บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 บทนำ

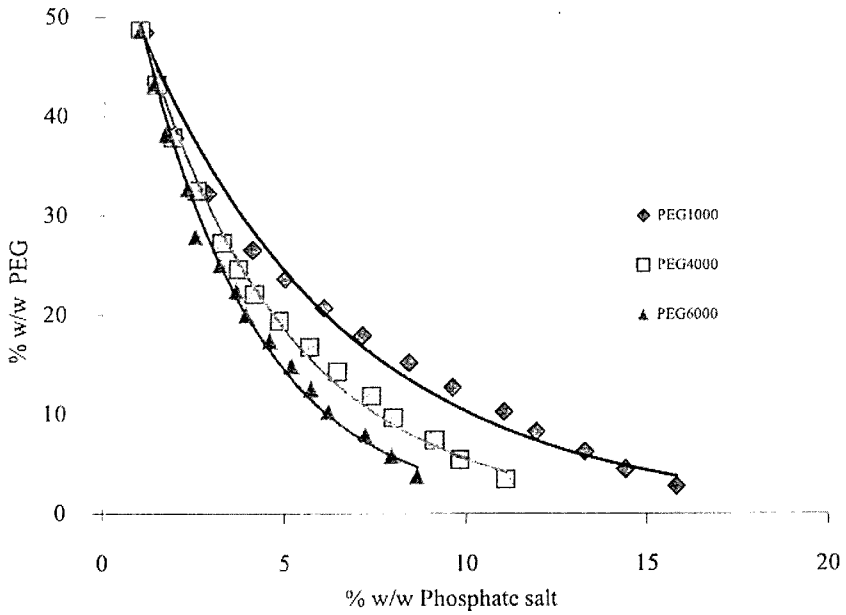
งานวิจัยนี้ศึกษาการสกัดเอนไซม์แลคเคสจากเชื้อเห็ด *Lentinus polychrous* Lev. ด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ประกอบด้วยโพลิเมอร์พวกโพลีเอทิลีนไกลคอล เกลือฟอสเฟต และน้ำ สภาวะในการศึกษาถูกควบคุมที่อุณหภูมิห้อง (27±2 องศาเซลเซียส) ความดันบรรยากาศ และค่าความเป็นกรดด่างของระบบเท่ากับ 7 เมื่อเกิดการแบ่งวัฏภาคจะพบโพลิเมอร์กระจายตัวอยู่มากในวัฏภาคหนึ่ง ในขณะที่เกลือฟอสเฟตจะมีมากในอีกวัฏภาค คุณลักษณะของทั้งสองวัฏภาคจึงแตกต่างกัน นอกจากนี้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคประกอบด้วยน้ำเป็นส่วนใหญ่ สภาวะการแยกจึงไม่รุนแรง เหมาะกับการนำมาใช้สกัดโมเลกุลทางชีวภาพ เมื่อเติมเอนไซม์หยาบซึ่งมีค่ากิจกรรมการทำงานอยู่ในช่วง 0.453-0.509 หน่วยต่อมิลลิลิตร และปริมาณโปรตีนในช่วง 0.548-0.665 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในระบบสารละลายสองวัฏภาค ระบบเข้าสู่สมดุลเอนไซม์จะแยกอยู่ในวัฏภาคทั้งสองตามลักษณะเฉพาะของเอนไซม์และสภาวะของระบบ ส่วนโปรตีนชนิดอื่นที่ปนเปื้อนจะถูกแยกอยู่อีกวัฏภาค ทำให้เอนไซม์ที่ต้องการมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดเอนไซม์ถูกนำมาพิจารณาในการศึกษาครั้งนี้คือน้ำหนักโมเลกุลของโพลิเอทิลีนไกลคอล ความเข้มข้นของโพลีเอทิลีนไกลคอลและเกลือฟอสเฟต ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบ และปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่เติมลงในระบบ

4.2 แผนภาพวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

เส้นแบ่งวัฏภาคเป็นเส้นที่แสดงการเปลี่ยนแปลงวัฏภาคของระบบจากวัฏภาคเดียวเป็นสองวัฏภาค ตำแหน่งของเส้นแบ่งวัฏภาคจะมีความสำคัญในการที่จะเลือกความเข้มข้นของโพลิเมอร์และเกลือในการสร้างระบบสองวัฏภาค พบว่าถ้าเลือกใช้จุดที่ไกลจากเส้นแบ่งวัฏภาคมากๆความเข้มข้นของโพลิเมอร์และเกลือที่ใช้จะสูง อาจทำให้โปรตีนตกตะกอนได้ แต่ถ้าเลือกจุดที่ใกล้กับเส้นแบ่งวัฏภาคมากเกินไป อาจทำให้ระบบเปลี่ยนแปลงจนสารละลายมีลักษณะเป็นวัฏภาคเดียวถ้าระบบเกิดการเจือจางเพียงเล็กน้อย การแยกวัฏภาคหรือจุดที่ทำให้เกิดเส้นแบ่งวัฏภาคของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคสามารถสังเกตได้จากจุดที่สารละลายเริ่มขุ่น (cloud point)

การศึกษาสภาวะดังกล่าวเริ่มจากการเตรียมสารละลายเข้มข้น 50 % น้ำหนัก/น้ำหนัก ของโพลีเอทิลีนไกลคอล (PEG) และ 35% น้ำหนัก/น้ำหนัก ของเกลือฟอสเฟต ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 อุณหภูมิถูกควบคุมที่ 27±2 องศาเซลเซียส เมื่อค่อยๆเติมสารละลายเกลือฟอสเฟตเข้มข้นลงในสารละลาย PEG ที่ความ

