บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

1) การแยกวัฏภาคในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ขึ้นกับลักษณะโมเลกุลของตัวถูกละลายและแรงที่กระทำระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายกับน้ำ ระบบที่มีตัวแปรเหล่านี้ต่างกันจะทำให้เกิดการแยกวัฏภาคต่างกัน เช่น การเพิ่มความเข้มข้นของ PEG หรือเกลือ และน้ำหนักโมเลกุลของ PEG ดังจะเห็นได้จากเส้นแบ่งวัฏภาคมีการเปลี่ยนแปลงเข้าใกล้จุดกำเนิดมากขึ้นเมื่อน้ำหนักโมเลกุลของ PEG สูงขึ้น ปริมาณความเข้มข้นของ PEG และเกลือที่ใช้จะลดลง นอกจากนี้สภาวะแวดล้อมค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบก็มีอิทธิพลต่อการแยกวัฏภาคของระบบเช่นกัน

2) น้ำหนักโมเลกุลของ PEG มีผลต่อการแยกเอนไซม์แลคเคสในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค แลคเคสจะแยกอยู่ในวัฏภาคบนได้ดีกว่าในวัฏภาคล่าง เนื่องจากความเป็นไฮโดรโฟบิกของแลคเคสจึงทำให้เกิดแรงจับกับไฮโดรโฟบิกของ PEG ได้ดีกว่าในชั้นสารละลายที่เต็มไปด้วยเกลือฟอสเฟต และพบว่า PEG 4000 ให้ประสิทธิภาพการแยกแลคเคสดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ PEG น้ำหนักโมเลกุล 1000 และ 6000 โดยอธิบายได้ว่าการใช้ PEG ที่น้ำหนักโมเลกุลน้อยเกินไปอาจทำให้ PEG สามารถจับกับโปรตีนปนเปื้อนและเอนไซม์ที่ต้องการเคลื่อนไปในวัฏภาคบนด้วยกัน ความสามารถในการแยกจึงลดลง ส่วนการใช้ PEG ที่น้ำหนักโมเลกุลสูงจะทำให้ความต่างระหว่างวัฏภาคเพิ่มขึ้น รูปร่างของ PEG จับกันแน่นขึ้น พันธะไฮโดรโฟบิกระหว่างโมเลกุลของ PEG เกิดมากขึ้น ส่งผลให้แรงกระทำระหว่าง PEG กับโปรตีนลดลง เอนไซม์แลคเคสจึงเคลื่อนมาสู่วัฏภาคบนได้น้อยลง

3) การเพิ่มความเข้มข้นของ PEG ส่งผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์แลคเคส (K_E) และโปรตีน (K_p) การเพิ่มความเข้มข้นของ PEG ทำให้แรงกระทำระหว่าง PEG กับพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของเอนไซม์แลคเคสเพิ่มขึ้น เอนไซม์จึงแยกไปยังวัฏภาคบนมากขึ้น ค่า K_E เพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่า K_p มีแนวโน้มลดลง แสดงให้เห็นว่าโปรตีนปนเปื้อนเคลื่อนสู่วัฏภาคล่างเมื่อความเข้มข้นของ PEG เพิ่มขึ้น

4) ความเข้มข้นของเกลือฟอสเฟตที่ 14-22 %w/w ถูกนำมาใช้ร่วมกับ PEG 4000 ที่ 12 %w/w ในการสร้างระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบถูกควบคุมที่ 7.0 การเพิ่มเกลือฟอสเฟตทำให้สัดส่วนวัฏภาคล่างมากขึ้น ค่าสัดส่วนปริมาตร (Vr) จึงลดลง ความเข้มข้นของเกลือฟอสเฟตที่ 16 %w/w ให้ค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์แลคเคสในวัฏภาคบนสูงสุด คือ 3.01 เท่า

5) ค่าสัมประสิทธิ์การแยกแลคเคสมีค่าสูงที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 และ 7.5 ที่ความเข้มข้นของ PEG เดียวกัน แต่เมื่อพิจารณาค่าความบริสุทธิ์ของแลคเคสของระบบ

ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5 ให้ค่าความบริสุทธิ์สูงที่สุด อย่างไรก็ตามการเลือกค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ควรคำนึงถึงเสถียรภาพและค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่สภาวะความเป็นกรด-ด่างนั้นด้วย

6) การเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0% ถึง 5% w/w ต่อการสกัดแลคเคสในระบบสองวัฏภาคของ 12% w/w PEG และ 14% w/w เกลือฟอสเฟต ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 ส่งผลต่อการสกัดเอนไซม์แลคเคสไม่ชัดเจน พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การแยกเอนไซม์แลคเคสสูงสุดเมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ 3% w/w ลงในระบบ

5.2 ข้อเสนอแนะ

1) ควรเพิ่มน้ำหนักโมเลกุลของ PEG ในการพิจารณามากขึ้นเพื่อความหลากหลายของข้อมูลและสามารถนำมาใช้อธิบายผลของน้ำหนักโมเลกุลของ PEG ที่มีต่อการแยกเอนไซม์แลคเคสได้ชัดเจนมากขึ้น

2) การเพิ่มความเข้มข้นของ PEG ทำให้แนวโน้มค่าพารามิเตอร์การแยกของเอนไซม์สูงขึ้น แต่ค่าเหล่านี้ไม่ได้แสดงความแตกต่างอย่างชัดเจน ดังนั้นการเลือกใช้ PEG ที่ความเข้มข้นสูงควรพิจารณาถึงค่าใช้จ่ายในการเตรียมระบบที่เพิ่มขึ้นด้วย

3) นอกจากเกลือฟอสเฟตที่ใช้ในการสร้างระบบสองวัฏภาคร่วมกับ PEG การเปลี่ยนตัวถูกละลายในระบบชนิดอื่น เช่น ระบบ PEG-โซเดียมซัลเฟต ระบบ PEG-แมกเนเซียมซัลเฟต หรือ ระบบของ PEG-แอมโมเนียมซัลเฟต อาจช่วยส่งเสริมหรือทำให้ประสิทธิภาพการสกัดเอนไซม์แลคเคสลดลงได้ และควรศึกษาอิทธิพลของสารเหล่านี้ต่อกิจกรรมการทำงานของแลคเคสควบคู่ด้วย

4) การเลือกค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่เหมาะสมสำหรับแยกเอนไซม์แลคเคส ควรคำนึงถึงเสถียรภาพการทำงานของเอนไซม์ที่มีต่อค่าความเป็นกรด-ด่างนั้นด้วย และอาจจะศึกษาลักษณะการแยกของเอนไซม์แลคเคสเพิ่มเติมที่ค่าความเป็นกรด-ด่างครอบคลุมจุดไอโซอิเล็กตริกของแลคเคสเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการแยกที่เกิดขึ้น

5) เกลือโซเดียมคลอไรด์นอกจากจะมีอิทธิพลต่อการแยกวัฏภาค ยังช่วยเร่งการแยกวัฏภาคให้เกิดเร็วขึ้นและลดไฮโดรโฟบิกของโปรตีน ควรศึกษาลักษณะการแยกของเอนไซม์แลคเคสหลังเติมเกลือชนิดอื่นที่ไม่มีประจุเพิ่มเติม เช่นโพแทสเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ หรือแมงกานีสคลอไรด์ และควรตรวจสอบผลของเกลือเหล่านี้ที่มีต่อค่ากิจกรรมการทำงานและเสถียรภาพของเอนไซม์