# การสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสจากน้ำหมักโดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในหอสกัด

นางสาววิไลวรรณ ช่วยยก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-1115-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# EXTRACTION OF ALKALINE PROTEASE FROM FERMENTATION BROTH USING AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS IN EXTRACTING COLUMN

Miss Wilaiwan Chouyyok

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 2001
ISBN 974-03-1115-6

| | |
|---|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | การสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสจากน้ำหมักโดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในหอสกัด |
| โดย | นางสาววิไลวรรณ ช่วยยก |
| สาขาวิชา | วิศวกรรมเคมี |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สีรุ้ง ปรีชานนท์ |
| อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม | รองศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์ |

---

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.................................................. คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สมศักดิ์ ปัญญาแก้ว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.................................................. ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธวัชชัย ชรินพาณิชกุล)

.................................................. อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สีรุ้ง ปรีชานนท์)

.................................................. อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์)

.................................................. กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทธิชัย อัสสะบำรุงรัตน์)

.................................................. กรรมการ

(อาจารย์ ดร. เหมือนเดือน พิศาลพงศ์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิไลวรรณ ช่วยยก : การสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสจากน้ำหมักโดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในหอสกัด (EXTRACTION OF ALKALINE PROTEASE FROM FERMENTATION BROTH USING AQUEOUS TWO – PHASE SYSTEMS IN EXTRACTING COLUMN) อ.ที่ปรึกษา: ผศ.ดร.สีรุ้ง ปรีชานนท์, อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ. นภา ศิวรังสรรค์, 124 หน้า ISBN 974-03-1115-6.

วัตถุประสงค์หลักของโครงการวิจัยนี้เพื่อศึกษาการแยกแอลคาไลน์โพรทีเอสโดยตรงจากน้ำหมัก จากเชื้อ *Bacillus Subtilis* TISTR 25 โดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ PEG 1000 และ โพแทสเซียมฟอสเฟต โดยแบ่งงานวิจัยนี้ออกเป็นสามส่วนใหญ่ๆ คือ ส่วนที่หนึ่งเป็นการศึกษาอิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบ (7.5 8.5 9.5 และ 10.5) สัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่าง (22:1 3:1 1:1 1:3 1:25) และความเข้มข้นของปริมาณน้ำหมัก (10 20 30 40 และ 50 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักของระบบ) ที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก ค่ากิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอส และเปอร์เซนต์ผลได้ พบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอส คือ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5 สัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างเท่ากับ 1:25 และ ความเข้มข้นของน้ำหมักเท่ากับ 50 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักของระบบ ให้ประสิทธิภาพการสกัด ค่ากิจกรรมจำเพาะ และเปอร์เซนต์ผลได้ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 48.3 และ 17.7 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนและ 62.2 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

ส่วนที่สองคือการเลือกชนิดและออกแบบหอสกัด โดยใช้ ปริมาตรไหลผ่าน จำนวนขั้นตอนสมดุล คุณสมบัติทางกายภาพ สัดส่วนของอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาค ปริมาณของแข็งในระบบ ความง่ายในการทำความสะอาด และสามารถดูแลรักษาและซ่อมบำรุงได้ง่าย พบว่าหอสกัดแบบ Oldshue Rushton เป็นหอสกัดที่เหมาะสมที่สุด โดยออกแบบให้มี ความสูง 500 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 46 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัด 18 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายในของวงแหวน 23 มิลลิเมตร และระยะห่างระหว่างวงแหวน 23 มิลลิเมตร

ส่วนที่สามซึ่งเป็นส่วนสุดท้ายของงานวิจัยนี้ คือ ศึกษาอิทธิพลของความเร็วรอบในการปั่นกวนของใบพัด (0 50 100 150 และ 200 รอบต่อนาที) อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว (1.0 2.1 3.4 และ 5.3 มิลลิลิตรต่อนาที) และอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง (17.9 และ 11.8 มิลลิลิตรต่อนาที) และความเข้มข้นของน้ำหมักเริ่มต้นที่เติมในวัฏภาคต่อเนื่อง (20 40 60 และ 72 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก) ที่มีผลต่อจำนวนเท่าความบริสุทธิ์ เปอร์เซนต์ผลได้ และประสิทธิภาพการสกัด โดยทำการสกัดแบบต่อเนื่องในหอสกัด โดยให้วัฏภาคกระจายตัวซึ่งมีองค์ประกอบของ PEG 1000 เท่ากับ 42.5 % (w/w) และโพแทสเซียมฟอสฟอต เท่ากับ 2.5 % (w/w) น้ำ 55.0 %(w/w) ไหลขึ้นสวนทางกับวัฏภาคต่อเนื่องที่ไหลลง ซึ่งมีองค์ประกอบของโพแทสเซียมฟอสเฟต เท่ากับ 28.0 % (w/w) และน้ำ (หรือน้ำหมัก) 72.0% (w/w) ซึ่งพบว่าที่ภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัดแบบ Oldshue Rushton คือ ที่ความเร็วรอบในการปั่นกวนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่อง เท่ากับ 3.4 และ 11.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ และมีความเข้มข้นของน้ำหมักเริ่มต้นเท่ากับ 20 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนักของวัฏภาคต่อเนื่อง ซึ่งให้จำนวนเท่าความบริสุทธิ์ เปอร์เซนต์ผลได้ และประสิทธิภาพการสกัด เท่ากับ 6.0 73.7 เปอร์เซนต์ และ 0.79 ตามลำดับ และพบว่าแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ผ่านการสกัดแล้วซึ่งอยู่ในวัฏภาคกระจายตัว มีกิจกรรมลดลง 12.9 9.2 6.2 เปอร์เซนต์ เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 1 เดือน ที่ 32 $\pm$ 2 4 -20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และภาวะที่เหมาะสมจากการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัดแบบ Oldshue Rushton ในงานวิจัยนี้สามารถนำไปคำนวณหาค่าอุทกพลศาสตร์ของของเหลวและข้อมูลการถ่ายเทมวล เพื่อใช้ในการออกแบบและขยายขนาดหอสกัดต่อไป

ภาควิชา…………วิศวกรรมเคมี……………..ลายมือชื่อนิสิต……………………………..…………………..

สาขาวิชา…………วิศวกรรมเคมี……………..ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา…………………..…………………

ปีการศึกษา…………2544……………………ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม………………………………

# # 4170525921 : MAJOR CHEMICAL ENGINEEING DEPARTMENT

KEY WORD : AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS (ATPS) /ALKALINE PROTEASE / OLDSHUE RUSHTON

WILAIWAN CHOUYYOK : EXTRACTION OF ALKALINE PROTEASE FROM FERMENTATION BROTH USING AQUEOUS TWO PHASE SYSTEMS IN EXTRACTING COLUMN. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. SEEROONG PRICHANONT ,Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC.PROF. NAPA SIWARUNGSON. 124 PP. ISBN . 974-03-1115-6.



The aim of this research was to determine proper conditions for extraction of alkaline protease from fermentation broth of *Bacillus Subtilis* TISTR 25 using aqueous two phase systems of PEG 1000 and potassium phosphate. The research was divided into three sections. The first section was to study effects of system pH (7.5 , 8.5, 9.5, and 10.5), volume ratio of upper and lower phases (22:1, 3:1, 1:1 ,1:3 and 1:25), and fermentation broth concentrations (10, 20, 30, 40, 50 % w/w) on partition coefficients and specific activity of alkaline protease. The optimal conditions for alkaline protease extraction were pH value of 7.5, volume ratio of 1:25, 50% w/w fermentation broth which gave the partition coefficient , specific activity, and yield percent of 48.3 , 17.7 U/mg protein, and 62.2, respectively.

The second section was to select type and design suitable extraction column. The criteria used were: total throughput , numbers of equilibrium stages, physical properties of the aqueous two phase system, volumetric flow rate ratio, ability to handle solid, ease of cleaning, and low maintenance characteristic. Judging from all these criteria, Oldshue Rushton column was selected and designed for further study. The column was 500 mm. high with the column diameter of 45 mm, impeller diameter of 18 mm., ring internal diameter of 23 mm., and compartment height of 23 mm.

The third and final section of this research was the study of impeller revolution speed (0, 50, 100, 150, and 200 rpm), dispersed (1.0, 2.1, 3.4, and 5.3 ml/min) and continuous phase flow rates (17.9 and 11.8 ml/min), and fermentation broth concentration (20, 40, 60, 72% w/w in continuous phase) effects on purity factor, yield percent, and column extraction efficiency. Extraction was done in continuous mode with dispersed phase composed of 42.5% w/w PEG1000, 2.5% w/w potassium phosphate, and 55.0 %w/w water flowing upwards, and continuous phase of 28.0% potassium phosphate, and 72.0 % w/w water flowing downwards. It was found that the optimal conditions for alkaline protease extraction in the Oldshue Rushton column were impeller speed of 100 rpm, dispersed and continuous phase flow rates of 3.4, and 11.8 ml/min, and 20% w/w of fermentation broth which gave purity factor, yield percent, and extraction efficiency of 6.0, 73.7, and 0.79, respectively. It was also found the activity of the extracted alkaline protease dissolve in PEG1000 rich phase system reduced from its initial activity 12.9, 9.2, and 6.2 percent when left at 32 ± , 4 and –20 °C respectively, for one month. The proper conditions found for alkaline protease extraction in Oldshue Rushton column in this work can be used for further investigation to determine characteristic velocity, and mass transfer coefficient for the design of larger extractor.


Department............Chemical Engineering ................Student's signature................................

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

Academic year ............2001..................................Co-advisor's signature............................

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยความช่วยเหลือจากหลายๆท่าน ผู้เขียนขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สีรุ้ง ปรีชานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูงที่ได้ให้คำปรึกษาที่มีคุณค่าต่อการดำเนินและพัฒนางานวิจัย ตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ ตลอดจนการพัฒนาความคิดให้เป็นนักวิจัยที่ดี และ รองศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมและให้ความอนุเคราะห์เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ธวัชชัย ชรินพาณิชกุล ประธานกรรมการและ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทธิชัย อัสสะบำรุงรัตน์ และ อาจารย์ ดร. เหมือนเดือน พิศาลพงศ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้เสนอข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์และแก้ไข เพิ่มเติมส่วนที่บกพร่องของงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย และภาควิชาวิศวกรรมเคมี ที่ได้สนับสนุนให้ทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ๆเพื่อนๆ และน้องๆ ห้องวิจัยวิศวกรรมชีวเคมี ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณน้องๆ จากภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำการเลี้ยง เชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เพื่อผลิตแอลคาไลน์โพรทีเอสในงานวิจัยนี้ ตลอดจนคำแนะนำที่เกี่ยวกับเอนไซม์

ท้ายสุดนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณยาย(ที่ล่วงลับไปแล้ว)และขอบคุณทุกคนในครอบครัวที่คอยเป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนทางการศึกษาตลอดมา จนทำให้ผู้วิจัยสามารถทำงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.................................................................................... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.................................................................................... จ
กิตติกรรมประกาศ.................................................................................... ฉ
สารบัญ.................................................................................... ช
สารบัญตาราง.................................................................................... ญ
สารบัญรูป.................................................................................... ฐ
สัญลักษณ์.................................................................................... ด

บทที่

1.บทนำ.................................................................................... 1
1.1 วัตถุประสงค์.................................................................................... 2
1.2 ขอบเขตการศึกษา.................................................................................... 2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับขอบเขตการศึกษา.................................................. 3
2. ทฤษฎี .................................................................................... 4
2.1 บทนำ.................................................................................... 4
2.2 แอลคาไลน์โพรทีเอส.................................................................................... 4
2.3 เทอร์โมไดนามิกของสมดุลวัฏภาค.................................................................... 5
2.3.1 เงื่อนไขสมดุลวัฏภาค.................................................................... 5
2.3.2 ค่าสัมประสิทธิ์การแยก.................................................................... 6
2.3.3 ปัจจัยการแยก.................................................................... 7
2.4 การสกัดของเหลวด้วยของเหลว.................................................................... 7
2.4.1 ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค.................................................................... 7
2.4.2 แผนภาพวัฏภาค.................................................................... 7
2.5 เครื่องมือแยกสารและวิธีการเลือกเครื่องมือแยกสารในระบบของเหลว-ของเหลว.... 9
2.5.1 เครื่องมือแยกสาร.................................................................... 9
2.5.2 วิธีเลือกเครื่องมือแยกสาร.................................................................... 19

# สารบัญ(ต่อ)

บทที่ หน้า

3. ตรวจเอกสาร.......... 27
3.1 ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์.......... 27
3.1.1 ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบ.......... 28
3.1.2 ปริมาณเอนไซม์หรือโปรตีนที่ต้องการ.......... 31
3.1.3 สัดส่วนเชิงปริมาตรวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่าง.......... 33
3.1.4 โครงสร้างและน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์หรือโปรตีน.......... 34
3.2 การสกัดโดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในหอสกัด.......... 35
4. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.......... 38
4.1 อุปกรณ์.......... 38
4.2 เคมีภัณฑ์.......... 38
4.3 เอนไซม์.......... 39
4.4 วิธีการทดลอง.......... 40
4.4.1 การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอส ในบีกเกอร์ขนาดเล็ก.......... 40
4.4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการดำเนินการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอส ในหอสกัดแบบ Oldshue Rushton.......... 41
4.5 การวิเคราะห์.......... 42
4.5.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอส.......... 42
4.5.2 การเตรียมสารละลายเพื่อหากิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอส.......... 43
4.5.3 การวิเคราะห์หาโปรตีน.......... 44
4.5.4 การเตรียมสารละลายเพื่อหาปริมาณโปรตีน.......... 44
5 ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง.......... 45
5.1 ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกแอลคาไลน์โพรทีเอสในบีกเกอร์.......... 45
5.1.1 อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่าง.......... 45
5.1.2 อิทธิพลของปริมาณน้ำหมักที่เติมในระบบและสัดส่วนเชิงปริมาตร ของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่าง.......... 51
5.2 การเลือกชนิดและออกแบบหอสกัด.......... 57
5.2.1 การเลือกชนิดของหอสกัด.......... 57

# สารบัญ(ต่อ)

บทที่ หน้า

5.2.2 การออกแบบหอสกัดแบบ Oldshue Rushton……………..…………... 61

5.3 การสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัด……………………………………….. 66

5.3.1 อิทธิพลของความเร็วรอบในการปั่นกวนต่อการสกัด แอลคาไลน์โพรทีเอส………………………………………………… 67

5.3.2 อิทธิพลของความเร็วรอบในการปั่นกวนร่วมด้วยอิทธิพลของ อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว……………………………… 77

5.3.3 อิทธิพลของผลต่างความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอส ระหว่างวัฏภาค………………………………………………………… 90

6. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ…………………………………………..……………..99

6.1 สรุปผลการทดลอง…………………………..……………………………..99

6.2 ข้อเสนอแนะ ……………………………………………………………………103

รายการอ้างอิง……………………………………………………………………………..104

ภาคผนวก……………………………………………………………………………………108

ภาคผนวก ก……………………………………………………………..……………109

ภาคผนวก ข…………………………………………………………...……………111

ภาคผนวก ค…………………………………………………………...……………113

ประวัติผู้เขียนผู้เขียนวิทยานิพนธ์…………………………………………………….………124

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงข้อมูลและวิธีเลือกหอสกัด……..……………………………………………..20
3.1 อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก………..……….30
3.2 ผลของปริมาณเอนไซม์หรือโปรตีนที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก……………….…….. 32
3.3 โครงสร้างและน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์หรือโปรตีน………………………….……… 35
ค.1 ความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสและโปรตีนที่ทำการทดลองในบีกเกอร์ เมื่อปรับเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่าง…………………………………..…….……….114
ค.2 ความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ทำการทดลองในบีกเกอร์ เมื่อปรับเปลี่ยนสัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างและปริมาณน้ำหนัก………….…..….115
ค.3 ความเข้มข้นของโปรตีนที่ทำการทดลองในบีกเกอร์ เมื่อปรับเปลี่ยนสัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างและปริมารน้ำหมัก…………….………115
ค.4 ความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ถูกสกัดความเร็วรอบต่างๆ ตามเวลา…..…...…116
ค.5 ความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกสกัดที่ความเร็วรอบต่างๆ ตามเวลา……...….……….…...…116
ค.6 กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ถูกสกัดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 0 รอบต่อนาที อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคเท่ากับ 17.9 มิลลิลิตรต่อนาที ……………………..……………..…117
ค.7 ความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกสกัดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 0 รอบต่อนาที อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคเท่ากับ 17.9 มิลลิลิตรต่อนาที …………………..……..…………………..…117
ค.8 กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ถูกสกัดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 50 รอบต่อนาที อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคเท่ากับ 17.9 มิลลิลิตรต่อนาที ……..……..…………….…...118
ค.9 ความเข้มข้นของโปรตีนถูกสกัดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ ตามเวลาความเร็วรอบในการปั่นกวน 50 รอบต่อนาที อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคเท่ากับ 17.9 มิลลิลิตรต่อนาที ……………………………………..…118
ค.10 กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ถูกสกัดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 100 รอบต่อนาที อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคเท่ากับ 17.9 มิลลิลิตรต่อนาที ………………..………………..…119

# สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ค.11 ความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกสกัดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 100 รอบต่อนาที อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคเท่ากับ 17.9 มิลลิลิตรต่อนาที ....................................................119

ค.12 กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ถูกสัดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 0 รอบต่อนาที อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคเท่ากับ 11.8 มิลลิลิตรต่อนาที ......................................120

ค.13 ความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกสกัดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 0 รอบต่อนาที อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคเท่ากับ 11.8 มิลลิลิตรต่อนาที ....................................................120

ค.14 กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ถูกสกัดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 50 รอบต่อนาที อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคเท่ากับ 11.8 มิลลิลิตรต่อนาที ......................................121

ค.15 ความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกสกัดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 50 รอบต่อนาที อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคเท่ากับ 11.8 มิลลิลิตรต่อนาที ....................................................121

ค.16 กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ถูกสกัดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 100 รอบต่อนาที อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคเท่ากับ 11.8 มิลลิลิตรต่อนาที ......................................122

ค.17 ความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกสกัดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 100 รอบต่อนาที อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคเท่ากับ 11.8 มิลลิลิตรต่อนาที ....................................................122

ค.18 กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ถูกสกัดที่ความเข้มข้นในน้ำหมักเริ่มต้นต่างๆในวัฏภาคต่อเนื่อง ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 100 รอบต่อนาที และอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่อง 3.4 และ 11.8 มิลลิลิตรต่อนาทีตามลำดับ.......... ..................................................123

## สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ค.19 ความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกสกัดที่ความเข้มข้นในน้ำหมักเริ่มต้นต่างๆใน วัฏภาคต่อเนื่อง ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 100 รอบต่อนาที และ อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่อง 3.4 และ 11.8 มิลลิลิตรต่อนาทีตามลำดับ.......... ...................................................123

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 แผนภาพวัฏภาคของระบบ PEG1000/โพแทสเซียมฟอสเฟต/น้ำ ความเป็นกรด-ด่าง 7.5 อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส และที่ค่าความดันบรรยากาศ........................... 8

2.2 เครื่องสกัดแบบ mixer-settler........................................................ 10

2.2 ถัง settler........................................................................ 10

2.4 ใบกวนลักษณะต่างๆ..................................................................... 11

2.5 หอสกัดแบบ Spray....................................................................... 12

2.6 หอสกัดแบบ Plate....................................................................... 13

2.7 หอสกัดแบบ Scheibel, Oldshue Rushton ,RDC, ARD, Kuhni, Reciprocating plate, Raining Bucket........................................................................ 15

5.1 กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ อุณหภูมิห้องและความดันบรรยากาศ.............................................................. 46

5.2 อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก แอลคาไลน์โพรทีเอส ที่ปริมาณน้ำหมัก 20%(w/w) ที่อุณหภูมิห้อง และความดันบรรยากาศ.....................................................................48

5.3 อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก โปรตีนทั้งหมด ที่ปริมาณน้ำหมัก 20%(w/w) ที่อุณหภูมิห้องและความดันบรรยากาศ........ 49

5.4 อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบที่มีผลต่อกิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอส ในวัฏภาคบนและล่าง ที่ปริมาณน้ำหมัก 20%(w/w) ที่อุณหภูมิห้องและ ความดันบรรยากาศ...................................................................... 49

5.5 อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบที่มีผลต่อค่ากิจกรรมจำเพาะของ แอลคาไลน์โพรทีเอส ที่ปริมาณน้ำหมัก 20%(w/w) ที่อุณหภูมิห้องและ ความดันบรรยากาศ...................................................................... 50

5.6 อิทธิพลของสัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างและปริมาณน้ำหมัก ที่มีผลต่อกิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคบนและวัฏภาคล่าง ที่อุณหภูมิห้องและความดันบรรยากาศ....................................................... 53

## สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า

5.7 อิทธิพลของสัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างและปริมาณน้ำหมัก ที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่อุณหภูมิห้อง และความดันบรรยากาศ........................................................................ 55

5.8 อิทธิพลของสัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างและปริมาณน้ำหมัก ที่มีผลต่อค่ากิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคบนและวัฏภาคล่าง ที่อุณหภูมิห้องและความดันบรรยากาศ........................................................ 56

5.9 อิทธิพลของสัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างและปริมาณน้ำหมัก ที่มีผลต่อเปอร์เซนต์ผลได้ที่อุณหภูมิห้องและความดันบรรยากาศ.............................. 57

5.10 แบบจำลองหอสกัดแบบ Oldshue Rushton ที่ใช้ในการในงานวิจัย.......................... 65

5.11 หอสกัดแบบ Oldshue Rushton ที่ใช้ในการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอส........................ 66

5.12 กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคกระจายตัว และวัฏภาคต่อเนื่อง ตามเวลา ภาวะการทดลอง คือ $F_d$ = 2.1 ml/min, $F_c$ = 17.9 ml/min, pH = 7.5 ปริมาณน้ำหมัก = 20%(w/w) ของวัฏภาคต่อเนื่อง........................................................ 69

5.13 ความเข้มข้นของโปรตีนในวัฏภาคกระจายตัว และวัฏภาคต่อเนื่อง ตามเวลา ภาวะการทดลอง คือ $F_d$ = 2.1 ml/min, $F_c$ = 17.9 ml/min, pH = 7.5 ปริมาณน้ำหมัก = 20%(w/w) ของวัฏภาคต่อเนื่อง........................................................ 70

5.14 กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคกระจายตัว และวัฏภาคต่อเนื่อง ตามเวลา ซึ่งทำการทดลองในบีกเกอร์ขนาดเล็กที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5 อุณหภูมิห้อง และ ความดันบรรยากาศ........................................................ 71

5.15 อิทธิพลความเร็วรอบในการปั่นกวนต่อแอลคาไลน์โพรทีเอสและโปรตีนใน วัฏภาคกระจายตัว ภาวะการทดลองคือ $F_d$ = 2.1 ml/min, $F_c$ = 17.9 ml/min, pH = 7.5 ปริมาณน้ำหมัก = 20%(w/w) ของวัฏภาคต่อเนื่อง.................................... 72

5.16 อิทธิพลความเร็วรอบในการปั่นกวนต่อเปอร์เซนต์ผลได้ในการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอส ภาวะการทดลองคือ $F_d$ = 2.1 ml/min, $F_c$ = 17.9 ml/min, pH = 7.5 ปริมาณน้ำหมัก = 20%(w/w) ของวัฏภาคต่อเนื่อง.................................... 74

# สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า

5.17 อิทธิพลความเร็วรอบในการปั่นกวนต่อค่ากิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอส ในวัฏภาคกระจายตัว ภาวะการทดลองคือ $F_d$ = 2.1 ml/min, $F_c$ = 17.9 ml/min, pH = 7.5 ปริมาณน้ำหมัก = 20%(w/w) ของวัฏภาคต่อเนื่อง........................ 76

5.18 อิทธิพลความเร็วรอบในการปั่นกวนต่อค่าค่าจำนวนเท่าความบริสุทธิ์ของแอลคาไลน์-โพรทีเอสในภาคกระจายตัวต่อในน้ำหมัก ภาวะการทดลองคือ $F_d$ = 2.1 ml/min, $F_c$ = 17.9 ml/min, pH = 7.5 ปริมาณน้ำหมัก = 20%(w/w) ของวัฏภาคต่อเนื่อง......... 77

5.19 อิทธิพลความเร็วรอบในการปั่นกวนต่อประสิทธิภาพการสกัดโพรทีเอสในหอสกัด ภาวะการทดลองคือ $F_d$ = 2.1 ml/min,$F_c$ = 17.9 ml/min, pH = 7.5 ปริมาณน้ำหมัก = 20%(w/w) ของวัฏภาคต่อเนื่อง........................................................ 78

5.20 อิทธิพลความเร็วรอบในการปั่นกวนร่วมด้วย $F_d$ ที่ส่งผลต่อค่าเปอร์เซนต์ผลได้ในการสกัดโพรทีเอส ภาวะการทดลองคือ $F_c$ = 17.9 ml/min, pH = 7.5 ปริมาณน้ำหมัก = 20%(w/w) ของวัฏภาคต่อเนื่อง................................................ 80

5.21 อิทธิพลความเร็วรอบในการปั่นกวนร่วมด้วย $F_d$ ที่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอส ภาวะการทดลองคือ ,$F_c$ = 17.9 ml/min, pH = 7.5 ปริมาณน้ำหมัก = 20%(w/w) ของวัฏภาคต่อเนื่อง................................................ 81

5.22 อิทธิพลความเร็วรอบในการปั่นกวนร่วมด้วย $F_d$ ที่มีผลต่อจำนวนเท่าความบริสุทธิ์ของแอลคาไลน์โพรทีเอส ภาวะการทดลองคือ $F_c$ = 17.9 ml/min, pH = 7.5 ปริมาณน้ำหมัก = 20%(w/w) ของวัฏภาคต่อเนื่อง................................................ 82

5.23 อิทธิพลความเร็วรอบในการปั่นกวนร่วมด้วย $F_d$ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัด ภาวะการทดลอง $F_c$ = 17.9 ml/min, pH = 7.5 ปริมาณน้ำหมัก = 20%(w/w) ของวัฏภาคต่อเนื่อง........................................................................ 83

5.24 อิทธิพลความเร็วรอบในการปั่นกวนร่วมด้วย $F_d$ ที่ส่งผลต่อค่าเปอร์เซนต์ผลได้ ภาวะการทดลองคือ $F_c$ = 11.84 ml/min, pH = 7.5 ปริมาณน้ำหมัก = 20%(w/w) ของวัฏภาคต่อเนื่อง................................................ 84

5.25 อิทธิพลความเร็วรอบในการปั่นกวนร่วมด้วย $F_d$ ที่มีผลต่อความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสและของโปรตีนในวัฏภาคกระจายตัว ภาวะการทดลองคือ $F_c$ = 11.84 ml/min, pH = 7.5 ปริมาณน้ำหมัก = 20%(w/w) ของวัฏภาคต่อเนื่อง......... 86

# สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า

5.26 อิทธิพลความเร็วรอบในการปั่นกวนร่วมด้วย $F_d$ ที่ส่งผลต่อค่าเปอร์เซนต์ผลได้ของ
โปรตีน ภาวะการทดลองคือ $F_c$ = 11.84 ml/min, pH = 7.5
ปริมาณน้ำหมัก = 20%(w/w) ของ วัฏภาคต่อเนื่อง........................................ 87
5.27 อิทธิพลความเร็วรอบในการปั่นกวนร่วมด้วย $F_d$ ที่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมจำเพาะของ
แอลคาไลน์โพรทีเอส ภาวะการทดลองคือ ,$F_c$ = 11.8 ml/min, pH = 7.5
ปริมาณน้ำหมัก = 20%(w/w) ของวัฏภาคต่อเนื่อง.............................................. 89
5.28 อิทธิพลความเร็วรอบในการปั่นกวนร่วมด้วย $F_d$ ที่มีผลต่อจำนวนเท่าความบริสุทธิ์
ของแอลคาไลน์โพรทีเอส ภาวะการทดลองคือ $F_c$ = 11.8 ml/min, pH = 7.5
ปริมาณน้ำหมัก = 20%(w/w) ของวัฏภาคต่อเนื่อง.............................................. 90
5.29 อิทธิพลของปริมาณเปอร์เซนต์น้ำหมักต่อน้ำหนักวัฏภาคที่มีผลต่อเนื่องต่อความเข้มข้น
ของแอลคาไลน์โพรทีเอสและโปรตีนในวัฏภาคกระจายตัว ภาวะการทดลอง คือ
ความเร็วรอบในการปั่นกวน = 100 rpm, $F_d$ = 3.4 ml/min, $F_c$ = 11.8 ml/min,
pH = 7.5 ................................................................................................ 91
5.30 อิทธิพลของปริมาณเปอร์เซนต์น้ำหมักต่อน้ำหนักวัฏภาคต่อเนื่องที่มีผลต่อ
เปอร์เซนต์ผลได้ ภาวะการทดลอง คือ ความเร็วรอบในการปั่นกวน= 100 rpm
$F_d$ = 3.4 ml/min, $F_c$ = 11.8 ml/min, pH = 7.5 ............................................ 92
5.31 อิทธิพลของปริมาณเปอร์เซนต์น้ำหมักต่อน้ำหนักวัฏภาคต่อเนื่องที่มีผลต่อ
ค่ากิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอส ภาวะการทดลอง คือ ความเร็วรอบใน
การปั่นกวน= 100 rpm, $F_d$ = 3.4 ml/min, $F_c$ = 11.8 ml/min, pH = 7.5 ................ 93
5.32 อิทธิพลของปริมาณเปอร์เซนต์น้ำหมักต่อน้ำหนักวัฏภาคต่อเนื่องที่มีผลต่อ
จำนวนเท่าความบริสุทธิ์ของแอลคาไลน์โพรทีเอสต่อน้ำหมัก ภาวะการทดลอง คือ
ความเร็วรอบในการปั่นกวน= 100 rpm, $F_d$ = 3.4 ml/min, $F_c$ = 11.8 ml/min,
pH = 7.5 ................................................................................................ 94
5.34 อิทธิพลของปริมาณเปอร์เซนต์น้ำหมักต่อน้ำหนักวัฏภาคต่อเนื่องที่มีผลต่อ
ประสิทธิภาพการสกัด ภาวะการทดลอง คือ ความเร็วรอบในการปั่นกวน= 100 rpm,
$F_d$ = 3.4 ml/min, $F_c$ = 11.8 ml/min, pH = 7.5 ............................................ 95

**สัญลักษณ์ตัวแปร**

$a$ พื้นที่ผิวสัมผัส, $m^2$

$A$ พื้นที่หน้าตัด, $m^2$

$c$ จำนวนของสารประกอบในระบบ

$C_i$ ความเข้มข้นของสารประกอบ $i$ ในระบบ

$C_i^1$ ความเข้มข้นของสารประกอบ $i$ ในวัฏภาคที่หนึ่ง (วัฏภาคบน)

$C_i^2$ ความเข้มข้นของสารประกอบ $i$ ในวัฏภาคที่สอง (วัฏภาคล่าง)

$C_{c1}$ ความเข้มข้นในวัฏภาคต่อเนื่องก่อนเข้าหอสกัด

$C_{c2}$ ความเข้มข้นในวัฏภาคต่อเนื่องที่ออกจากหอสกัด

$C_r^*$ ความเข้มข้นในวัฏภาคต่อเนื่องที่ออกจากหอสกัดที่ภาวะสมดุล

$D$ ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่, $m^2/s$

$d_r$ เส้นผ่านศูนย์กลางของใบกวน,m

$d_c$ เส้นผ่านศูนย์กลางภายในของหอสกัด,m

$d_s$ เส้นผ่านศูนย์กลางภายในของวงแหวน,m

$d_{32}$ ขนาดเฉลี่ยของหยดของเหลว, m

$F_c, F_x$ อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง, ml/min

$F_d, F_y$ อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว, ml/min

$F_{c1}$ อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่องเข้าหอ, ml/min

$F_{c2}$ อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่องออกหอ, ml/min

$G$ พลังงานอิสระ กิปป์

$g$ แรงโน้มถ่วงโลก, $m/s^2$

$h_c$ ระยะห่างระหว่างวงแหวนภายในหอสกัด, m

HTU ความสูงของหอสกัดของการถ่ายเทมวลหนึ่งหน่วย (Height of transfer unit), m

$k$ ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลผ่านฟิล์ม

$K$ ค่าคงที่ Boltzmann

$K_{ox}$ ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวม อ้างอิงวัฏภาคต่อเนื่อง,m/s

$K_{oy}, K_{od}$ ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวม อ้างอิงวัฏภาคกระจายตัว,m/s