เข้มข้นต่างๆ พร้อมเขย่า ปริมาตรสารที่ทำให้เกิดการแยกวัฏภาคถูกนำมาคำนวณในรูปของความเข้มข้นและแสดงผลดังรูปที่ 4.1 ความเข้มข้นของสารทั้งสองที่อยู่เหนือเส้นโค้งแบ่งวัฏภาค เมื่อเข้าสู่สมดุลระบบจะเกิดการแยกเป็นสองวัฏภาค และที่ความเข้มข้นของสารใต้เส้นโค้งแบ่งวัฏภาคสารละลายจะรวมเป็นวัฏภาคเดียวกัน จากความสัมพันธ์ของกราฟพบว่าเมื่อความเข้มข้นของ PEG มากขึ้น ความเข้มข้นของเกลือฟอสเฟตที่ทำให้เกิดการแบ่งวัฏภาคจะลดลง ความเข้มข้นของ PEG ถูกพบมากในวัฏภาคบน ส่วนเกลือฟอสเฟตจะพบในวัฏภาคล่าง ลักษณะปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นดังกล่าวมีความคล้ายกันในสารละลาย PEG น้ำหนักโมเลกุล 1000, 4000 และ 6000 และจะเห็นว่าที่ความเข้มข้นเกลือฟอสเฟตเดียวกัน ความเข้มข้นของ PEG ที่ใช้ในการเกิดสองวัฏภาคลดลงเมื่อน้ำหนักโมเลกุลเพิ่มขึ้น

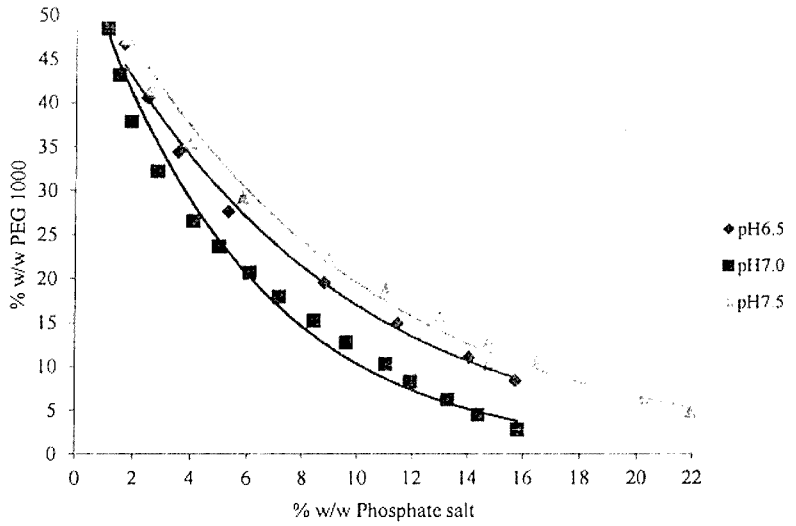


รูปที่ 4.1 เส้นแบ่งวัฏภาคของระบบสารละลาย PEG ที่น้ำหนักโมเลกุล 1000 (♦) 4000 (■) และ 6000 (▲) กับสารละลายเกลือฟอสเฟตที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 อุณหภูมิควบคุมที่ 27±2 ^{0}C

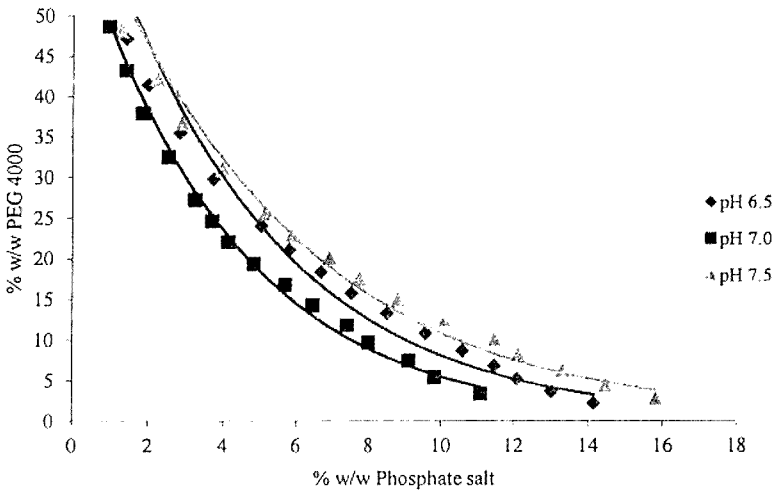
การแยกวัฏภาคในระบบเกิดขึ้นจากลักษณะโครงสร้างของน้ำภายในระบบและตัวถูกละลาย (โพลิเมอร์และเกลือ) โดยลักษณะโมเลกุลของตัวถูกละลายและแรงที่กระทำระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายกับน้ำเป็นตัวแปรสำคัญที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของน้ำ เมื่อระบบมีตัวแปรเหล่านี้ต่างกันก็จะทำให้เกิดการแยกวัฏภาคต่างกันด้วย เช่น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโพลิเมอร์หรือเกลือ น้ำที่เป็นองค์ประกอบของระบบจะถูกรบกวน และทำให้แรงตึงผิว (interfacial tensions) มากขึ้น ทำให้สามารถเกิดการแยกได้ดีขึ้น (Chouyyok et al., 2005) ดังนั้นเส้นแบ่งวัฏภาคจึงเป็นสิ่งที่ใช้อธิบายถึงปัจจัยดังกล่าวและโครงสร้างของระบบที่เกิดขึ้น นอกจาก

ความเข้มข้นแล้ว น้ำหนักโมเลกุลของ PEG ก็ส่งผลเช่นกัน (รูปที่ 4.1) จุดแบ่งวัฏภาคเปลี่ยนเมื่อน้ำหนักโมเลกุลเปลี่ยน ปัจจัยแวดล้อมอื่นๆเช่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และโซเดียมคลอไรด์ ก็มีอิทธิพลต่อการแยกวัฏภาคของระบบเช่นกัน ดังจะเห็นจากการทดลองในรูป 4.2 (ก)-(ค) เมื่อเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ของระบบ โดยใช้ PEG ที่น้ำหนักโมเลกุลเดียวกัน ระบบจะเกิดการแบ่งวัฏภาคต่างกันเนื่องจากคุณสมบัติทางเคมีของระบบเปลี่ยนไป

