลิเมอร์ที่สองหรือเกลือจะมีมากในอีกวัฏภาคหนึ่ง เนื่องด้วยตัวทำละลายในทั้งสองวัฏภาคคือ น้ำ องค์ประกอบของวัฏภาคที่เกิดขึ้นจึงเป็นสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับโมเลกุลทางชีวภาพ การสกัดโปรตีนด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคจะเกิดขึ้นเมื่อเติมสารละลายผสมของโปรตีนลงในระบบและโปรตีนแต่ละชนิดกระจายในวัฏภาคทั้งสองที่อยู่อย่างสมดุลได้ต่างกันตามลักษณะเฉพาะของตัวมันเอง โดยการสกัดโปรตีนจะขึ้นกับลักษณะเฉพาะของโปรตีนแต่ละชนิดและภาวะที่ใช้ในการสกัด เช่น องค์ประกอบของระบบ, ความถี่ในการคั่วของระบบ ฯลฯ ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมนี้ โปรตีนที่ต้องการจะสะสมอยู่ในวัฏภาคบนในปริมาณมาก ขณะที่โปรตีนอื่น ๆ ที่เป็นสารปนเปื้อนจะถูกแยกไปในวัฏภาคล่าง จึงเป็นเหตุให้เกิดการสกัดโปรตีนที่ต้องการได้

องค์ประกอบของระบบในแต่ละภาวะที่แสดงลักษณะวัฏภาคของระบบจะแสดงในรูปของแผนภาพวัฏภาค โดยจุดที่เป็นเส้นแบ่งวัฏภาค (binodial curve) จะเป็นจุดที่แสดงการเปลี่ยนแปลงวัฏภาคของระบบจากวัฏภาคเดียวเป็นสองวัฏภาค เส้นผูกที่เชื่อมองค์ประกอบของ วัฏภาคบนและ วัฏภาคล่างในเส้นแบ่งวัฏภาคเป็นจุดที่อยู่ในภาวะสมดุล สารละลายผสมที่แสดงบนเส้นผูกเดียวกันจะมีองค์ประกอบของวัฏภาคบนและวัฏภาคล่างเหมือนกัน แต่มีปริมาตรในแต่ละวัฏภาคแตกต่างกัน ซึ่งระบบที่อยู่บนเส้นผูกเดียวกันจะให้ค่าสัมประสิทธิ์การ



แยกเหมือนกัน แต่เปอร์เซ็นต์ผลที่ได้รับจะต่างกันขึ้นอยู่กับสัดส่วนปริมาตรของระบบนั้น การกำหนดจุดที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์จำเป็นต้องเลือกจุดที่มีความเหมาะสมและสัมพันธ์กับเส้นแบ่งภูมิภาค การเลือกจุดที่ไกลจากเส้นแบ่งภูมิภาคมาก ๆ นั้นคือระบบจะมีความเข้มข้นของโพลิเมอร์และเกลือสูง ซึ่งอาจทำให้โปรตีนตกตะกอนได้ ในขณะที่จุดที่มีค่าใกล้กับเส้นแบ่งภูมิภาคมากเกินไป เมื่อมีการเจือจางระบบเพียงเล็กน้อย อาจทำให้องค์ประกอบของระบบเปลี่ยนแปลงไปจนทำให้สารละลายมีลักษณะเป็นภูมิภาคเดียวกัน ซึ่งไม่สามารถทำการสกัดได้ ดังนั้นในการขยายระดับการผลิตและการใช้ประโยชน์ของระบบสารละลายน้ำสองภูมิภาคในอุตสาหกรรม จะต้องเลือกระบบที่มีเสถียรภาพสูงพอที่จะเปลี่ยนแปลงค่าในการผลิตได้โดยไม่ทำลายระบบให้เกิดเป็นระบบที่มีภูมิภาคเดียว

#### 2.4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกภูมิภาค

พฤติกรรมการแยกชั้นของเอนไซม์ในภูมิภาคใดนั้นเป็นปรากฏการณ์ที่ไม่แน่นอน ขึ้นกับคุณลักษณะของภูมิภาคในระบบ ATPS นั้น โดยทั่วไปปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น ชนิดและน้ำหนักโมเลกุลของโพลิเมอร์และเกลือ น้ำหนักโมเลกุลของโพลิเมอร์ที่ใช้ ความหนืด อุณหภูมิ แรงตึงผิวและประจุของอนุภาค ชนิดและน้ำหนักโมเลกุลของโพลิเมอร์มีผลต่อลักษณะโครงสร้างของน้ำและแรงที่กระทำระหว่างโมเลกุลของสารที่อยู่ในระบบ ส่งผลให้ความสามารถในการสกัดผลิตภัณฑ์ที่ต้องการแตกต่างกันไป พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโพลิเมอร์ทำให้ความหนาแน่น ดัชนีการหักเห และความหนืดเพิ่มขึ้น ดังนั้นเมื่อความเข้มข้นสูงทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างภูมิภาคสูงเกิดการแยกอย่างชัดเจน และเมื่อใช้โพลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ความเข้มข้นที่ใช้ในการทำให้เกิดการแยกของภูมิภาคจะต่ำ น้ำหนักโมเลกุลสูงยังส่งผลให้ความหนืดของภูมิภาคสูงขึ้น ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อกระบวนการแยกต่อไป