$l$ ความยาวของครีบใบพัด, cm

$L$ ความสูงของหอสกัด, m

$m_i, m_j$ ค่าสัมประสิทธิ์การแยก $i$ และ $j$ ตามลำดับ

**สัญลักษณ์ตัวแปร (ต่อ)**

| | |
|---|---|
| m(0) | ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของตัวถูกละลายโปรตีนที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเท่ากับจุดไอโซอิเล็กตริกของโปรตีนนั้น |
| M | น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน |
| $M_d$ | Murphee efficiency อ้างอิงวัฏภาคกระจายตัว |
| $n_i$ | จำนวนโมลของสารประกอบ i |
| N | อัตราการถ่ายเทมวล, ความเข้มข้น/เวลา |
| NTU | จำนวนหน่วยที่ถ่ายเทมวล (Number of transfer units) |
| P | ความดันของระบบ |
| T | อุณหภูมิสัมบูรณ์ของระบบ |
| $U_c$ | ความเร็วในการไหลของวัฏภาคต่อเนื่อง m/s |
| $U_d$ | ความเร็วในการไหลของวัฏภาคกระจายตัว m/s |
| $U_r$ | สัดส่วนความเร็วในการไหลของวัฏภาคกระจายตัวต่อวัฏภาคต่อเนื่อง |
| $V_1$ | ปริมาตรของวัฏภาคบน |
| $V_2$ | ปริมาตรของวัฏภาคล่าง |
| $V_N$ | characteristic velocity m/s (ที่ความเร็วรอบในการปั่นกวนของใบพัดเท่ากับ N รอบต่อนาที) |
| w | ความกว้างของครีบใบพัด, cm |
| $w_b$ | ความกว้างของ baffer ในหอสกัด, cm |
| $x_i$ | สัดส่วนโมลของสารประกอบ i ในวัฏภาคต่อเนื่อง |
| $x_i^*$ | สัดส่วนโมลของสารประกอบ i ในวัฏภาคต่อเนื่องที่สมดุล |
| $x_{in}$ | สัดส่วนโมลของสารประกอบเป้าหมายในวัฏภาคต่อเนื่องที่เข้าหอสกัด |
| $x_{out}$ | สัดส่วนโมลของสารประกอบเป้าหมายในวัฏภาคต่อเนื่องที่ออกจากหอสกัด |
| Y | เปอร์เซนต์ผลได้ |
| $y_i$ | สัดส่วนโมลของสารประกอบ i ในวัฏภาคกระจายตัว |
| $y_i^*$ | สัดส่วนโมลของสารประกอบ i ในวัฏภาคกระจายตัว |
| $y_{in}$ | สัดส่วนโมลของสารละลายเป้าหมายในวัฏภาคกระจายตัวที่เข้าหอสกัด |
| $y_{out}$ | สัดส่วนโมลของสารละลายเป้าหมายในวัฏภาคกระจายตัวที่ออกจากหอสกัด |
| z | ประจุสุทธิของโปรตีน |
| $Z_C$ | ระยะห่างระหว่างวงแหวนภายในหอสกัด |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**สัญลักษณ์ตัวแปร (ต่อ)**

**สัญลักษณ์อักษรกรีก**

| | |
|---|---|
| $\mu_i$ | ศักยเคมี ของสารประกอบ $i$ |
| $\beta_{ij}$ | ค่าสัมพันธ์การเลือกของสารประอบ $i$ และ $j$ |
| $\phi$ | วัฏภาค |
| $\varphi$ | สัดส่วนปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่อปริมาตรของเหลวทั้งหมดในหอสกัด, hold up |
| $\gamma$ | แรงตึงผิว (interfacial tension), $kg/s^2=10^3$ dyne/cm |
| $\gamma_{iL}$ | activity coefficient ของสารประกอบ $i$ ในของเหลว |
| $\Delta\rho$ | ผลต่างของความหนาแน่นของวัฏภาค, $kg/m^3$ |
| $\eta$ | ปัจจัยกำหนดลักษณะของวัฏภาคและปฏิสัมพันธ์ต่อองค์ประกอบของโปรตีน |
| $\theta$ | ลักษณะเฉพาะของโปรตีน ขึ้นกับพารามิเตอร์ภายนอก เช่น อุณหภูมิ องค์ประกอบของพอลิเมอร์และเกลือในระบบ, สารเติมแต่งเกลือที่ใช้ ฯลฯ |
| $\delta$ | ความหนาของชั้นฟิล์มของหยดของเหลว |
| $\lambda$ | ประสิทธิภาพการสกัด |
| $\Delta C$ | ผลต่างของความเข้มข้นของสารละลายระหว่างวัฏภาค |

**สัญลักษณ์ของตัวห้อย**

| | |
|---|---|
| f | ค่าที่ความจุสูงสุด (flooding point) |
| i, j | ชนิดของสารประกอบในระบบ |
| lm | ค่าเฉลี่ย ล็อกการิทึม (log - mean) |
| $n_i^{\phi}$ | จำนวนโมลของสารประกอบ $i$ ในวัฏภาค $\phi$ |
| P | ความดัน |
| T | อุณหภูมิที่สมบูรณ์ เคลวิน (K) |
| 1 | วัฏภาคที่หนึ่ง หรือวัฏภาคบน |
| 2 | วัฏภาคที่สอง หรือวัฏภาคล่าง |

**สัญลักษณ์ตัวแปร (ต่อ)**

**สัญลักษณ์ ตัวยก**

| | |
|---|---|
| 1 | วัฏภาคที่หนึ่ง หรือวัฏภาคบน |
| 2 | วัฏภาคที่สอง หรือวัฏภาคล่าง |
| * | ภาวะที่สมดุล |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

## บทนำ

โพรทีเอส (protease) หรือ โพรทีโอไลติก เอนไซม์ (proteolytic enzymes) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีน เป็นเอนไซม์ที่เกิดจากการหมักเชื้อจุลินทรีย์ เช่นพวกเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียสกุลบาซิลัส (Bacillus) จะเป็นแบคทีเรียที่นิยมใช้ในการผลิตโพรทีเอส เนื่องจากบาซิลัสสามารถผลิตโพรทีเอสเป็นเอนไซม์ที่ถูกสกัดออกภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ในปริมาณที่สูง

โพรทีเอส เป็นเอนไซม์ที่มีความต้องการใช้มากที่สุดในอุตสาหกรรม โดยมีปริมาณถึง 60 เปอร์เซนต์ของเอนไซม์ทั้งหมดที่ใช้ในอุตสาหกรรม (Ng & Kenealy, 1986) ซึ่งอุตสาหกรรมที่โพรทีเอสเข้าไปมีความสำคัญได้แก่ อุตสาหกรรม ผงซักฟอก การซักแห้ง ฟอกหนัง อาหารและยา ดังนั้นจากการที่สามารถนำโพรทีเอสไปใช้ได้ในงานหลายชนิด ทำให้การผลิตและการทำให้โพรทีเอสบริสุทธิ์และสามารถแยกโพรทีเอสออกมาจากน้ำหมักได้ปริมาณมากที่สุดโดยไม่เกิดความเสียหายแก่โพรทีเอสจึงเป็นงานที่มีสำคัญอย่างมาก

สารละลายน้ำสองวัฏภาคเป็นวิธีการหนึ่งที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางในการแยกโปรตีนหรือเอนไซม์จากน้ำหมักหรือจากสารละลาย เนื่องจากเป็นระบบที่ทำได้ง่าย มีประสิทธิภาพสูง และสะดวกในการดำเนินการ และมีสภาวะแวดล้อมของระบบเหมาะสมต่อเอนไซม์ คือ ไม่ทำให้เอนไซม์เสื่อมสภาพ เนื่องจากน้ำเป็นตัวทำละลายธรรมชาติของเอนไซม์ ซึ่งสารละลายน้ำสองวัฏภาค มีด้วยกัน 2 ระบบ คือ ระบบที่ประกอบด้วยพอลิเมอร์ 2 ชนิด และ ระบบที่เป็นพอลิเมอร์หนึ่งชนิดร่วมกับเกลือ โดยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคสามารถทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์หรือเข้มข้นขึ้นเนื่องจากการเลือกที่จะละลายในวัฏภาคใดวัฏภาคหนึ่งของเอนไซม์มากกว่าอีกวัฏภาคหนึ่ง ซึ่งปัจจัยในการเลือกหรือแยกของเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของระบบ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ เป็นต้น ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคจะมีแรงตึงผิวระหว่างวัฏภาคต่ำ (interfacial tension) คือ ประมาณ 0.0001-0.1 dyn/cm (Andersson และ คณะ , 1983) ดังนั้นเมื่อมีการกวนระบบเกิดขึ้น จะทำให้หยดของวัฏภาคมีขนาดเล็กได้ง่ายและมีพื้นที่ผิวสัมผัสของวัฏภาคได้มาก จึงสามารถลดปัญหาเรื่องการถ่ายเทมวลสารได้

ที่ผ่านมาได้มีการวิจัยนำระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคมาประยุกต์ใช้กับการแยกแอลคาไลน์โพรทีเอส (alkaline protease) (Sinha และ คณะ, 1996 ; Hotha และ คณะ, 1997; นันทิญา, 2543) งานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะนำภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกแอลคาไลน์โพรทีเอส (นันทิญา, 2543 ) มาศึกษาและพัฒนาต่อ ซึ่งนันทิญาได้ศึกษาการแยกครูดแอลคาไลน์โพรทีเอส ซึ่งได้ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์แล้วบางส่วน แต่ในงานวิจัยนี้จะศึกษาการแยกแอลคาไลน์โพรทีเอสจากน้ำหมักโดยตรง โดยใช้สารละลายน้ำสองวัฏภาคระบบพอลิเมอร์-เกลือ และยังมุ่งเน้นที่จะนำภาวะที่ได้จากการทดลองในบีกเกอร์ไปใช้ในหอสกัด โดยมีเป้าหมายที่จะเลือกและออกแบบหอสกัดและหาภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอส เพื่อที่จะสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอส โดยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในระดับขยายขนาดต่อไป

**1.1 วัตถุประสงค์**

เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสจาก น้ำหมักโดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในหอสกัดขนาดห้องปฏิบัติการ

**1.2 ขอบเขต**

1. ศึกษาภาวะและระบบของสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ Polyethylene glycol 1000 (PEG1000) และ โพแทสเซียมฟอสเฟตที่เหมาะสมสำหรับการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสจากน้ำหมัก โดยใช้ค่าคงที่สมดุล ความบริสุทธิ์ และ เปอร์เซนต์ผลได้ เป็นเกณฑ์ในการพิจารณา โดยปัจจัยที่ทำการศึกษามีดังนี้

   1.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าที่ทำการศึกษาอยู่ในช่วง 7.5 –10.5

   1.2 สัดส่วนปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่าง ค่าที่ทำการศึกษาในช่วง 22:1 – 1:25

   1.3 สัดส่วนโดยน้ำหนักของน้ำหมักที่เติมในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค อยู่ใน ช่วง 10 – 50 เปอร์เซนต์ ของระบบทั้งหมด

2. เลือกชนิดและออกแบบหอสกัดขนาดห้องปฏิบัติการ

3. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสจากน้ำหมักในหอสกัดที่ออกแบบ โดยใช้จำนวนเท่าความบริสุทธิ์ เปอร์เซนต์ผลได้ และประสิทธิภาพการสกัด เป็นเกณฑ์ในการพิจารณา โดยปัจจัยที่จะทำการศึกษามีดังนี้
   - 3.1 ความเร็วรอบในการกวน ( รอบต่อนาที, rpm ) ค่าที่ทำการศึกษาอยู่ในช่วง 0 – 200 รอบต่อนาที
   - 3.2 อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว (วัฏภาคบน) ค่าที่ทำการศึกษาอยู่ในช่วง 1.0 –5.3 มิลลิลิตรต่อนาที และอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง (วัฏภาคล่าง) ค่าที่ทำการศึกษามีค่าเท่ากับ 17.9 และ 11.8 มิลลิลิตรต่อนาที
   - 3.3 ความเข้มข้นของสารละลาย (solution) ค่าที่ทำการศึกษาอยู่ในช่วง 20-72 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักของวัฏภาคต่อเนื่อง

### 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทราบถึงภาวะและองค์ประกอบของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่เหมาะสมในการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสจากน้ำหมัก

1.3.2 ทราบถึงภาวะที่เหมาะสมและอิทธิพลของปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอส โดยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในหอสกัดขนาดห้องปฏิบัติการ

1.3.3 เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัดระดับขยายขนาด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 2

# ทฤษฎี

## 2.1 บทนำ

ในบทนี้จะกล่าวถึง เอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอส เทอร์โมไดนามิกของสมดุลวัฏภาค ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค เครื่องสกัดและวิธีการเลือกชนิดของเครื่องสกัด ซึ่งเป็นความรู้ที่ต้องใช้ในการศึกษาการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัด

## 2.2 แอลคาไลน์โพรทีเอส

แอลคาไลน์โพรทีเอส หรือ เซอรีนโพรทีเอส (serine protease) เป็นโพรทีเอสชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีน โดยโพรทีเอสจะย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนโมเลกุล โพรทีเอสเป็นไซม์ที่มีความสำคัญมากในกระบวนการผลิตของอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมฟอกหนัง และอุตสาหกรรมซักฟอก

แอลคาไลน์โพรทีเอส จะทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนในภาวะสารละลายที่เป็นด่าง โดยเอนไซม์ชนิดนี้จะมี หมู่ –OH group อยู่ที่บริเวณเร่ง (active site) ซึ่งเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ไคโมทริปซิน (chymotrypsin), ทริปซิน (trypsin), อีลาสเตส (elastase), ทรอมบิน(thrombin) และซับทิลิซิน (subtilisin) แอลคาไลน์โพรทีเอสจะถูกยับยั้งการทำงานโดยตัวยับยั้งจำเพาะที่มีผลต่อกรดอะมิโนเซอรีน ได้แก่ ได-ไอโซโพรพีลฟลูออโรฟอสโฟเนต (di- isopropylflourophosphonate, DFP) และ ฟีนิลเมททิลซัลโฟนิล ฟลูออไรด์ (phenylmethyl sulphonyl fluoride, PMSF) เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง และปัจจัยอื่นที่แวดล้อม ดังนั้นปัจจัยที่มีผลต่อการเสื่อมสภาพของแอลคาไลน์โพรทีเอส จึงได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ สารเคมี และแรงกล

## 2.3 เทอร์โมไดนามิกของสมดุลวัฏภาค

ในกระบวนการแยกสารจะอาศัยคุณสมบัติทางเทอร์โมไดนามิกของสาร ซึ่งอธิบายได้ด้วยสมการที่เป็นความสัมพันธ์ของเทอร์โมไดนามิกของสาร โดยจะเกี่ยวข้องถึงความต้องการพลังงานสมดุลของวัฏภาค และขนาดของเครื่องมือที่จะใช้แยก ในหัวข้อนี้จะกล่าวถึงคุณสมบัติและหลักการทางเทอร์โมไดนามิกที่ใช้สำหรับกระบวนการแยกสารที่สมดุลวัฏภาค ได้แก่ เงื่อนไขของสมดุลของวัฏภาค ปัจจัยการแยก (separation factor ) เป็นต้น

### 2.3.1 เงื่อนไขของสมดุลของวัฏภาค

ถ้าในระบบสารผสมมากกว่า 1 วัฏภาคประกอบด้วย ส่วนประกอบ c ชนิด และมี $\phi$ วัฏภาค สามารถเขียนภาวะทางเทอร์โมไดนามิกที่สมดุลของสารได้ดังสมการที่ 2.1

$$T^{(1)} = T^{(2)} = \ldots T^{(\phi)}$$

$$P^{(1)} = P^{(2)} = \ldots P^{(\phi)} \qquad 2.1$$

$$\mu_i^{(1)} = \mu_i^{(2)} = \ldots \mu_i^{(\phi)}, i = 1, \ldots, c$$

สามารถเขียนความสัมพันธ์ของศักยเคมี กับ พลังงานอิสระกิปป์ ( Gibbs free energy , $G^{(\phi)}$) ได้ดังสมการที่ 2.2

$$\mu_i^{(\phi)} = \frac{(\partial G^{(\phi)})}{(\partial n_i^{(\phi)})_{T,P,n_{ii}^{(\phi)}}} \qquad 2.2$$

ดังนั้นการเข้าสู่สมดุลของระบบขึ้นอยู่กับ 3 ปัจจัย คือ อุณหภูมิ ความดัน และศักยเคมีของแต่ละสารประกอบในระบบ ซึ่งโดยปกติสมดุลในระบบของเหลว-ของเหลว จะดำเนินการที่อุณหภูมิและความดันคงที่ ดังนั้นจะได้ว่า

$$d(G^{(\phi)})_{T,P} = 0 \qquad 2.3$$

### 2.3.2 ค่าสัมประสิทธิ์การแยก

เป็นอัตราส่วนของสัดส่วนเชิงโมล (mole fraction) ของสารประกอบที่กระจายตัวอยู่ในระบบ 2 วัฏภาคที่ภาวะสมดุล โดยในหัวข้อนี้จะกล่าวเฉพาะในกรณีที่ภาวะสมดุลของของเหลว-ของเหลว เท่านั้น

นิยามค่าสัมประสิทธิ์การแยกสำหรับระบบของเหลว-ของเหลว แสดงได้ดังสมการที่ 2.4

$$m_i = \frac{x_i^{(1)}}{x_i^{(2)}} = \frac{\gamma_{iL}^{(2)}}{\gamma_{iL}^{(1)}} \qquad 2.4$$

ซึ่งสำหรับระบบสารละลายเจือจาง (dilute solution) จะพบว่าค่าสัดส่วนเชิงโมลของตัวถูกละลายจะแปรผันตรงกับค่าความเข้มข้นของตัวถูกละลายนั้น ( $x_i \alpha C_i$ ) ดังนั้น

$$m_i = \frac{C_i^{(1)}}{C_i^{(2)}} \qquad 2.5$$

### 2.3.3 ปัจจัยการแยก ( Separation Factor)

เป็นตัวแปรที่สะท้อนถึงองค์ประกอบที่ภาวะสมดุล และเป็นค่าที่บอกถึงประสิทธิภาพในการแยกของกระบวนการนั้นในกรณีที่เป็นของเหลว-ของเหลว ค่าปัจจัยการแยกจะมีชื่อเรียกเฉพาะว่า ค่าสัมพันธ์การเลือก (relative selectivity, $\beta_{ij}$) ซึ่งนิยามดังสมการที่ 2.6

$$\beta_{ij} = \frac{\left(x_i^{(1)} / x_j^{(1)}\right)}{\left(x_i^{(2)} / x_j^{(2)}\right)} \qquad 2.6$$