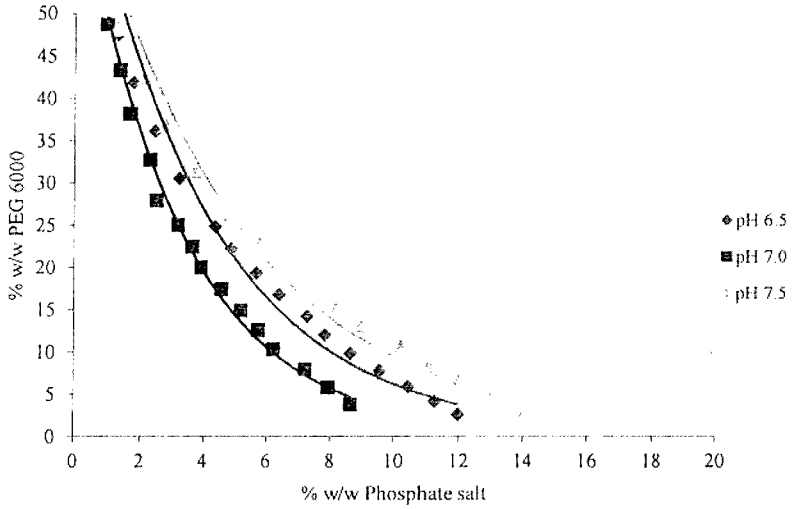
(ก)



(ข)



(ค)



รูปที่ 4.2 เส้นแบ่งวัฏภาคของระบบสารละลาย PEG ที่น้ำหนักโมเลกุล (ก) 1000 (ข) 4000 และ (ค) 6000 กับสารละลายเกลือฟอสเฟตที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 (♦) 7.0 (■) และ 7.5 (▲) อุณหภูมิควบคุมที่ 27±2 ^{0}C

4.3 อิทธิพลของน้ำหนักโมเลกุลโพลีเอทิลีนไกลคอลต่อการสกัดแลคเตส

โพลีเอทิลีนไกลคอลน้ำหนักโมเลกุล 1000 4000 และ 6000 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ถูกนำมาเตรียมระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ร่วมกับเกลือฟอสเฟตที่ความเข้มข้นคงที่ 14 %w/w ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 และใช้เอนไซม์หยาบ 1 มิลลิลิตร ปริมาตรรวมของระบบเป็น 10 มิลลิลิตร เมื่อระบบเข้าสู่สมดุล ผลการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแลคเตส โปรตีน สัดส่วนของปริมาตร ค่าความบริสุทธิ์ และค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ของเอนไซม์แสดงในตารางที่ 4.1

ในการศึกษาผลของน้ำหนักโมเลกุลของ PEG ที่มีต่อการสกัดเอนไซม์แลคเตส โดยเลือกเปรียบเทียบผลที่ความเข้มข้นของ PEG และเกลือฟอสเฟตเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าการกระจายตัวของโปรตีนและเอนไซม์ในวัฏภาคทั้งสองของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของ PEG น้ำหนักโมเลกุลของโพลิเมอร์นี้จะส่งผลต่อการจับกันระหว่างโพลิเมอร์และโปรตีน พบว่าสายของ PEG มีความเป็นไฮโดรโฟบิกสามารถจับกับบริเวณไฮโดรโฟบิกของโปรตีน ดังนั้นระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ใช้ PEG และเกลือฟอสเฟตจะมีความเป็นไฮโดรโฟบิกของวัฏภาคบน (มีPEG อยู่มาก) มากกว่าในวัฏภาคล่าง (มีเกลืออยู่มาก) ทำให้โปรตีนที่พื้นผิวมีความเป็นไฮโดรโฟบิกสูงแยกไปวัฏภาคบนมากขึ้น Andrews et al. (Andrews et al., 2005) แสดงให้เห็นถึงข้อเท็จจริงดังกล่าวโดยศึกษาลักษณะการแยกชั้นของโปรตีนทั้งในกลุ่มไฮโดรฟิลิกและ

ไฮโดรโฟบิก พบว่าลักษณะพื้นผิวของโปรตีนเป็นส่วนสำคัญในการเคลื่อนไปยังวัฏภาคนั้นๆ โปรตีนในกลุ่มไฮโดรฟิลิกมีแนวโน้มเคลื่อนไปอยู่ในวัฏภาคที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง ในขณะที่ไฮโดรโฟบิกโปรตีนจะอยู่ในวัฏภาคที่มี PEG สูง ดังนั้นการเลือกน้ำหนักโมเลกุลโพลิเมอร์ที่เหมาะสมเป็นสิ่งจำเป็นและเป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญในการทดลองของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ลักษณะไฮโดรโฟบิกจะขึ้นกับชนิดและน้ำหนักโมเลกุลของโพลิเมอร์

ตารางที่ 4.1 อิทธิพลของน้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นของ PEG 1000 4000 และ6000 ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคต่อการสกัดเอนไซม์แลคเคส เมื่อใช้เกลือฟอสเฟต 14%w/w ระบบมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 27± 2 ^{0}C