การแยกจะให้ประสิทธิภาพดีก็ต่อเมื่อค่าปัจจัยการแยกมีค่ามากกว่า หรือต่ำกว่า 1 จาก สมการ 2.4 และ 2.6 สามารถเขียนได้ดังสมการที่ 2.7

$$\beta_{ij} = \frac{\left(x_i^{(1)} / x_j^{(1)}\right)}{\left(x_i^{(2)} / x_j^{(2)}\right)} = \frac{m_i}{m_j} \qquad 2.7$$

**2.4 การสกัดของเหลวด้วยของเหลว** ( liquid-liquid extraction)

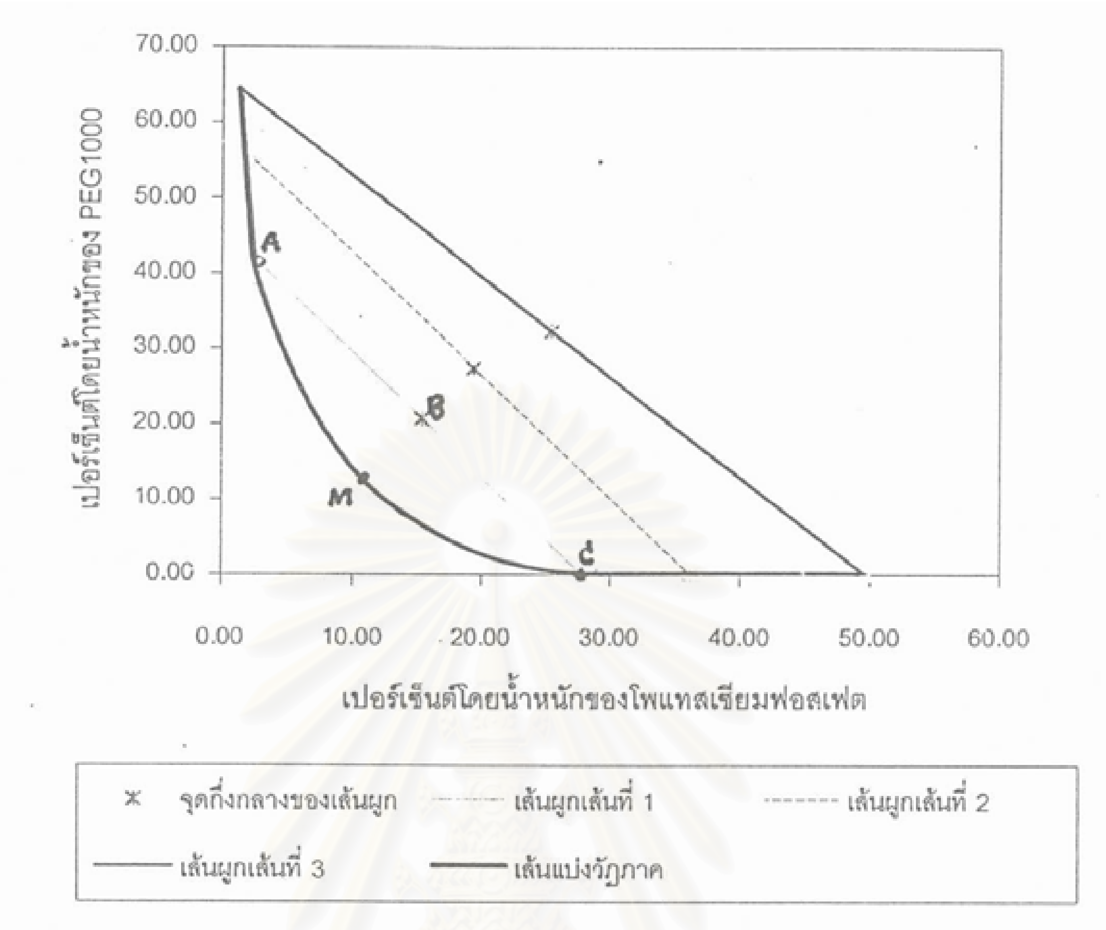
การสกัดของเหลวด้วยของเหลว เป็นการแยกตัวถูกละลาย (solute) ออกจากสารละลาย โดยนำมาสัมผัสกับตัวทำละลาย (solvent) ซึ่งควรมีคุณสมบัติไม่ผสมกับวัฏภาคสารละลายเป็นวัฏภาคเดียวกัน สามารถผสมกับตัวถูกละลายได้เพียงอย่างเดียว ดังนั้นตัวถูกละลายจึงถูกสกัดจากวัฏภาคของสารละลายไปสู่วัฏภาคของตัวทำละลาย โดยอาศัยคุณสมบัติทางเคมีของสารในระบบ การสกัดของเหลวด้วยของเหลวนิยมใช้ในกรณีที่ไม่สามารถสกัด หรือสกัดได้ไม่ดีด้วยการ กลั่น การระเหย การตกผลึก ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีต่อคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์

**2.4.1 ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค** ( Aqueous Two-Phase Systems, ATPS)

ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (ATPS) เป็นระบบหนึ่งของการสกัดของเหลวด้วยของเหลว ซึ่งเป็นที่รู้จักมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1896 มี 2 ระบบ คือระบบที่เป็นพอลิเมอร์ 2 ชนิด และอีกระบบ คือระบบที่เป็นพอลิเมอร์กับเกลือ โดยมีน้ำเป็นตัวทำละลายในทั้งสองวัฏภาค ดังนั้นจึงได้สารละลายน้ำสองวัฏภาคที่แยกชั้นกันอยู่เนื่องจากความแตกต่างกันทางกายภาพและเคมีของวัฏภาค โดยวัฏภาคที่หนึ่งจะจะประกอบด้วยพอลิเมอร์ชนิดหนึ่งอยู่มาก ส่วนพอลิเมอร์อีกชนิดหนึ่งหรือเกลือจะประกอบอยู่มากในวัฏภาคที่สอง จากความแตกต่างกันทางกายภาพและเคมีของวัฏภาคทำให้สามารถแยกตัวถูกละลายเป้าหมายออกจากสารละลายได้ เนื่องจากตัวถูกละลายแต่ละชนิดจะสามารถกระจายและละลายในแต่ละวัฏภาคได้แตกต่างกัน

**2.4.2 แผนภาพวัฏภาค** ( phase diagrams)

การเขียนแผนภาพวัฏภาค สามารถเขียนได้ 2 ลักษณะ คือ เขียนแบบสามเหลี่ยมด้านเท่าและเขียนแบบสามเหลี่ยมมุมฉาก ซึ่งการเขียนแบบหลังจะนิยมใช้มากกว่าแบบแรก โดยแกน y (แนวตั้ง) จะแสดงเปอร์เซนต์โดยน้ำหนักของพอลิเมอร์ที่มีมากในวัฏภาคบน ส่วนแกน x (แนวนอน) แสดงเปอร์เซนต์โดยน้ำหนักของพอลิเมอร์อีกชนิดหนึ่งหรือเกลือที่มีมากในวัฏภาคล่าง ดังนั้นทุกจุดบนแผนภาพวัฏภาคจะมีค่าโดยน้ำหนักเท่ากับ 100 เปอร์เซนต์เสมอ แผนภาพวัฏภาครูปแกนมุมฉาก จะไม่แสดงความเข้มข้นของตัวทำละลายน้ำ ซึ่งแตกต่างจากแผนภาพวัฏภาครูปสามเหลี่ยมด้านเท่า ในหัวข้อนี้จะแสดงองค์ประกอบของวัฏภาคเฉพาะแผนภาพแบบสามเหลี่ยมมุมฉาก ดังรูปที่ 2.1




รูปที่ 2.1 แผนภาพวัฏภาคของระบบ PEG 1000/โพแทสเซียมฟอสเฟต/น้ำ ความเป็นกรดด่าง 7.5 อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส และที่ความดันบรรยากาศ (นันทิญา, 2543)

กราฟเส้นโค้งที่แสดงในรูปที่ 2.1 เรียกว่า เส้นแบ่งวัฏภาค (binodal curve) ซึ่งเกิดจากการแยกวัฏภาคของพอลิเมอร์กับเกลือ ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารทั้งสองชนิด โดยจุดที่อยู่เหนือเส้นแบ่งวัฏภาค สารละลายจะมีลักษณะเป็นของเหลว 2 วัฏภาค ส่วนจุดที่อยู่ใต้เส้นแบ่งวัฏภาค สารละลายจะมีลักษณะเป็นของเหลววัฏภาคเดียว เส้นตรงที่เชื่อมระหว่างจุดบนเส้นแบ่งวัฏภาค เรียกว่า เส้นผูก (tie line) สารละลายผสมที่แสดงบนเส้นผูกเดียวกันจะมีองค์ประกอบในแต่ละวัฏภาคเท่ากัน แต่สัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่าง ($V_1/V_2$) จะแตกต่างกัน โดยสัดส่วนเชิงปริมาตรดังกล่าวจะมีความสัมพันธ์กับสัดส่วนของเส้นผูก (AB/BC) จุด M ที่อยู่บนเส้นแบ่ง วัฏภาคจะเรียกว่า จุดวิกฤติ (critical point) ซึ่งจะมีองค์ประกอบของทั้งสองวัฏภาคเท่ากัน

## 2.5 เครื่องมือแยกสารและวิธีการเลือกเครื่องมือแยกสารในระบบของเหลว-ของเหลว

การสกัดของเหลวด้วยของเหลวอย่างมีประสิทธิภาพนั้น นอกจากจะต้องเลือกและออกแบบเครื่องมือที่ใช้ในการสกัดให้เหมาะสมต่อระบบและสารที่ต้องการสกัดแล้วยังต้องคำนึงถึงภาวะในการดำเนินการสกัดด้วย ซึ่งได้แก่ อัตราการกวนของใบกวนหรือแรงกล (ในกรณีที่หอสกัดประกอบด้วยใบกวน) อัตราไหลของวัฏภาคกระจายตัว (disperse phase) และวัฏภาคต่อเนื่อง (continuous phase) และความเข้มข้นของตัวถูกละลาย และปัจจัยอื่นๆ ซึ่งขึ้นอยู่กับลักษณะของเครื่องมือที่ใช้แยกด้วย อย่างเช่นระยะห่างและความกว้างของวงแหวน (annular ring) ในกรณีที่หอสกัดประกอบด้วยวงแหวน เนื่องจากปัจจัยดังกล่าวจะส่งผลถึง ขนาดของหยด และ การกระจายขนาดของหยด (droplet size distribution) การกระจายในแนวนอน (axial dispersion) สัดส่วนวัฏภาคกระจายตัวที่มีในหอสกัด (hold-up) การรวมตัวของหยดที่บริเวณอินเตอร์เฟส (droplet coalescence at interfaces) ความจุสูงสุด (flooding point) และการถ่ายเทมวล (mass transfer) ดังนั้นปัจจัยต่างๆ เหล่านี้จึงเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องทำการศึกษาสำหรับการสกัดผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด โดยเฉพาะข้อมูลการถ่ายเทมวลเพราะเป็นข้อมูลที่มีความเฉพาะเจาะจงกับเครื่องแยกแต่ละชนิด

### 2.5.1 เครื่องมือแยกสาร

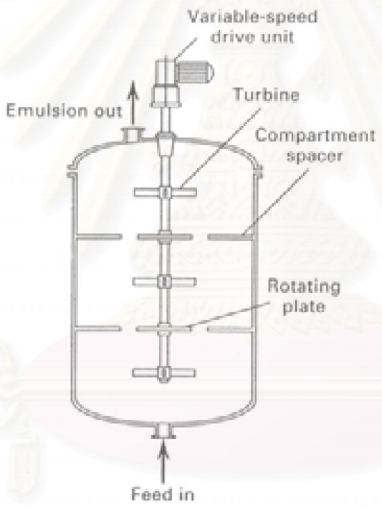
เครื่องมือแยกสาร สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ประเภทใหญ่ๆ คือ ชนิด mixer-settler , หอสกัดแบบไม่มีแรงกล (non mechanical column) หอสกัดแบบมีแรงกล (mechanical column) และเครื่องแยกแบบเหวี่ยง (centrifugal contactor) โดยเครื่องแยกแบบหอสกัดจะเป็นการดำเนินการแบบไหลสวนทางของวัฏภาคกระจายตัว (disperse phase) และวัฏภาคต่อเนื่อง (continuous phase) เนื่องจากเป็นลักษณะการไหลที่ให้ประสิทธิภาพการสกัดดีที่สุด

#### 2.5.1.1 แบบ mixer-settler

ของเหลวสองวัฏภาคจะผสมกันโดยการกวนและจะถูกแยกออกจากกัน โดยการปล่อยให้นอนก้น (settling) บางครั้งได้มีการนำ mixer-settler มาต่อกันแบบอนุกรม หรือไม่ก็ต่อแบบขนานโดยให้มีการไหลแบบสวนทางกันของของเหลวสองวัฏภาค หลักการของ mixer-settler คือของเหลวชนิดหนึ่งจะถูกทำให้กระจายตัวอยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่งโดยการปั่นกวนของใบพัด วัฏภาคที่ถูกทำให้กระจายตัวนั้นอาจจะเป็นวัฏภาคที่หนักกว่าหรือเบากว่าก็ได้ ลักษณะของถังกวน (Mixer) จะแสดงดังรูปที่ 2.2 และ settler ดังรูปที่ 2.3 และลักษณะของใบพัดที่ใช้จะขึ้นอยู่กับ

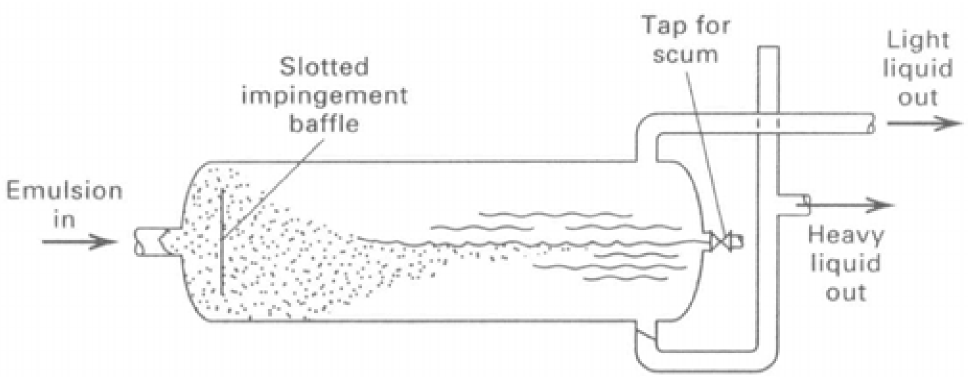
ลักษณะของของเหลวและความต้องการใช้งาน ซึ่งแสดงดังรูปที่ 2.4 ถ้าการกระจายตัวเกิดขึ้นได้ง่ายและการเข้าสู่สมดุลเกิดขึ้นได้เร็ว ส่วนใหญ่จะเกิดกับของเหลวที่มีแรงตึงผิวต่ำและความหนืดต่ำ การผสมจะเกิดขึ้นได้ในกระบวนการที่ง่าย เช่น ในท่อกวนผสม (jet mixer) การไหลอย่างปั่นป่วนในปลายกระบอกฉีด (nozzle mixer) หรือใน ปากท่อเล็ก (orifice mixer) หรือในเครื่องกวนผสมชนิดอื่นที่มีแรงเฉือน

การรวมกันเป็นสองวัฏภาค จะเกิดขึ้นเนื่องจากแรงโน้มถ่วงในถังใบที่สอง ซึ่งจะเรียกว่า settler หรือ ท่อในแนวนอน (decanter horizontal vessle) ดังรูปที่ 2.4 ซึ่งจะประกอบด้วย แผ่นกั้นที่ให้เกิดการกระทบ (impingement buffle) ทำหน้าที่ลดความเร็วของของเหลวสองวัฏภาคที่ผสมกันอยู่ เพื่อให้เกิดการแยกชั้นของวัฏภาคได้เร็วขึ้น