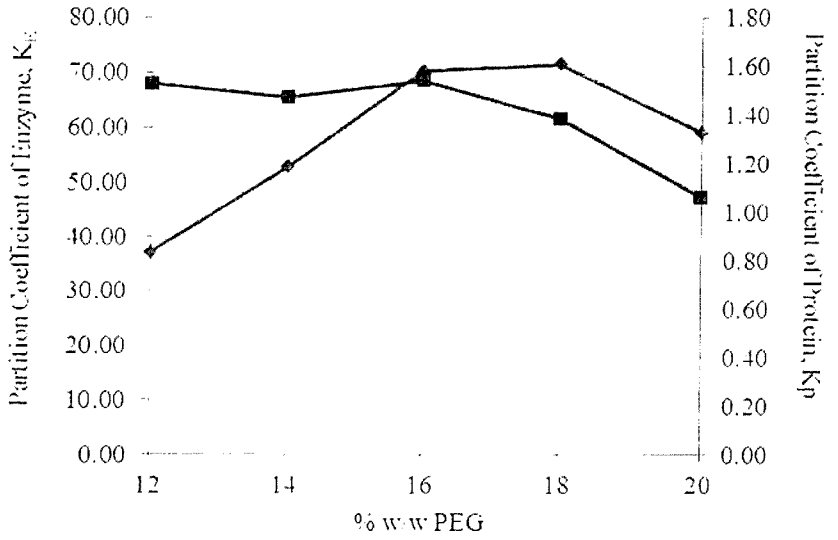
ความเข้มข้น (%w/w)		Molecular weight of PEG	K_E	K_P	Volume ratio	Purification factor	% Yield
PEG	phosphate salt						
12	14	1000	25.11	0.73	1.86	1.74	97.90
		4000	37.14	1.53	1.56	1.16	98.31
		6000	45.50	1.39	1.50	1.67	98.56
14	14	1000	27.88	0.83	1.50	1.80	97.66
		4000	52.80	1.47	1.56	1.46	98.80
		6000	43.17	1.60	1.50	1.24	98.48
16	14	1000	32.38	1.28	1.50	1.43	97.98
		4000	70.25	1.54	1.50	1.55	99.06
		6000	42.14	1.29	1.50	1.28	98.44
18	14	1000	16.83	1.91	1.00	0.69	94.39
		4000	71.50	1.39	1.50	1.61	99.08
		6000	27.00	1.09	1.50	1.43	97.59
20	14	1000	24.57	0.84	1.50	1.19	97.36
		4000	59.00	1.06	1.56	1.98	98.93
		6000	26.88	0.71	1.50	1.41	97.58

จากตารางที่ 4.1 ค่าสัดส่วนปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างหลังการแยกวัฏภาค (Vr) มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย อยู่ในช่วง 1.00-1.86 ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์แลคเคสมีค่ามากกว่า 1 มาก

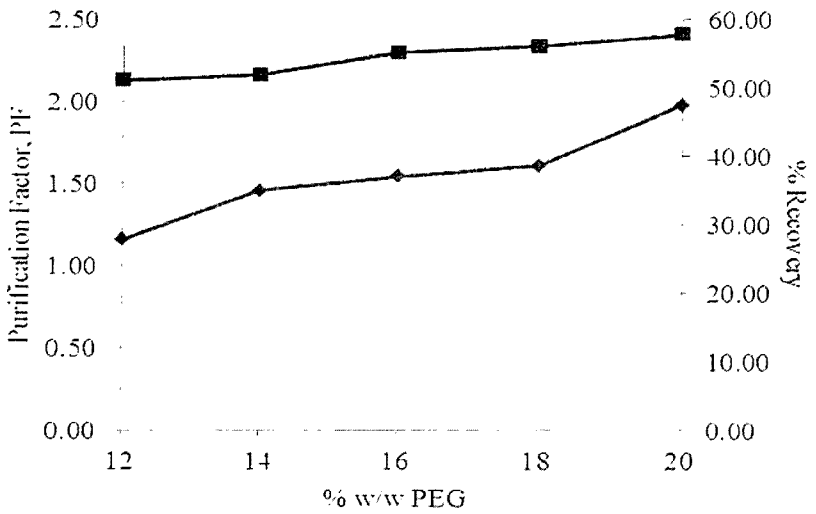
(K_E >>1) แสดงให้เห็นว่าแลคเคสเป็นไฮโดรโฟบิกโปรตีน จึงกระจายตัวอยู่มากในวัฏภาคบน ประสิทธิภาพการแยกของระบบสองวัฏภาคนอกจากจะพิจารณาจากค่า K_E แล้ว ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีนควรมีค่าน้อยกว่า 1 (K_P<1) เป็นการทำให้โปรตีนปนเปื้อนกระจายตัวในวัฏภาคล่างมากกว่าบน แต่จากการทดลองค่า K_P ส่วนมากสูงกว่า 1 ทำให้โปรตีนปนเปื้อนกระจายตัวในวัฏภาคเดียวกับเอนไซม์ ค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ในวัฏภาคบนจึงเพิ่มขึ้นไม่มาก เมื่อเปรียบเทียบค่า K_E ของ PEG ที่น้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ประกอบกับค่าความบริสุทธิ์และเปอร์เซ็นต์ผลได้ (%yield) พบว่า PEG 4000 แสดงประสิทธิภาพการแยกได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ PEG 1000 และ 6000 ผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Mohamadi et al. (Mohamadi et al., 2007)ในการสกัด phenylalanine dehydrogenase ด้วย PEG ที่น้ำหนักโมเลกุลต่างๆดังนี้ 2000 4000 6000 8000 10000 และ 20000 พบว่า PEG 6000 ให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์ เปอร์เซ็นต์ผลผลิตและผลได้ในวัฏภาคบนดีที่สุดและได้อธิบายกลไกที่เกิดขึ้นว่า การเพิ่มน้ำหนักโมเลกุลของ PEG จะทำให้การแยกของเอนไซม์ออกจากโปรตีนปนเปื้อนได้ลดลง เนื่องจากเมื่อใช้ PEG ที่น้ำหนักโมเลกุลสูงในระบบ ความต่างระหว่างวัฏภาคจะเพิ่มขึ้น รูปร่างของ PEG จับกันแน่นขึ้น ทำให้เกิดพันธะไฮโดรโฟบิก ระหว่างโมเลกุลของ PEG มากขึ้น ส่งผลให้แรงกระทำระหว่าง PEG กับโปรตีนลดลง เอนไซม์ที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิกเคลื่อนมาสู่วัฏภาคบนได้น้อยลง ทำให้ค่า K_E ลดลง ส่วนการใช้ PEG ที่น้ำหนักโมเลกุลน้อยเกินไปอาจทำให้ PEG สามารถจับกับโปรตีนปนเปื้อนและเอนไซม์ที่ต้องการเคลื่อนไปในวัฏภาคบนด้วยกัน จึงกล่าวได้ว่าการเลือก PEG ที่น้ำหนักโมเลกุลขนาดกลาง น่าจะเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการทดลองข้างต้น อย่างไรก็ตามข้อสันนิษฐานข้างต้นก็ไม่สามารถนำมาใช้อธิบายกลไกการแยกที่เกิดขึ้นได้ทุกกรณี เช่นการสกัดเอนไซม์ bromelain ด้วย PEG 2000 ให้ผลที่ดีกว่าการใช้ PEG 4000 และ 6000 (Ketnawa et al., 2010) หรือ การแยก penicillin acylase จาก *E.coli* ให้ค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้สูงที่ PEG 2000 เมื่อเปรียบเทียบกับ PEG 3350 และ 8000 (Marcos et al., 1999) ดังนั้นการเลือกน้ำหนักโมเลกุลของ PEG ที่เหมาะสมสำหรับการแยกด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคขึ้นกับชนิดของเอนไซม์