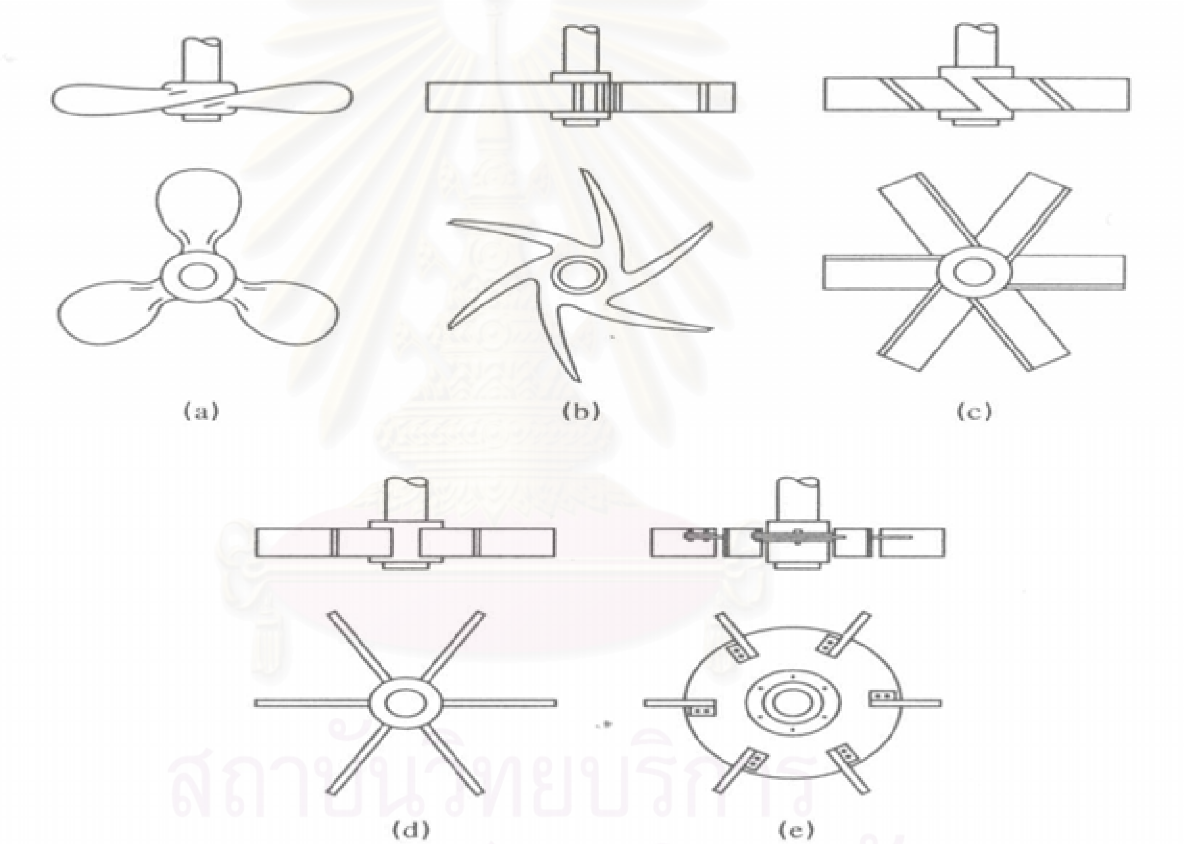



รูปที่ 2.2 เครื่องสกัดแบบ mixer (Seader และ Henley,1997)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




รูปที่ 2.3 ถัง settler (Seader และ Henley,1997)

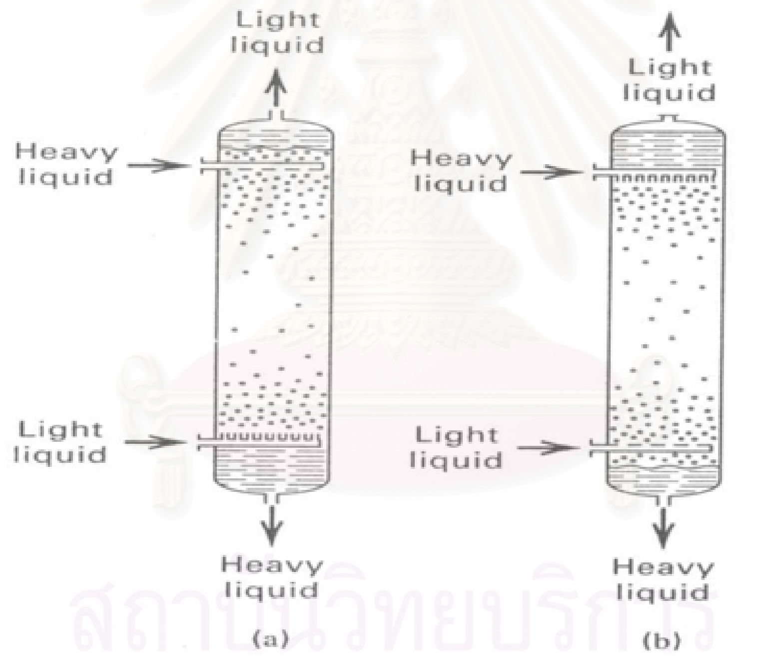



รูปที่ 2.4 ใบกวนลักษณะต่างๆ : (a) marine-type propeller ; (b) centrifugal turbine ; (c) pitched-blade turbine ; (d) flat-blade paddle ; (e) flat-blade turbine. (Seader และ Henley,1997)

### 2.5.1.2 **หอสกัดแบบไม่มีแรงกล**

- spray column

เป็นวิธีที่ง่ายและธรรมดาและเก่าแก่ที่สุดของการสกัด ของเหลวที่กระจายตัวจะเป็นวัฏภาคที่เบากว่าหรือหนักกว่าก็ได้ จะมีของเหลวเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่จะถูกฉีดเข้ามาโดยหัวฉีดพ่น (spray nozzle) ของเหลวอีกวัฏภาคหนึ่งจะออกแบบให้ผ่านช่องของเพลท (plate)ภายในหอสกัด ซึ่งโดยทั่วไปแล้วรูจะมีขนาดใหญ่ หอสกัดแบบ spray จะออกแบบให้อัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางต่อความยาวของหอสกัดมีค่ามาก เพื่อให้การสัมผัสกันของของเหลวเกิดขึ้นได้ดี




รูปที่2.5 แสดงหอสกัดแบบ spray column (Seader และ Henley,1997)

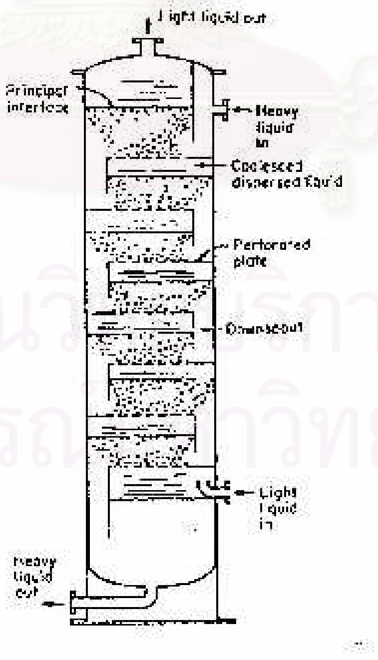
- packed column

การแพคเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการสัมผัส ทำให้การถ่ายเทมวลเกิดดีขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้หยดของเหลวที่มีขนาดใหญ่มีขนาดเล็กลง ซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการสัมผัสของของเหลวสองวัฏภาค วัสดุที่ใช้ในการแพคสามารถใช้ได้เหมือนกับวัสดุที่ใช้ในการแพคของหอกลั่น

(distillation column) หรือหอแบบดูดซับ (adsorption column) วัสดุที่ใช้แพคจะถูกทำให้เปียกโดยวัฏภาคต่อเนื่องก่อนเพื่อให้เกิดการถ่ายเทมวลทันทีเมื่อวัฏภาคกระจายตัวไหลเข้ามา

- plate column

ตะแกรงเพลท (sieve plate) ในหอสกัด จะช่วยลดการสัมผัสในแนวแกน นอกจากนี้อาจเพิ่มจำนวนเพลทในหอสกัดได้เพื่อทำให้การสัมผัสของของเหลวเพิ่มขึ้น วัฏภาคกระจายตัวอาจจะเป็นวัฏภาคที่เบาหรือหนักกว่าก็ได้ ในกรณีทั่วไปของเหลวที่ถูกทำให้กระจายตัวจะมีลักษณะคล้ายกับฟองของไอระเหย (vapor bubbles)ในหอกลั่น วัฏภาคที่หนักกว่าจะเป็นวัฏภาคต่อเนื่องจะไหลจากเพลทที่อยู่ด้านบนลงสู่เพลทที่อยู่ถัดลงมา แต่ถ้าวัฏภาคที่หนักกว่าเป็นตัวถูกทำให้กระจายตัว จะให้วัฏภาคที่เบากว่าเป็นวัฏภาคที่ไหลอย่างต่อเนื่องขึ้นไปตามแนวแกนตั้ง หอสกัดควรมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโตกว่า 4.5 เมตร และรูของตะแกรงเพลทควรมีเส้นผ่านศูนย์กลางยาว 0.32 ถึง 0.64 เซนติเมตร และระยะห่างระหว่างรูควรมีขนาด 1.75 ถึง 1.95 เซนติเมตร และ เพลทควรวางห่างกัน 10 ถึง 15 เซนติเมตร (Seader และ Henley,1997) เพลทโดยปกติจะเป็นแบบแผ่นราบไม่มีแผ่นกั้นในแนวตั้ง (weirs) แสดงดังรูปที่ 2.6




รูปที่ 2.6 แสดงหอสกัดแบบ plate column (Walas,1988)

### 2.5.1.3 **หอสกัดแบบที่มีแรงกลช่วยในการกวน**

ในกรณีที่แรงตึงผิวของของเหลวทั้งสองชนิดมีค่าสูง หรือ ความหนาแน่นของของเหลวมีค่าต่ำ หรือของเหลวมีความหนืดสูงมาก ต้องใช้แรงกลของการกวนเข้ามาช่วยให้เกิดการสัมผัสและลดแรงต้านของการถ่ายเทมวลของของเหลวทั้งสองวัฏภาค ซึ่งหอสกัดแบบที่มีแรงกลช่วยในการกวนหรือเพิ่มพื้นที่สัมผัสมีหลายชนิดดังนี้

1. pulsed column

เริ่มมีการใช้งานครั้งแรกในอุตสาหกรรมนิวเคลียร์ ในปี 1950 แต่ไม่ได้รับความนิยมในอุตสาหกรรมอื่น เนื่องจากปัญหาของเครื่องมือและยากที่จะพัฒนาให้พัลส์ ที่ไหลผ่านมีปริมาตรมากขึ้น ซึ่งหอสกัดแบบพัลส์ มี 2 แบบ คือแบบ pulsed packed column และ pulsed perforated plate column ซึ่งการพัลส์อย่างต่อเนื่องจะทำให้เกิดแรงเฉือน ทำให้หยดของวัฏภาคมีขนาดเล็กลง ทำให้การถ่ายเทมวลเกิดได้ดี ซึ่งโครงสร้างของหอสกัดมีลักษณะคล้ายกับ packed column และ plate column แต่จะมีการเพิ่มตัวกำเนิดหรือทำให้เกิดแรงพัลส์

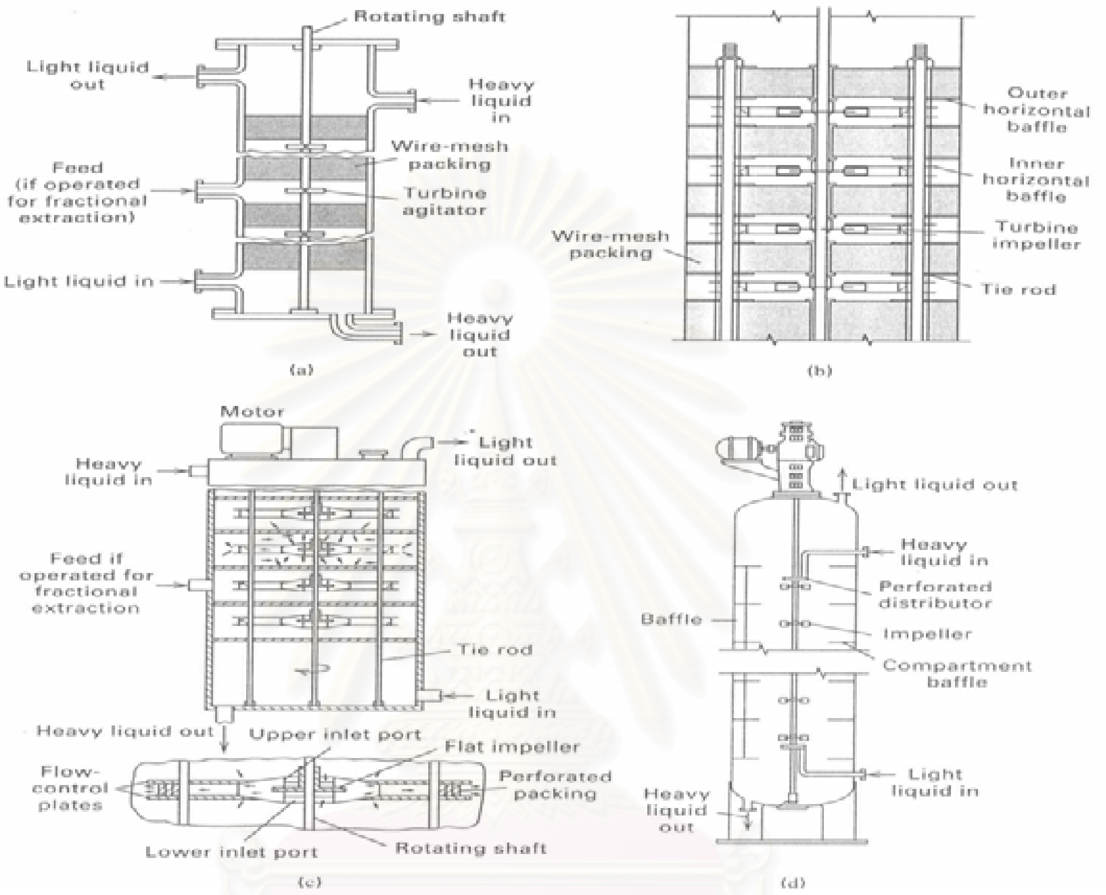
2. **เครื่องกวนโดยการหมุน** ( rotating agitators)

การผสมเกิดขึ้นจากแรงเฉือนของใบพัด และจะมีส่วนที่ทำหน้าที่เป็น mixer-settler อยู่ในหอสกัดเดียวกัน ซึ่งแสดงดังรูปที่ 2.7 ซึ่งหอสกัดลักษณะนี้ไม่จำเป็นต้องใช้ปั๊มพ์และมอเตอร์หลายตัว ใบพัดที่ใช้ในหอสกัดชนิดนี้แสดงดังรูปที่ 2.3

- Scheibel column

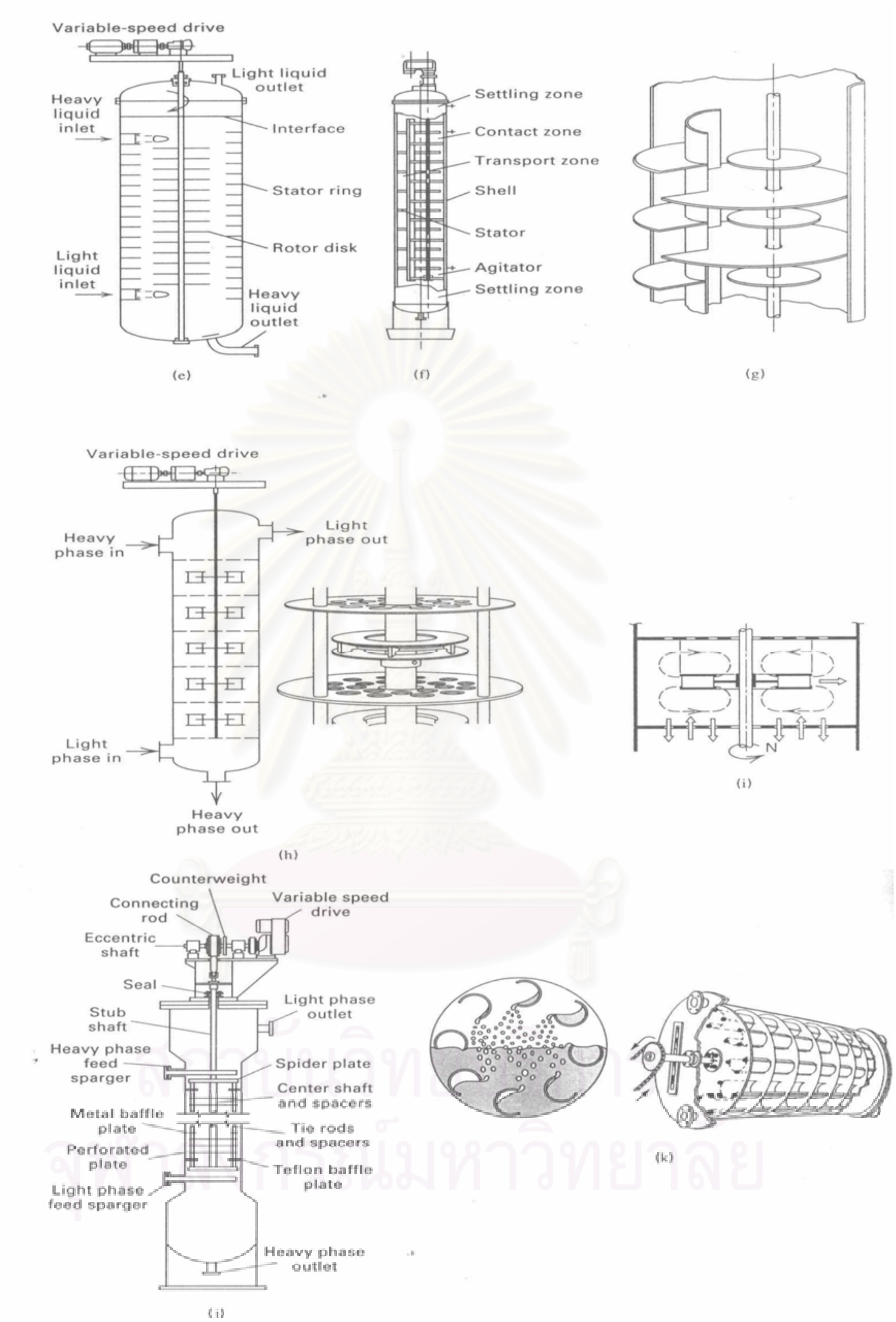
แสดงดังรูปที่ 2.7 (a) เป็นหอสกัดที่ให้ของเหลวไหลสวนทางกันโดยภายในหอสกัดไม่มีแผ่นกั้น (unbaffle) ใบพัดเป็นแบบ flat-blade turbine ดังแสดงในรูปที่ 2.4 หอสกัดลักษณะนี้จะมี wire mesh packing ใส่ไว้เพื่อป้องกันการย้อนกลับมาผสมของวัฏภาคในแนวแกน และยังทำให้เกิดการรวมตัวและการแยกตัวของหยดของเหลว วัสดุที่เป็น mesh จะถูกทำให้เปียกโดยวัฏภาคกระจายตัว ถ้าเป็นหอสกัดขนาดใหญ่ คือเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 1 เมตร จะใส่ baffle ทั้งด้านในและด้านนอก โดย baffle จะมีลักษณะเป็นวง เพื่อทำให้แนวการไหลเบนออกไปจากแนวเดิม ทำให้การสัมผัสกันของของเหลวดีขึ้น ดังรูปที่ 2.7 (b) ถ้าระบบมีแรงตึงผิว