4.4 อิทธิพลของความเข้มข้นโพลีเอทิลีนไกลคอลต่อการสกัดแลคเคส

จากผลการวิเคราะห์ข้างต้น PEG 4000 ถูกเลือกนำมาศึกษาค่าความเข้มข้นที่มีต่อการแยกของเอนไซม์ โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นในช่วง 12-20 %w/w และควบคุมความเข้มข้นของเกลือฟอสเฟตที่ 14% w/w ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 การเพิ่มความเข้มข้นของ PEG ส่งผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์แลคเคส (K_E) และค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีน (K_P) (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.3 ผลของความเข้มข้น PEG 4000 ที่ 12-20% w/w ต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์แลคเคส (K_E) (♦) และ ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีน (K_p) (■) เมื่อใช้เกลือฟอสเฟตความเข้มข้น 14% w/w ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเท่ากับ 7.0

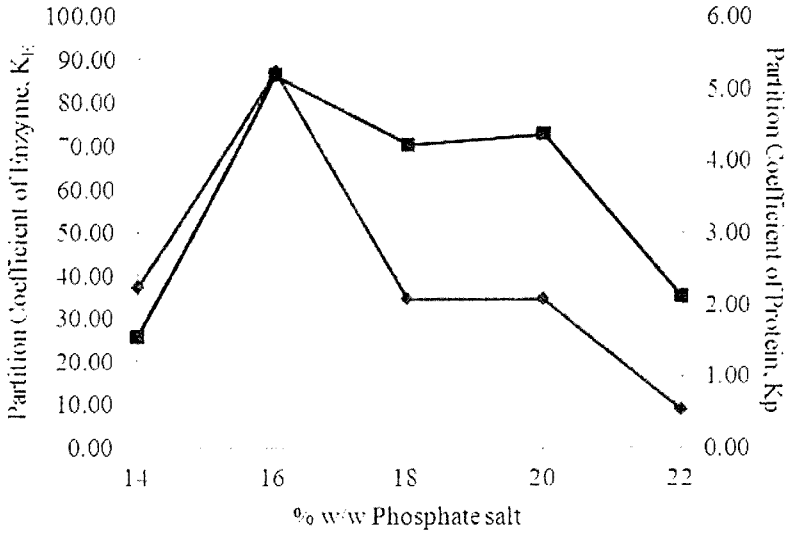


รูปที่ 4.4 ผลของความเข้มข้น PEG 4000 ที่ 12-20% w/w ต่อค่าความบริสุทธิ์ (PF) (♦) และเปอร์เซ็นต์การสกัดเอนไซม์แลคเคสในวัฏภาคบน (%R) (■) ของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค เมื่อใช้เกลือฟอสเฟตความเข้มข้น 14% w/w ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเท่ากับ 7.0

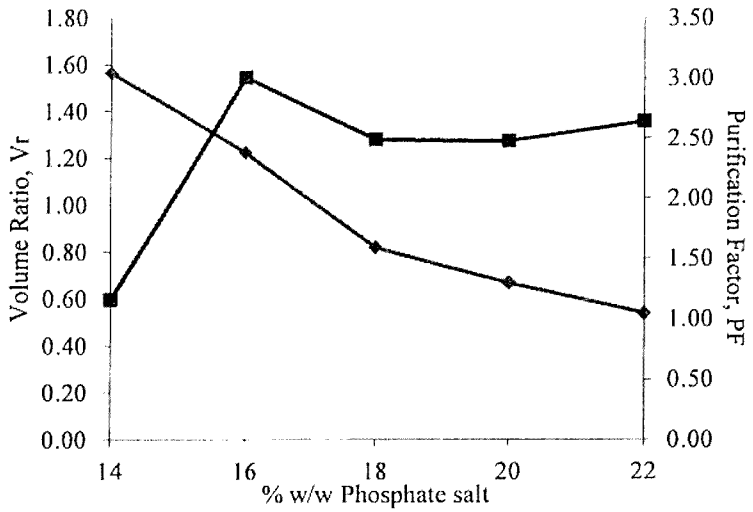
ค่า K_E เพิ่มขึ้นจาก 37.14 เป็น 71.50 เมื่อความเข้มข้นของ PEG เปลี่ยนจาก 12 %w/w เป็น 18 %w/w ตามลำดับ และลดลงเป็น 59.00 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นไปถึง 20 %w/w ในขณะที่ค่า K_p มีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของ PEG เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าโปรตีนปนเปื้อนเคลื่อนสู่วัฏภาคล่างมากขึ้น ทำให้ค่าความ บริสุทธิ์ของแลคเคสเพิ่มขึ้น 1.16-1.98 เท่า และเปอร์เซ็นต์การสกัดแลคเคสในวัฏภาคบนเพิ่มขึ้น 51.16-57.87 % (รูปที่ 4.4) การเพิ่มความเข้มข้นของ PEG ทำให้แรงกระทำระหว่าง PEG กับพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของโปรตีนเพิ่มขึ้น เอนไซม์จึงเคลื่อนไปยังวัฏภาคบนมากขึ้น อย่างไรก็ตาม การใช้ความเข้มข้นของ PEG สูงๆ ทำให้ค่าความหนืดและแรงตึงผิวระหว่างวัฏภาคสูงขึ้น การเคลื่อนของแลคเคสสู่วัฏภาคบนจึงอาจลดลง (Yücekan and Önal, 2011) ค่าความหนืดที่เพิ่มขึ้นนี้อาจส่งผลกระทบต่อกระบวนการแยกเอนไซม์ออกจากสารละลาย PEG ในภายหลังได้

4.5 อิทธิพลของความเข้มข้นเกลือฟอสเฟตต่อการสกัดแลคเคส

ความเข้มข้นของเกลือฟอสเฟตที่ 14-22 %w/w ถูกนำมาใช้ร่วมกับ PEG 4000 ที่ 12 %w/w ในการสร้างระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบถูกควบคุมที่ 7.0 เพื่อศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของเกลือฟอสเฟตที่มีต่อการแยกเอนไซม์แลคเคส ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์แลคเคส (K_E) และค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีน (K_p) เพิ่มขึ้นสูงสุดเป็น 87.33 และ 5.17 ตามลำดับ (ภาคผนวก ข ในตารางที่ ข8) เมื่อความเข้มข้นของเกลือฟอสเฟต เป็น 16 %w/w และมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นที่ 18-22 %w/w (รูปที่ 4.5) ตามหลักทฤษฎีพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือฟอสเฟตจะทำให้เกิดปรากฏการณ์ salting-out ซึ่งจะทำให้เอนไซม์และโปรตีนปนเปื้อนเคลื่อนสู่วัฏภาคบนมากขึ้น ค่า K_E และ K_p ก็จะสูงขึ้นด้วย และเนื่องจากโปรตีนปนเปื้อนเคลื่อนสู่วัฏภาคบนมากขึ้น จะทำให้ค่าความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์และค่าความบริสุทธิ์ที่เกิดในวัฏภาคบนลดลง อย่างไรก็ตาม การเพิ่มความเข้มข้นของเกลือในระบบสองวัฏภาคไม่จำเป็นที่จะทำให้ค่า K_E และ K_p สูงขึ้นทุกครั้ง เช่น การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตจาก 10%w/w เป็น 16%w/w ในการสกัด invertase พบว่าค่า K_p เพิ่มขึ้นจาก 0.48 เป็น 1.12 ตามลำดับ แต่ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในวัฏภาคบนลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตมากกว่า 13%w/w เนื่องจากเกิดการตกตะกอนของเอนไซม์ขึ้นระหว่างวัฏภาค (Yücekan and Önal, 2011) เช่นเดียวกับการสกัด bromelain ในระบบสองวัฏภาคด้วย PEG และเกลือฟอสเฟต เกิดการตกตะกอนของเอนไซม์ขึ้นระหว่างวัฏภาคเมื่อความเข้มข้นเกลือฟอสเฟตเพิ่มขึ้น (Babu et al., 2008)



รูปที่ 4.5 ผลของความเข้มข้นฟอสเฟต ที่ 14-22% w/w ต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์แลคเคส (K_E) (♦) และ ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีน (K_p) (■) เมื่อใช้ PEG 4000 ความเข้มข้น 12% w/w ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเท่ากับ 7.0



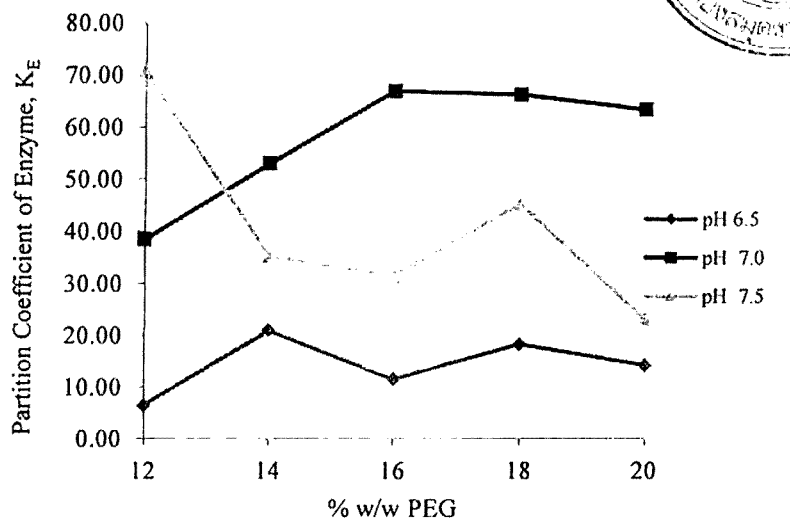
รูปที่ 4.6 ผลของความเข้มข้นฟอสเฟต ที่ 14-22% w/w ต่อสัดส่วนปริมาตร (Vr) (♦) และ ค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์แลคเคส (PF) (■) เมื่อใช้ PEG 4000 ความเข้มข้น 12% w/w ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเท่ากับ 7.0

เกลือฟอสเฟตยังส่งผลต่อโมเลกุลของน้ำที่อยู่ล้อมรอบโมเลกุลของ PEG โมเลกุลของน้ำจะล้อมรอบประจุบวกส่งผลให้โครงสร้างอัดแน่นขึ้น ปริมาตรโมเลกุลของ PEG ก็น้อยลง และการเพิ่มเกลือฟอสเฟตจะทำให้สัดส่วนวัฏภาคล่างมากขึ้น ทำให้ค่าสัดส่วนปริมาตร (Vr) ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในรูปที่ 4.6 ค่า Vr ลดลงจาก 1.56 เหลือ 0.54 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเกลือฟอสเฟตจาก 14 %w/w เป็น 22 %w/w และเมื่อนำค่า Vr ไปใช้ในการคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ (%Yield) ซึ่งเกิดจากค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์และสัดส่วนปริมาตรของระบบ จะทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้มีแนวโน้มลดลงเช่นกัน (ดังแสดงในภาคผนวก) ส่วนค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์มีค่าสูงสุดเท่ากับ 3.01 เท่า เมื่อใช้เกลือฟอสเฟตเข้มข้น 16 %w/w (รูปที่ 4.6)