และความหนืดสูงจะเอา wire mesh ออก ข้อเสียของวิธีนี้คือไม่สามารถนำตัวกวนออกมาล้างหรือทำความสะอาด รูปที่ 2.7 (c) เป็นการออกแบบเพื่อแก้ปัญหาข้างต้น โดยเส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัดมีขนาดเล็กกว่า baffle ด้านใน




รูปที่ 2.7 แสดง Scheibel column (a, b, c) และ Oldshue Rushton column (d) (Seader และ Henley,1997)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




รูปที่ 2.7 ( ต่อ ) แสดง RDC (e) ; ARDC (f) ; Kuhni column (h,i) ; Reciprocating plate column (j) ; Raining bucket (RTL) contactor (k) (Seader และ Henley, 1997)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- Oldshue – Rushton column

เป็นหอสกัดที่ปรากฏขึ้นในปี 1952 ใช้วงแหวนเป็นตัวแบ่งหอสกัดออกเป็นส่วนตามความยาวของหอสกัด โดยในแต่ละส่วนจะประกอบด้วยใบกวน แบบ 4 หรือ 6 bladed flat turbines ที่ติดอยู่กับแกนหมุน นอกจากนี้ในแต่ละส่วนยังประกอบด้วย baffle อีก 4 อันที่ติดอยู่ที่ผนังในแนวตั้ง ซึ่งหอสกัดชนิดนี้เป็นอีกชนิดหนึ่งที่แก้ปัญหาการกลับมาผสมกันของวัฏภาคในแนวแกน และเป็นหอสกัดที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัดมีขนาดเล็กกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของวงแหวน ดังนั้นจึงง่ายที่จะนำแกนใบพัดออกมาทำความสะอาดหรือซ่อมแซม ดังการคำนวณรัศมีวงแหวน ระยะห่างระหว่างวงแหวน และขนาดของใบพัด มีแนวทางการคำนวณดัง สมการ 2.8 (Thornton, 1992) แต่อย่างไรก็ตามรัศมีและระยะห่างของวงแหวนที่เหมาะสมต่อการสกัดจะได้จากการทดลองเท่านั้น

$$\begin{aligned} d_r/d_c &= 0.33-0.5 \\ d_s/d_c &= 0.35-0.55 \\ w_b/d_c &= 0.08 \\ h_c/d_c &= 0.4-0.6 \end{aligned} \qquad 2.8$$

- Rotating-disk contactor (RDC)

เป็นหอสกัดที่ปรากฏช่วงเดียวกับ Scheilbel และ Oldshue Rushton และสามารถใช้กับการสกัดของเหลว-ของเหลวได้อย่างกว้างขวางมากที่สุด ที่ผนังของหอสกัดจะประกอบไปด้วยวงแหวนมีลักษณะเหมือนกัน Oldshue Rushton โดยจะต่างกันตรงที่จะใช้จานหมุนแทนใบพัด ดังรูปที่ 2.7 (e) ดังนั้นการที่จะนำใบพัดออกมานอกหอสกัดจะทำได้ง่าย นอกจากนี้ความเร็วในการกวนของใบพัดยังเป็นตัวกำหนดขนาดของหยดของของเหลวภายในหอสกัดด้วย โดยมีแนวทางการคำนวณระยะห่างและรัศมีของวงแหวนดังนี้ (Thornton, 1992)

$$\begin{aligned} d_r/d_c &= 0.6 \\ d_s/d_c &= 0.7 \\ h_c &= 0.13 d_c^{0.67} \end{aligned} \qquad 2.9$$

- asymmetric rotating-disk contractor ( ARDC)

พัฒนามาจาก RDC ซึ่งมีการใช้งานในอุตสาหกรรมตั้งแต่ปี 1965 ดังรูปที่ 2.7 (f) จากรูปจะประกอบไปด้วยส่วนที่เป็น baffle และชุดของพัดที่มีลักษณะเป็นแผ่น จะเห็นลักษณะที่เป็น asymmetric ดังรูปที่ 2.7 (g) โดยมีส่วนที่สัมผัสกัน ของเหลวจะไหลไปยังส่วนที่ถ่ายเทมวลโดย baffle ที่วางอยู่แนวตั้ง ARDC ออกแบบให้ยังคงมีแรงเฉือนอยู่ แต่ลดการกลับมาผสมกันของของเหลว เพราะต้องการแยกส่วนที่เป็นการผสมและการนอนก้นออกจากกัน

- Kuhni column

เป็นหอสกัดที่สร้างขึ้นมาจากแนวความคิดคล้ายกับของ Scheibel ซึ่งแสดงดังรูปที่ 2.7 (h) หอสกัดจะมีลักษณะคล้ายกับหอสกัดแบบ perforated plate ซึ่งรูจะเป็นตัวที่ยอมให้มีการไหลในแนวแกนเกิดขึ้น และเพลทจะช่วยลดการกลับมาผสมของวัฏภาคในแนวแกน แต่จะต่างกันตรงที่จะมีใบพัดไปอยู่ระหว่างเพลท ซึ่งใบพัดที่ใช้ เป็นแบบ shrouded turbine ซึ่งเป็นใบพัดที่ให้การผสมในแนวนอนเกิดขึ้นได้มาก รูปที่ 2.7 (i) แสดงการไหลเวียนของของเหลว หอสกัดชนิดนี้จะมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 3 เมตร ซึ่งการขยายขนาดทำได้โดยใช้แกนของใบพัด 3 แกนมาต่อขนานกัน การคำนวณระยะห่างของเพลท และพื้นที่ที่ยอมให้เกิดการให้ผ่านของของเหลว มีแนวทางคำนวณดังนี้ (Thornton, 1992)

$$d_r/d_c = 0.33 - 0.5$$

$$h_c = 0.2 - 0.3d_c^{0.6} \qquad 2.10$$

stator free area = 20-40 เปอร์เซนต์

- Reciprocating plate column

มีลักษณะคล้าย Pulsed column โดยหอสกัดแบบนี้จะให้การเคลื่อนที่ขึ้นลงของเพลทเป็นตัวให้แรงกลแก่ระบบ และรูของเพลทจะเป็นทางไหลผ่านของวัฏภาคในแนวแกน ซึ่งรูขนาดใหญ่จะยอมให้วัฏภาคต่อเนื่องไหลผ่าน และรูขนาดเล็กสำหรับวัฏภาคกระจายตัว ดังแสดงในรูปที่ 2.7 (j) ซึ่งการถ่ายเทมวลจะเกิดขึ้นได้ดีหรือไม่จะขึ้นอยู่กับความถี่และระยะทางในการเคลื่อนที่ขึ้นลงของเพลทและการย้อนกลับมาผสมของวัฏภาคระหว่างกระบวนการ

- Raining bucket contactor (RTL)

บางครั้งเรียกหอสกัดชนิดนี้ว่า Graesser ตามชื่อผู้ออกแบบ ใช้กับการสกัดที่ของเหลวมีความหนาแน่นต่างกันน้อยและมีแรงตึงผิวต่ำ และชอบที่จะอยู่ในรูปของ emulsion ดังรูปที่ 2.7 (k) ประกอบด้วยแผ่นจาน ที่ต่อกันแบบอนุกรมเป็นชั้นๆ และแกนหมุนจะอยู่ตรงกลางรูของแผ่นจานดังรูป แต่ละอันจะประกอบไปด้วย C-shaped bucket ซึ่งติดอยู่รอบๆ แผ่นจาน

### 2.5.2 วิธีเลือกเครื่องมือแยกสาร

การเลือกชนิดของเครื่องมือแยกสารมีความสำคัญอย่างมาก เพราะต้องเลือกเครื่องมือแยกสารที่มีความเหมาะสมกับระบบและสารที่ต้องการสกัด และให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงสุด ซึ่งจากการค้นคว้าของผู้ทำวิจัยพบว่า Thornton (1992) ได้แนะนำหลักการเลือกชนิดของเครื่องมือแยกสารไว้ละเอียดที่สุด ดังตารางที่ 2.1 ซึ่งจะกล่าวในหัวข้อนี้

#### 2.5.2.1 **ปริมาตรไหลผ่าน**

ปริมาตรไหลผ่านทั้งหมดคืออัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวกับวัฏภาคต่อเนื่องรวมกัน จากตารางที่ 2.1 พบว่าปริมาตรไหลผ่านที่มีค่าน้อยที่สุดคือ มีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.25 ลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมง ซึ่งเป็นปริมาตรไหลผ่านที่พบในหอสกัดที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร หรือ พบในหอสกัดที่มีขนาดเล็กกว่าหอสกัดที่ใช้ในห้องทดลองขนาดใหญ่ หรือ ใน pilot scale ขนาดเล็ก ส่วนปริมาตรไหลผ่านที่มีค่ามากที่สุด คือประมาณ 250 ลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงของปริมาตรไหลผ่านที่พบว่ามีการใช้อยู่ในอุตสาหกรรมเคมี และ อุตสาหกรรมปิโตรเลียมทั่วไป

#### 2.5.2.2 **จำนวนขั้นตอนสมดุล** (Number of theoretical stages, NTS)

จำนวนขั้นตอนสมดุลเป็นพารามิเตอร์ที่มีความสำคัญสำหรับการกำหนดความสูงของหอสกัด โดยการเพิ่มความสูงของหอเป็นการเพิ่มการทำงานของหอสกัด ซึ่งจะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ออกจากหอสกัดมีความบริสุทธิ์มากขึ้นเมื่อจำนวนขั้นตอนสมดุลมากขึ้น และหอสกัด

ตาราง 2.1 แสดงข้อมูลและ วิธีการเลือกหอสกัด

| Design requirements | A. Gravity-separated extractors | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | a. Continuous contact | | | | | b. Discontinuous contact no interstage settling | | | | |
| | 1. Non-mechanical | | | 2. Mechanical | | 1. Rotary agitated | | | 2. Reciprocating | |
| Ref. No. / Description | Aa1(i) Spray | Aa1(ii) Baffle-plate | Aa1(iii) Packed | Aa2(i) Pulsed packed | Aa2(ii) Raining bucket (RTL) | Ab1(i) Rotary disc | Ab1(ii) Multi-impeller | Ab1(iii) Kühni | Ab2(i) Pulsed plate | Ab2(ii) Reciprocating plate |
| 1 Total throughputs: | | | | | | | | | | |
| ≤0.25 m³/h | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 0.25–2.5 " | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 2.5–25 " | S | P | S | S | P/D | S | S | S | S | S |
| 25–250 " | S | D | S | S | U | S | S | S | D | P |
| >250 " | S | U | S | P | U | P | P | P | U | D |
| 2 NTS: | | | | | | | | | | |
| ≤1.0 | E[1] | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 1–5 | D[1] | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 5–10 | U | P | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 10–15 | U | U | P | P | P | P | P | P | P | P |
| >15 | U | D | P | P | D | D | D | D | U | D |
| 3 Physical Properties: | | | | | | | | | | |
| (a) $(\gamma/\Delta\rho g)^{1/2} \geq 0.60$ | P | P | P | S | P | S | S | S | S | S |
| (b) $50 \geq \Delta\rho \geq 30$ kg/m³ | S | P | S | U | P | U | U | U | U | U |
| (c) $\mu_c$ and/or $\mu_d > 0.02$ Pa s | D | D | D | D | D | D | D | D | D | D |
| 4 Slow heterogeneous reaction: $k \leq 4 \times 10^{-7}$ m/s | U | D | P | S | D | P | S | S | S | S |

| Design requirements | A. Gravity-separated extractors | | | | | | | | B. Centrifugally separated extractors | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | c. Discontinuous contact, with interstage settling | | | | | | | | a. Continuous contact | | b. Mixer-settler | |
| | 1. Partial | | 2. Total | | 3. Mixer-settlers: Horizontal | | 3. Mixer-settlers: Vertical | | | | | |
| Ref. No. / Description | Ac1(i) Scheibel | Ac1(ii) Asymmetric RDC | Ac2(i) Perforated plate | Ac2(ii) Rotary film | Ac3(i) Pump-settler | Ac3(ii) Mixer-settler | Ac3(iii) Pump-settler | Ac3(iv) Mixer-settler | Ba(i) Perforated plate | Ba(ii) Film flow | Bb(i) Multistage | Bb(ii) Single-stage |
| 1 Total throughputs: | | | | | | | | | | | | |
| ≤0.25 m³/h | S | P | S | D | U | S | U | S | U | U | U | U |
| 0.25–2.5 " | S | S | S | S | P | S | P | S | P | P | P | P |
| 2.5–25 " | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 25–250 " | D | S | S | P | S | S | P | P | P | D[1] | P[1] | P[4] |
| >250 " | U | P | S | D | E | E | D | D | U[1] | U[1] | U[1] | U[1] |
| 2 NTS: | | | | | | | | | | | | |
| ≤1.0 | S | S | S | S | S | S | S | S | — | — | — | S |
| 1–5 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 5–10 | S | S | S | S | S | S | S | S | P[1] | P[1] | P[1,2] | S |
| 10–15 | P | P | P | P | S | S | P | P | U[1] | U[1] | U[1,2] | S |
| >15 | D | D | D | D | S | S | D | D | U[1] | U[1] | U[1,2] | S |
| 3 Physical Properties: | | | | | | | | | | | | |
| (a) $(\gamma/\Delta\rho g)^{1/2} \geq 0.60$ | S | S | P | P | S | S | S | S | E | E | E | E |
| (b) $50 \geq \Delta\rho \geq 30$ kg/m³ | U | U | D | D | D | D | D | D | E | E | E | E |
| (c) $\mu_c$ and/or $\mu_d > 0.02$ Pa s | D | D | D | D | D | D | D | D | D | D | D | D |
| 4 Slow heterogeneous reaction: $k \leq 4 \times 10^{-7}$ m/s | S | S | D | D | U | S | U | S | S | S | S | S |

ที่มา : Thornton เล่ม 1 (1992)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง 2.1 (ต่อ) แสดงข้อมูลและ วิธีการเลือกหอสกัด

| Design requirements | A. Gravity-separated extractors | | | | | | | | | | | | | | | | | | B. Centrifugally-separated extractors | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | a. Continuous contact | | | | | b. Discontinuous contact no interstage settling | | | | | c. Discontinuous contact, with interstage settling | | | | | | | | a. Continuous contact | | b. Mixer-settler | |
| | 1. Non-mechanical | | | 2. Mechanical | | 1. Rotary agitated | | | 2. Reciprocating | | 1. Partial | | 2. Total | | 3. Mixer-settlers: Horizontal | | 3. Mixer-settlers: Vertical | | | | | |
| Ref. No. / Description | Aa1(i) Spray | Aa1(ii) Baffle-plate | Aa1(iii) Packed | Aa2(i) Pulsed packed | Aa2(ii) Rotating bucket (RTL) | Ab1(i) Rotary disc | Ab1(ii) Multi-impeller | Ab1(iii) Kühni | Ab2(i) Pulsed plate | Ab2(ii) Reciprocating plate | Ac1(i) Scheibel | Ac1(ii) Asymmetric RDC | Ac2(i) Perforated plate | Ac2(ii) Rotary film | Ac3(i) Pump-settler | Ac3(ii) Mixer-settler | Ac3(iii) Pump-settler | Ac3(iv) Mixer-settler | Ba(i) Perforated plate | Ba(ii) Film flow | Bb(i) Multi-stage | Bb(ii) Single-stage |
| 5 Slow homogeneous reaction: $t_{1/2}$ = 30 — 300 s | D | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | S | E | S | S | U | U | P | P |
| > 300 s | U | U | U | U | D | U | U | U | U | U | U | U | D | D | P | E | S | S | U | U | U | U |
| 6 Extreme phase ratio: $F_d/F_c$ < 0.2 or > 5 | S | P | P | P | E | P | P | P | P | P | P | P | S | S | D | E[1] | D | E[1] | S | S | S | S |
| 7 Short residence time | U | U | U | D | U | D | D | D | D | D | U | U | U | U | U | U | U | U | E | E | S | S |
| 8 Ability to handle solids: Trace | S | S | P | P | E | S | S | S | S | S | P | E | P | E | S | S | S | S | D | D | P | P |
| Appreciable | P | P | D | D | P | P | P | P | P | P | U | D | U | E | D | P | P | D | D | D | P | P |
| Heavy | D | D | D | U | D | D | D | D | U | D | U | U | U | E | U | U | U | D | U | U | D | D |
| 9 Tendency to emulsify: Slight | S | S | P | U | S | P | D | D | P | P | D | P | P | P | D | D | D | D | E | E | E | E |
| Marked | P | P | D | U | P | D | U | U | U | U | U | U | D | P | U | U | U | U | S | S | S | S |
| 10 Space limitation: Height | U | D | D | D | E | D | D | D | D | D | D | D | D | E | E | E | U | U | E | E | E | E |
| Floor area | E | E | E | E | U | E | E | E | E | E | E | E | E | U | U | U | E | E | U | U | E | E |
| 11 Special materials required: Metals (SS, Ti, etc) | E | S | E | E | P | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| Non-metals | E | S | E | P | D | D | D | D | D | D | D | D | P | P | P | S | P | D | U | U | U | U |

ที่มา : Thornton  เล่ม 1 (1992)

ตาราง 2.1 (ต่อ) แสดงข้อมูลและ วิธีการเลือกหอสกัด

| Design requirements | | A. Gravity-separated extractors | | | | | | | | | | | | | | | | | | B. Centrifugally-separated extractors | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | a. Continuous contact | | | | | b. Discontinuous contact no interstage settling | | | | | c. Discontinuous contact, with interstage settling | | | | | | | | a. Continuous contact | | b. Mixer-settler | |
| | | 1. Non-mechanical | | | 2. Mechanical | | 1. Rotary agitated | | | 2. Reciprocating | | 1. Partial | | 2. Total | | 3. Mixer-settlers | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | Horizontal | | Vertical | | | | | |
| Ref. No. | Description | Aa1(i) Spray | Aa1(ii) Baffle-plate | Aa1(iii) Packed | Aa2(i) Pulsed packed | Aa2(ii) Rotating basket (RTL) | Ab1(i) Rotary disc | Ab1(ii) Multi-impeller | Ab1(iii) Kühni | Ab2(i) Pulsed plate | Ab2(ii) Reciprocating plate | Ac1(i) Scheibel | Ac1(ii) Asymmetric RDC | Ac2(i) Perforated plate | Ac2(ii) Rotary film | Ac3(i) Pump-settler | Ac3(ii) Mixer-settler | Ac3(iii) Pump-settler | Ac3(iv) Mixer-settler | Ba(i) Perforated plate | Ba(ii) Film flow | Bb(i) Multistage | Bb(ii) Single-stage |
| 12 | Radioactivity present: | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Weak α, β | E | E | E | S | D | D | D | D | E | D | D | D | S | P | D | E | D | S | D | D | D | S |
| | Strong α, β and/or γ[8] | F | E | E | S | U | U | U | U | E | U | U | U | D | D | U | E[4] | U | D | U | U | D[4] | S |
| 13 | Ease of cleaning | E | S | P | P | P | S | S | P | S | S | D | P | P | S | S | S | S | S | D | P | P | P |
| 14 | Low maintenance | E | E | E | S | P | S | S | S | S | S | P | P | S | S | P | P | P | P | D | D | D | D |
| 15 | Solvent properties | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Volatile | E | E | E | S | P | P | P | P | S | S | P | P | E | P | P | P | P | P | S | S | S | S |
| | Flammable | E | E | E | S[7] | P[7] | P[7] | P[7] | P[7] | S[7] | S[7] | P[7] | P[7] | E | D[7] | D[7] | D[7] | D[7] | D[7] | P[7] | P[7] | P[7] | F |

Key to ratings:

U = unsuitable
D = doubtful; requires detailed study
P = possibly useable, subject to careful consideration
S = suitable
E = excellent

Notes

1. Multiple series and/or parallel units can be used.
2. Maximum of three stages per machine (Luwesta).
3. For immeasurably fast homogeneous reactions.
4. For diameters ≤ 150 mm.
5. With recirculation of separated phases.
6. Requires provision for solids removal from settlers.
7. Flameproof drives required.
8. With appropriate shielding and (if required) motor drives external to this.

ที่มา : Thornton เล่ม 1 (1992)

แต่ละชนิดจะมีค่าของจำนวนขั้นตอนสมดุลที่เหมาะสมแตกต่างกัน ดังนั้นจากตารางที่ 2.1 จะเห็นว่าจำนวนขั้นตอนสมดุลจะมีอิทธิพลต่อการเลือกชนิดของหอสกัด

2.5.2.3 **คุณสมบัติทางกายภาพของระบบ** (physical properties of system)

คุณสมบัติทางกายภาพของระบบจะมีอิทธิพลต่อการถ่ายเทมวลภายในคอลัมน์ ดังนั้นจึงควรเลือกชนิดของหอสกัดให้เหมาะสมกับระบบที่ใช้ในการสกัด ซึ่งจะมีอิทธิพลต่อการออกแบบความสูงของหอสกัดและคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่ได้ เช่น หอสกัดแบบฉีดพ่นจะมีการถ่ายเทมวลภายในหอสกัดไม่ดีนัก เนื่องจากไม่มีแรงกลในการช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างของเหลว ดังนั้นจึงควรเลือกระบบที่มีแรงต้านในการถ่ายเทมวลน้อย เช่น แรงตึงผิวระหว่างวัฏภาคควรจะมีค่าน้อยเป็นต้น

- คุณสมบัติทางกายภาพทั่วไป คือ พารามิเตอร์ $(\gamma/\Delta\rho g)^{1/2}$ ซึ่งจะมีอิทธิพลต่อขนาดของหยด โดยค่าที่มีมากกว่า 0.6 สำหรับหอสกัดที่ไม่มีแรงกลภายในหอสกัดจะทำให้หยดของเหลวมีขนาดใหญ่และประสิทธิภาพของหอสกัดจะต่ำ ส่วนหอสกัดที่มีแรงกลเข้ามาช่วยสามารถแก้ปัญหานี้ได้โดยการเพิ่มกำลังของแรงกล ซึ่งจะทำให้ขนาดของหยดเล็กลง ซึ่ง Thornton (1992) ได้อ้างไว้ว่า Gayler และ Pratt (1953) ได้เสนอความสัมพันธ์ขนาดของหยด วัฏภาคกระจายตัวและพารามิเตอร์ $(\gamma/\Delta\rho g)^{1/2}$ สำหรับหอสกัดแบบแพค ไว้ดังนี้

$$d_{32} = 0.92(\gamma/\Delta\rho g)^{1/2} \qquad 2.11$$

- ความแตกต่างของความหนาแน่น การแยกของวัฏภาคจะช้าและการควบคุมระดับของการสัมผัสของ 2 วัฏภาคจะยาก เมื่อความแตกต่างของความหนาแน่นของ 2 วัฏภาค อยู่ในช่วง 30-50 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร ถ้ามีค่าต่ำกว่า 30 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร จะเหมาะกับเครื่องสกัดแบบเหวี่ยง

- ความหนืด ถ้าความหนืดของวัฏภาคใดวัฏภาคหนึ่ง หรือ ทั้ง 2 วัฏภาคมีค่ามากกว่า 20 cp จะมีอิทธิพลอย่างมากต่อประสิทธิภาพและภาวะในการทำงานของหอสกัด ซึ่งได้แก่ ความเร็วในการกวน และความเร็วในการไหลของวัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่อง เนื่องจากถ้าระบบที่มีความหนืดสูง จะต้องให้ความเร็วในการกวนมีค่าสูงตามไปด้วย เพื่อจะทำให้

พื้นที่ในการสัมผัสของของเหลวมีค่าสูง อย่างไรก็ตามไม่มีหลักการทั่วไปที่ใช้ในการทำนายการดำเนินการในกรณีที่ความหนืดมีค่ามากกว่า 20 cp ซึ่งส่วนมากจะต้องศึกษาจากการทดลอง

2.5.2.4 **สัดส่วนของความเร็วในการไหลของวัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่อง** (Extreme phase ratio)

ถ้าสัดส่วนของความเร็วในการไหลของวัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่องมีค่าต่ำ จะทำให้ hold–up ของวัฏภาคกระจายตัวและพื้นที่ผิวสัมผัสของวัฏภาคมีค่าต่ำ ในทางกลับกันถ้าอัตราส่วนการไหลมีค่ามากจะทำให้วัฏภาคที่ไหลต่อเนื่องจะมีการกลับมาผสม (backmixing) มากขึ้น ซึ่งจากกรณีทั้งสองจะมีอิทธิพลต่อการถ่ายเทมวลภายในหอสกัด ดังนั้นจึงส่งผลต่อประสิทธิภาพและการทำงานของหอสกัด

2.5.2.5 Short residence time

ในบางระบบต้องการให้ตัวถูกละลายใช้เวลาอยู่ในหอสกัดน้อยที่สุด เช่น การสกัดเพนนิซิลิน (penicillin) ซึ่งต้องการเวลาในการสัมผัสน้อยที่สุดเพื่อหลีกเลี่ยงการสูญเสียมูลค่าของผลิตภัณฑ์ ดังนั้นเครื่องสกัดแบบ centrifuge จึงเป็นที่นิยมที่สุดในกรณีนี้ และกรณีอื่นๆ ก็ขึ้นอยู่กับการประมาณเวลาที่ตัวถูกละลายอยู่ในแต่ละขั้นตอนของหอสกัด

2.5.2.6 **ความสามารถในการรองรับอนุภาคของแข็ง** (Ability to handle solids)

เครื่องมือสกัดบางชนิดจะอุดตันเนื่องจากของแข็ง ดังนั้นจึงต้องรื้อมาทำความสะอาด ยกเว้น หอสกัดแบบ rotary agitated pulse และ reciprocating ซึ่งเป็นเครื่องมือที่สามารถใช้ได้กับระบบที่มีของแข็งได้มากพอสมควร มีเครื่องมือเพียงชนิดเดียวที่สามารถใช้กับระบบที่มีของแข็งมากๆได้ คือ rotary film สำหรับในกรณีที่ต้องการเอาของแข็งออก ก็สามารถใช้ได้กับเครื่อง Raining bucket

2.5.2.7 **ความสามารถในการเกิดอิมัลชั่น** (Tendency to emulsify)

หอสกัดแบบไม่มีแรงกล Raining bucket และ rotary film จะเป็นเครื่องมือที่เหมาะต่อระบบที่มีแนวโน้มจะเป็นอิมัลชันได้เพียงเล็กน้อย เครื่องสกัดแบบ centrifuge เป็นหอสกัดแบบที่มีแรงกลที่เหมาะสมกับระบบที่เป็นอิมัลชั่นและได้รับความนิยมที่สุด

2.5.2.8 **ข้อจำกัดในพื้นที่** (Limitation of space)

สำหรับกรณีที่มีข้อจำกัดในเรื่องความสูงของพื้นที่ในการติดตั้งเครื่องสกัด จะทำให้เครื่องสกัดแบบหอสกัดทุกชนิดไม่เหมาะสมการใช้งาน ซึ่งถ้ามีข้อจำกัดในกรณีนี้เครื่องสกัด แบบ mixer-settler และ centrifugal จะเหมาะสมที่สุด แต่ถ้ากรณีที่มีข้อจำกัดในเรื่องพื้นที่ที่ใช้เป็นฐานของเครื่องสกัด mixer-settler และ raining bucket จะไม่เหมาะสมต่อข้อจำกัดนี้ เนื่องจากต้องการพื้นที่ในการติดตั้งมาก

2.5.2.9 **ความต้องการวัสดุชนิดพิเศษสำหรับการออกแบบ** (Special material of construction required)

การเลือกวัสดุที่เหมาะสมในการสร้างเครื่องมือสกัดหรือหอสกัดจะมีความสำคัญเมื่อวัสดุมีการผุกร่อนเนื่องจากผลิตภัณฑ์หรือชนิดของของเหลว ซึ่งวัสดุที่ใช้ทำเครื่องสกัดมีสองแบบ คือ แบบที่เป็นโลหะหรือโลหะผสม เช่น สแตนเลสและแบบที่ไม่ใช่โลหะ เช่น ยาง พลาสติก วัสดุที่ไม่ใช่โลหะไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ทำหอสกัดแบบที่มีแรงกล และไม่เหมาะที่จะใช้ทำแกนใบพัด

2.5.2.10 **ความสะดวกในการทำความสะอาด** (Ease of cleaning)

เป็นหัวข้อที่ใช้เลือกเครื่องมือสกัดสำหรับการแยกของแข็งออกจากระบบ เนื่องจากระบบที่มีของแข็งมักจะต้องทำความสะอาดเครื่องมือบ่อยครั้ง

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**2.5.2.11 การบำรุงรักษา** (Low maintenance)

การบำรุงรักษาจะทำได้ง่ายกับหอสกัดที่สามารถถอด หรือแยกส่วนประกอบภายในหอสกัดออกได้ และจะมีมูลค่าในการบำรุงรักษาต่ำเมื่อเลือกใช้วัสดุที่เหมาะสมกับระบบ

**2.5.212 คุณสมบัติของตัวทำละลาย** (Solvent properties)

ส่วนใหญ่การใช้งานของการสกัดของเหลวด้วยของเหลว จะเกี่ยวข้องกับตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ซึ่งบางครั้งจะเกิดการระเหยของตัวทำละลาย และจะเป็นอันตรายถ้าตัวทำละลายสามารถติดไฟได้ง่าย ในกรณีนี้ทำให้ต้นทุนในการใช้ตัวทำละลายทดแทนมีค่าสูง ซึ่งในกรณีนี้ต้องการหอสกัดที่มีการปล่อยสารออกแค่เพียงทางเดียว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 3

## ตรวจเอกสาร

### 3.1 ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกเอนไซม์

ค่าสัมประสิทธิ์การแยก (partition coefficient) เป็นค่าคงที่ที่แสดงถึงประสิทธิภาพในการแยกเอนไซม์ หรือโปรตีน ที่ต้องการในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ซึ่งนิยามดังสมการที่ 3.1 โดยมีปัจจัยหลายประการที่ส่งผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก ไม่ว่าจะเป็นทั้งทางตรงหรือทางอ้อม บางปัจจัยจะส่งผลต่อคุณสมบัติของเอนไซม์หรือโปรตีนที่ต้องการแยกและบางปัจจัยจะส่งผลต่อคุณสมบัติของสารที่เป็นองค์ประกอบของระบบ ซึ่งจะส่งผลให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกแตกต่างกันออกไป โดยสามารถอธิบายได้ด้วยสมการ Bronstedt (สมการ 3.2, Kula และ คณะ 1982; Cabral และ Aires-barros,1993)

$$m = \frac{C_i^1}{C_i^2} \qquad 3.1$$

และ

$$m = e^{\left(\frac{\eta M}{KT}\right)} \qquad 3.2$$

จากสมการ Bronstedt จะเห็นว่า ค่าสัมประสิทธิ์การแยกเป็นฟังก์ชันขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของตัวถูกละลาย อุณหภูมิของระบบและปัจจัยที่กำหนดลักษณะของวัฏภาคและแรงกระทำที่วัฏภาคมีต่อตัวถูกละลาย อย่างไรก็ตามเป็นการยากที่จะสามารถเลือกหรือคำนวณภาวะในการแยกที่เหมาะสม และเป็นการยากที่จะเข้าใจและอธิบายถึงพฤติกรรมในการแยกของเอนไซม์หรือโปรตีนแต่ละชนิดที่ต้องการแยกในระบบสารละลายน้ำวัฏภาคที่แตกต่างกัน เนื่องจากปัจจัยในการแยกมีความเกี่ยวเนื่องและมีอิทธิพลต่อกัน ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกจึงหาได้จากการทดลองเท่านั้น เนื่องจากงานวิจัยนี้ต้องการแยกแอลคาไลน์โพรทีเอส (ขนาด 27,000 Da) ที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นจากสมการ Bronstedt จะเห็นว่า $\eta$ เป็นเพียงพารามิเตอร์เดียวที่มีผลต่อการแยกแอลคาไลน์โพรทีเอส ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อค่า $\eta$ ซึ่งได้แก่ ชนิดและน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ที่เกิดเป็นวัฏภาค ชนิดและความเข้มข้นของเกลือ แรงไอออนิก และค่าความเป็นกรด-ด่างซึ่งมีผล