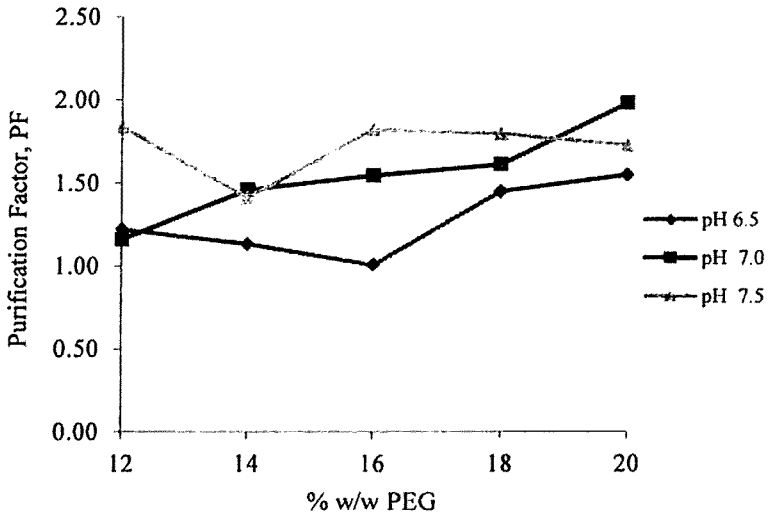
4.6 อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่อการสกัดแลคเคส

ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการแยกของโปรตีน การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างจะมีอิทธิพลต่อประจุของโปรตีน ทำให้พฤติกรรมการแยกของโปรตีนในวัฏภาคบนและล่างเปลี่ยนไป พฤติกรรมการแยกของแลคเคสเมื่อระบบสองวัฏภาคมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.5 7.0 และ7.5 ถูกศึกษาในระบบที่ประกอบด้วย PEG 4000 ความเข้มข้น 12-20 %w/w และเกลือฟอสเฟตควบคุมความเข้มข้นที่ 14% w/w

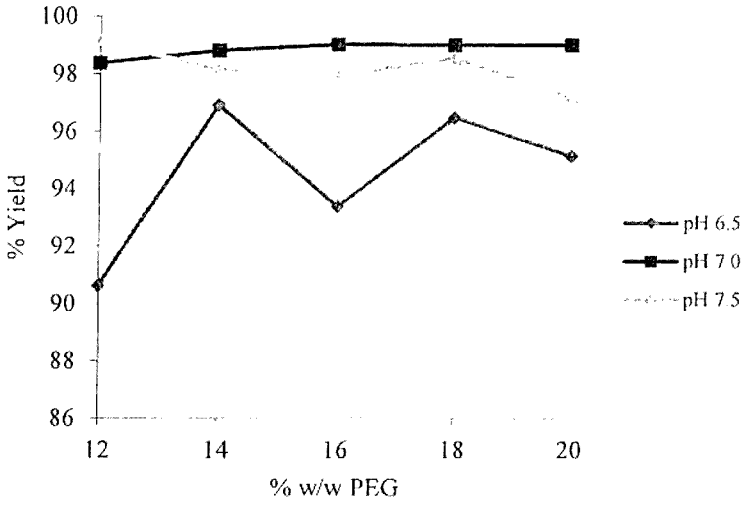
ปกติในระบบสองวัฏภาคของ PEG-เกลือฟอสเฟต เมื่อเกิดการแบ่งวัฏภาค ฟอสเฟตจะกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคทั้งสองของระบบ แต่จะสะสมมากในวัฏภาคล่าง การกระจายของฟอสเฟตที่ไม่เท่ากันนี้ทำให้ความแตกต่างของศักย์ไฟฟ้าระหว่างวัฏภาคเพิ่มขึ้น และวัฏภาคที่มีการสะสมของฟอสเฟตมากจะมีศักย์ไฟฟ้าเป็นลบ จึงทำให้โมเลกุลของโปรตีนที่มีประจุลบถูกผลักไปวัฏภาคบนเพิ่มขึ้น ดังนั้นถ้าค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเพิ่มสูงกว่าจุดไอโซอิเล็กตริกของโปรตีน จะทำให้พื้นผิวโปรตีนมีประจุลบและถูกแยกไปอยู่ในวัฏภาคบนมากขึ้น ค่าสัมประสิทธิ์การแยกจึงสูงขึ้น สำหรับเอนไซม์แลคเคสจัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม acidic มีจุดไอโซอิเล็กตริกประมาณ 4.0 (Baldrian, 2006) การเพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่าง จะทำให้โปรตีนเคลื่อนไปวัฏภาคบนมากขึ้น



รูปที่ 4.7 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ 6.5 (♦) 7.0 (■) และ 7.5 (▲) ที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์แลคเตสในวัฏภาคบนเมื่อใช้ PEG 4000 ที่ความเข้มข้น 12-20 %w/w และเกลือฟอสเฟตความเข้มข้น 14% w/w



รูปที่ 4.8 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ 6.5 (♦) 7.0 (■) และ 7.5 (▲) ที่มีต่อค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์แลคเตสในวัฏภาคบนเมื่อใช้ PEG 4000 ที่ความเข้มข้น 12-20 %w/w และเกลือฟอสเฟตความเข้มข้น 14% w/w



รูปที่ 4.9 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ 6.5 (♦) 7.0 (■) และ 7.5 (▲) ที่มีต่อค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ของแลคเคสในวัฏภาคบนเมื่อใช้ PEG 4000 ที่ความเข้มข้น 12-20 %w/w และเกลือฟอสเฟตความเข้มข้น 14% w/w

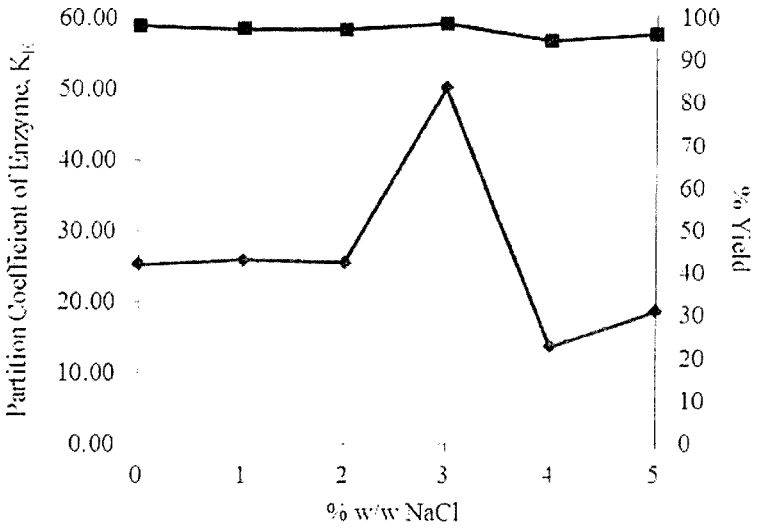
จากรูปที่ 4.7 ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์แลคเคสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ที่ความเป็นกรด-ด่างสูง พบว่าสัมประสิทธิ์การแยกแลคเคสมีค่าสูงที่ระบบมีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 เมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นของ PEG เดียวกัน และเมื่อพิจารณาค่าความบริสุทธิ์ของแลคเคส (รูปที่ 4.8) ของระบบที่ความเป็นกรด-ด่าง 6.5 7.0 และ 7.5 มีค่าในช่วง 1.00-1.55 1.16-1.98 และ1.41-1.84 ตามลำดับ ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5 ความเข้มข้นของ PEG บางจุดให้ค่าความบริสุทธิ์สูงกว่าที่ความเป็นกรด-ด่าง 7.0 อาจเนื่องจากโปรตีนปนเปื้อนที่มีประจุลบแยกไปยังวัฏภาคบนพร้อมๆกับเอนไซม์แลคเคสได้มากขึ้น จึงทำให้ค่าความบริสุทธิ์ที่ 7.0 ต่ำลง ในรูปที่ 4.9 แสดงผลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ของแลคเคสในวัฏภาคบน โดยใช้ความสัมพันธ์ของค่าสัดส่วนปริมาตรระหว่างวัฏภาคบนและวัฏภาคล่างและค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์มาคำนวณ การเปลี่ยนแปลงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างเกิดขึ้นน้อยมากเมื่อเพิ่มความเป็นกรด-ด่างของระบบ สัดส่วนปริมาตรอยู่ในช่วง 1.22-1.63 (ภาคผนวก ข ในตารางที่ ข10) ค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ที่เกิดขึ้นจะมีทิศทางสัมพันธ์กับสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์

4.7 อิทธิพลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการสกัดแลคเคส

ผลของการเติมโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0% ถึง 5% ต่อการสกัดแลคเคสในระบบสองวัฏภาคของ 12% w/w PEG และ 14% w/w เกลือฟอสเฟต ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 แสดงในรูปที่ 4.10 พบว่าการเติม

โซเดียมคลอไรด์มีผลต่อการแยกเอนไซม์ไม่ชัดเจน โดยค่าสัมประสิทธิ์การแยกเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 50.00 เมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ 3% w/w เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 4% w/w สัมประสิทธิ์การแยกลดลงเหลือ 13.58 และเพิ่มขึ้นเป็น 18.50 เมื่อความเข้มข้นเป็น 5% w/w ส่วนค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้เปลี่ยนแปลงไม่มากอยู่ในช่วง 94.32-98.39% (ภาคผนวก ข ในตารางที่ ข12)

โดยทั่วไปโซเดียมคลอไรด์ จะกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคทั้งสองเท่าๆกันและทำให้ค่าความต่างศักย์ของทั้งสองวัฏภาคลดลง เนื่องจากโซเดียมคลอไรด์มีผลทำให้การกระจายตัวของฟอสเฟตที่อยู่ในวัฏภาคทั้งสองไม่เท่ากันลดลง ซึ่งส่งผลต่อแรงที่กระทำระหว่างโมเลกุลที่มีขั้วในวัฏภาคทั้งสอง และทำให้ความแตกต่างของลักษณะไฮโดรโฟบิกระหว่างวัฏภาคทั้งสองลดลงด้วย โซเดียมคลอไรด์ยังส่งผลต่อลักษณะของตัวทำละลายในวัฏภาคและสมบัติของโปรตีน โซเดียมคลอไรด์จะมีความจำเพาะเจาะจงต่อโปรตีนและเกิดแรงกระทำขึ้นระหว่างโมเลกุลทั้งสอง ทำให้การแยกโปรตีนในระบบดีขึ้นหรืออาจจะแย่ลงเมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ อย่างไรก็ตามอิทธิพลของโซเดียมคลอไรด์ต่อระบบสองวัฏภาคยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน Naganagouda และ Mulimani (Naganagouda and Mulimani, 2008) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 2.5-10% ในระบบสองวัฏภาคของ PEG 4000 และเกลือฟอสเฟต ไม่ได้ส่งผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกเอนไซม์ α-galactosidase นอกจากนี้ในการแยกทริปซินในระบบสองวัฏภาคของ PEG 4000 และ cashew nut tree gum ที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ 0.1 และ1 M ก็ไม่สามารถแสดงทิศทางการแยกของเอนไซม์ได้ชัดเจน (Oliveira et al., 2002)



รูปที่ 4.10 ผลของความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 0-5% w/w ต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์แลคเคส (K_E) (♦) และ ค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ (% Yield) (■) เมื่อระบบประกอบด้วย PEG 1000 ความเข้มข้น 12% w/w และเกลือฟอสเฟต 14%w/w ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเท่ากับ 7.0