ต่อองค์ประกอบของระบบ และจากที่งานวิจัยนี้เป็นงานที่ศึกษาภาวะการแยกแอลคาไลน์โพรทีเอส ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ PEG 1000 และโพแทสเซียมฟอสเฟต ที่ต่อเนื่องมาจากงานวิจัยของนันทิญา (2543) ซึ่งนันทิญาพบว่าการเติมโซเดียมคลอไรด์ไม่ทำให้การแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอสดีขึ้น ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาเพียงอิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีผลต่อองค์ประกอบของระบบที่ส่งผลต่อ $\eta$ เพียงอิทธิพลเดียว แต่อย่างไรก็ตามในบางงานวิจัย (Papamichael และ คณะ,1991 ; Schemidt และคณะ, 1996 ;Sebastiao และคณะ, 1996) พบว่าปริมาณโปรตีนหรือเอนไซม์ที่เติมในระบบในปริมาณที่แตกต่างกันจะทำให้องค์ประกอบหรือแรงกระทำระหว่างโมเลกุลกับระบบเปลี่ยน ซึ่งจะมีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์ชนิดนั้นๆ นอกจากนี้ Hotha และ Banik (1997) พบว่าสัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างบนเส้นผูกเดียวกันให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกต่างกัน ดังนั้นบทนี้จะกล่าวถึงปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกซึ่งได้แก่ อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณของเอนไซม์หรือโปรตีนรวมเริ่มต้น สัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่าง แม้ว่างานวิจัยนี้ไม่ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ แต่อย่างไรก็ตามในน้ำหมักมีเอนไซม์และโปรตีนอยู่หลายชนิด ซึ่งทำให้การแยกของเอนไซม์และตัวถูกละลายอื่นที่ละลายอยู่ในน้ำหมักในระบบและภาวะเดียวกันมีค่าแตกต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ต้องการแยก ดังนั้นจึงจะกล่าวถึงในบทนี้ด้วย

### 3.1.1 ความเป็นกรด-ด่างของระบบ

เนื่องจากงานวิจัยนี้ศึกษาอิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีผลต่อการแยกแอลคาไลน์โพรทีเอสในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในกรณีที่เป็นพอลิเมอร์กับเกลือ ดังนั้นจึงจะกล่าวถึงเฉพาะงานวิจัยที่ศึกษาอิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีผลต่อการแยกเอนไซม์หรือโปรตีนในระบบพอลิเมอร์กับเกลือเท่านั้น

ค่าความเป็นกรด-ด่างจะมีอิทธิพลต่อคุณสมบัติ 2 ประการที่ส่งผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก ประการที่หนึ่ง จะมีอิทธิพลต่อคุณสมบัติของตัวถูกละลาย ซึ่งตัวถูกละลายในที่นี้คือโปรตีนซึ่งเป็นสารชีวโมเลกุลที่สามารถแตกตัวเป็นประจุได้ ดังนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลาย ที่ต่างกันจะทำให้การแตกตัวของโปรตีนแตกต่างกัน ส่งผลให้ประจุรวมบนโปรตีนมีค่าแตกต่างกันไปตามค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลาย ซึ่งจะส่งผลที่ต่างกันต่อแรงกระทำระหว่างโมเลกุลหรือระหว่างโปรตีนกับระบบ ประการที่สองคือ ระบบที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง แตกต่างกัน จะมีองค์ประกอบของระบบไม่เหมือนกัน เนื่องจากในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในกรณีที่เป็น

พอลิเมอร์กับเกลือ จะปรับเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบด้วยปริมาณและสัดส่วนของเกลือ ทำให้คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคมีความแตกต่างกัน เมื่อมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่างกัน

Zaslavsky (1995) ได้เสนอสมการที่สามารถทำนายค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีนเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างได้ดังสมการ 3.3

$$\ln m = \ln m(0) + \theta z \qquad 3.3$$

จากสมการที่ 3.3 จะพบว่า ค่าสัมประสิทธิ์การแยก จะขึ้นอยู่กับ ค่าสัมประสิทธิ์การแยกที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับค่า pI ประจุรวมสุทธิของเอนไซม์หรือโปรตีนที่ต้องการแยก และพารามิเตอร์ภายนอกอื่นๆ ที่อยู่ในเทอมของ $\theta$ เช่น แรงระหว่างโมเลกุลตัวถูกละลายและตัวทำละลาย เป็นต้น

จากการศึกษาอิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่าง ของระบบต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก ซึ่งให้ผลสอดคล้องในทางเดียวกัน คือ Kaul และ Asenjo ,1994 ; Samentor และ คณะ,1994; Sebastiao และ คณะ ,1994; Videira และ Aires-Barros, 1994; Tanuja และ คณะ ,1997 พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีนจะมีค่าสูงขึ้นเมื่อความเป็นกรด-ด่างของระบบมีค่าสูงกว่าค่า pI ของโปรตีนชนิดนั้นๆ เนื่องจากที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบที่มีค่ามากกว่าค่า pI โปรตีนชนิดนั้นๆ จะแสดงประจุมวลรวมเป็นลบและจะถูกผลักจากฟอสเฟตไอออนซึ่งเป็นประจุลบด้วยกัน ทำให้โปรตีนแยกไปอยู่ในวัฏภาคบนได้มากขึ้น แต่จากงานวิจัยของนันทิญา (2543) ซึ่งศึกษาการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอส ซึ่งมีค่า pI ประมาณ 9 กลับพบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบส่งผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก ไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือ เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างมากขึ้นจาก 7.5 ถึง 9.5 ค่าสัมประสิทธิ์การแยกจะสูงขึ้น แต่จะลดต่ำลงเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่า 10.5 แสดงดังตารางที่ 3.1

การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวทำละลาย ที่มีผลต่อประจุรวมของโมเลกุลของตัวถูกละลาย โดยประจุมวลรวมของตัวถูกละลายจะขึ้นกับปริมาณของกลุ่มไอออนิก (ionic group) และขึ้นอยู่กับการกระจายตัวของแรงของขั้วประจุ ซึ่ง Yang และ คณะ (1994) พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบ มีอิทธิพลต่อการแยกโปรตีน Cephaoporin และ desacetyl cephalosporin น้อยมาก

ตาราง 3.1 อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก

| ค่าความเป็นกรด-ด่าง | องค์ประกอบของระบบ | ชนิดของเอนไซม์และค่า pI | m |
|---|---|---|---|
| 1. Kaul และ คณะ (1994),<br>1. pH 5.0<br>2. pH 7.0<br>3. pH 8.5 | PEG4000/ฟอสเฟต/น้ำ | โปรตีน จาก *E.coli*<br>pI <7 | ≈ 0.15<br>≈ 0.20<br>≈ 0.35 |
| 2.Sarmentor และ คณะ (1994)<br>1. pH 6.4<br>2. pH 7.3<br>3. pH 8.7<br>4. pH 9.6 | 17.7% PEG1000/ โพแทสเซียมฟอสเฟต/น้ำ | Cytochrome $b_5$<br>pI=4.4 | 0.23<br>0.60<br>2.1<br>9.80 |
| 3. Sebastiao และ คณะ (1994)<br>1. pH 5.0<br>2. pH 6.0<br>3. pH 8.0<br>4. pH 9.0 | 30% PEG1000/10% โซเดียมฟอสเฟต หรือ โพแทสเซียมฟอสเฟต | Cutinase<br>pI=4.5-5 | 48.00<br>91.00<br>141.00<br>303.00 |
| Tanuja และ คณะ (1997)<br>1. pH 3.2<br>2. pH 9.5 | 5.1% PEG6000/ 7.5% $Na_2HPO_4$ | Amyloglu-cosidase<br>pI=3-4 | 0.01<br>0.25 |
| นันทิญา (2543)<br>1. pH 7.5<br>2. pH 8.5<br>3. pH 9.5<br>4. pH 10.5 | 20.7%PEG 1000/15.29%phos./น้ำ<br>20.68%PEG 1000/13.98%phos./น้ำ<br>18.0%PEG 1000/13.01%phos./น้ำ<br>37.72%PEG 1000/27.43%phos./น้ำ | Alkaline-protease<br>pI ≈9 | 2.00<br>12.00<br>20.00<br>15.30 |

เมื่อแยกโปรตีนทั้งสองในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ PEG และฟอสเฟต ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแรงไฮโดรโฟบิก มีอิทธิพลชัดกว่าแรงทางประจุ ดังนั้นจึงไม่สามารถสรุปได้ว่า ศักย์ไฟฟ้ามีอิทธิพลโดยตรงต่อการแยกของตัวถูกละลาย เพราะยังมีพารามิเตอร์ภายนอกอื่นๆอีกที่อธิบายได้ในเทอมของ $\theta$ เช่น แรงระหว่างตัวถูกละลายและตัวทำละลาย ซึ่งแรงนี้จะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของพอลิเมอร์และเกลือในแต่ละวัฏภาค จะเห็นได้ว่ามีความซับซ้อนของอิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก ดังนั้นการศึกษาอิทธิพลนี้จากการทดลองจะง่ายกว่าการทำนายค่าจากทฤษฎี (Zaslavsky,1995)

### 3.1.2 ปริมาณเอนไซม์หรือโปรตีนที่ต้องการ

นอกจากโครงสร้างและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแล้ว ชนิดของโปรตีนยังส่งผลถึงปริมาณโปรตีนที่สามารถเติมลงไปในระบบด้วย ความเข้มข้นของโปรตีนจะไม่มีอิทธิพลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกก็ต่อเมื่อโปรตีนที่เติมลงไปนั้นมีความเข้มข้นต่ำ คือน้อยกว่า 1 กรัม/ลิตร (Schemidt, และ คณะ 1996) แต่จากการศึกษาการแยกโปรตีนที่ละลายน้ำได้จาก *E.coli* ในระบบ PEG/เกลือ/น้ำ ของ Kaul และ Asenjo (1994) พบว่าความเข้มข้นของโปรตีนที่เติมลงไปในระบบที่มีค่ามากกว่า 0.5 กรัมต่อลิตร ก็จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของค่าสัมประสิทธิ์การแยกที่ลดลงได้อย่างชัดเจน

Papamichael และคณะ(1991) ศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของเอนไซม์และโปรตีนที่ปนเปื้อนเริ่มต้นต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์เป้าหมาย (เอนไซม์ฟูมาเรส) ออกจากโปรตีนที่ปนเปื้อน ในระบบ PEG/โพแทสเซียมฟอสเฟต/น้ำ ที่องค์ประกอบของระบบที่แตกต่างกัน พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์เป้าหมายมีค่าลดลงเล็กน้อยเมื่อปริมาณเอนไซม์เริ่มต้นเพิ่มขึ้น ยกเว้นที่องค์ประกอบของระบบที่มี PEG เท่ากับ 18% และ โพแทสเซียมฟอสเฟตเท่ากับ 12.5 % ซึ่งพบว่า ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของฟูมาเรสมีค่าสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีนรวมที่ปนเปื้อนอยู่กับเอนไซม์เริ่มต้นมีค่าลดลงอย่างมากในทุกองค์ประกอบของระบบเมื่อปริมาณเอนไซม์และโปรตีนมีค่าเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นจึงส่งผลให้จำนวนเท่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น (purification factor)

จากการศึกษาของ Schemidt, และ คณะ (1996) พบว่า ที่ภาวะไม่เติมเกลือในระบบความเข้มข้นของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นในระบบส่งผลให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของ อะไมโลกลูโคซิเดส (amyloglucosidase) และซับทิลิซิน (subtilisin) ลดลง แต่มีอิทธิพลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของ

ทริปซิน อินฮิบิเตอร์ (trypsin inhibitor) เปลี่ยนแปลงน้อยมากคือค่าค่อนข้างคงที่ค่อนไปทางเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ดังแสดงในตารางที่ 3.2 เนื่องจากความเข้มข้นเริ่มต้นของเอนไซม์มีอิทธิพลต่อพฤติกรรมการแยกของ ทริปซิน อินฮิบิเตอร์น้อยมาก เพราะโดนบดบังด้วยอิทธิพลของน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสซึ่งมีค่าสูง ดังนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เริ่มต้นจึงทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกลดลง ดังจะได้กล่าวถึงอิทธิพลของน้ำหนักโมเลกุลในหัวข้อที่ 3.1.4

Sebastiao และ คณะ (1996) ศึกษาการแยกเอนไซม์คิวติเนส (cutinase) ออกจากโปรตีนที่ปนเปื้อน ในระบบ PEG1000/ฟอสเฟต/น้ำ พบว่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์และโปรตีนรวมที่ปนเปื้อนจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เริ่มต้นเพิ่มมากขึ้น แต่ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของคิวติเนสจะมีค่าลดลงมากกว่าของโปรตีนที่ปนเปื้อน

ตาราง 3.2 ผลของปริมาณเอนไซม์หรือโปรตีนที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก

| ปริมาณเอนไซม์<br>หรือโปรตีนที่ต้องการ | องค์ประกอบ<br>ของระบบ | ชนิดของเอนไซม์ | m |
|---|---|---|---|
| 1. Papamichael และ คณะ (1991)<br>- 3 –15 กรัม ต่อลิตร | PEG18%/<br>Phosphate12.5%<br>/น้ำ | Fumarase | 1.20-1.30<br>1.5-0.9[a] |
| 2. Schemidt และ คณะ (1996)<br>- 2 g/kg ของระบบ<br>- 4 g/kg ของระบบ<br>- 7 g/kg ของระบบ<br>- 9 g/kg ของระบบ | PEG4000/<br>ฟอสเฟต/น้ำ | Amyloglucosidase | 0.07<br>0.06<br>0.04<br>0.02 |
| 3. Sebastiao และ คณะ (1996)<br>1-10 เปอร์เซนต์ ของระบบ | PEG1000/<br>ฟอสเฟต/น้ำ | Cutinase | ≈ 80.00-2.00<br>≈ 0.03-0.09[a] |

[a] คือค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีนที่ปนเปื้อน

จากงานวิจัยของ Papamichael และคณะ (1991) แสดงให้เห็นว่าอิทธิพลของปริมาณเอนไซม์และโปรตีนที่ปนเปื้อนที่เติมในระบบร่วมกับองค์ประกอบของระบบที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก เพราะองค์ประกอบที่ต่างกันทำให้แนวโน้มของค่าสัมประสิทธิ์การแยกแตกต่างกันเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์และโปรตีนรวมที่ปนเปื้อนที่เติมในระบบ และจากงานวิจัยของ Schemidt และคณะ (1996) แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของชนิดของเอนไซม์ที่ต้องการแยกในระบบเดียวกันว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เริ่มต้นทำให้แนวโน้มค่าสัมประสิทธิ์การแยกที่แตกต่างกัน ดังนั้นจะเห็นว่าชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์และโปรตีนรวมที่ปนเปื้อนที่เติมในระบบและองค์ประกอบของระบบมีอิทธิพลร่วมกัน ทั้งนี้เนื่องจากปัจจัยทั้งสามจะมีผลต่อแรงกระทำระหว่างโมเลกุลและระหว่างโมเลกุลกับระบบ ดังนั้นการจะอธิบายถึงพฤติกรรมในการแยกของเอนไซม์หรือโปรตีนแต่ละชนิดควรพิจารณาปัจจัยเหล่านี้ควบคู่กันไป

### 3.1.3. สัดส่วนเชิงปริมาตรวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่าง

สัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่าง คือ ปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างบนเส้นผูกเดียวกัน ซึ่งที่ทุกจุดบนเส้นผูกเดียวกัน ระบบจะมีองค์ประกอบของแต่ละวัฏภาคเหมือนกัน ดังนั้นค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์แต่ละชนิดควรจะมีค่าเท่ากัน แต่อย่างไรก็ตาม จากงานวิจัยของ Hotha และ Banik (1997) ซึ่งศึกษาการแยก แอลคาไลน์โพรทีเอสจากเชื้อ *B. thuringiensis* H14 ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ PEG (น้ำหนักโมเลกุล 9000, 6000 และ 4000) และโพแทสเซียมฟอสเฟต พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์การแยกจะเพิ่มขึ้นเมื่อสัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างมีค่าลดลง โดยที่ระบบมี PEG 4000 ค่าสัมประสิทธิ์การแยกจะเพิ่มขึ้นจาก 1.85 เป็น 4.70 เมื่อสัดส่วนเชิงปริมาตรลดลงจาก 6.69 เป็น 1.08 ซึ่งจะเห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงของค่าสัมประสิทธิ์การแยกมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นจะลดต่ำลง เมื่อสัดส่วนปริมาตรลดลงจาก 1.08 เป็น 0.32 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การแยกลดลงจาก 4.70 เป็น 4.45 ส่วนในระบบที่มี PEG 9000 พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์การแยกจะเพิ่มขึ้นจาก 1.74 เป็น 2.33 เมื่อสัดส่วนเชิงปริมาตรลดลงจาก 4.88 เป็น 0.30 ซึ่งจะเห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงของค่าสัมประสิทธิ์การแยกประมาณ 26 เปอร์เซนต์ในขณะที่ระบบที่มี PEG 6000 มีการเปลี่ยนแปลงค่าสัมประสิทธิ์การแยกจาก 2.586 ถึง 2.677 เมื่อลดสัดส่วนเชิงปริมาตรจาก 5.67 เป็น 0.30 ซึ่งพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของค่าสัมประสิทธิ์การแยกน้อยกว่าที่ระบบเป็น PEG 4000 และ PEG 9000

จากงานวิจัยของ Sebastiao และ คณะ (1996) ซึ่งแยก คิวติเนส ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ PEG 1000 และ โซเดียมหรือโพแทสเซียมฟอสเฟต พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การแยกของคิวติเนสจะมีค่าลดลงเล็กน้อย เมื่อลดสัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างในขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีนที่ปนเปื้อนกลับมีค่าสูงขึ้นมากกว่าค่าสัมประสิทธิ์การแยกของคิวติเนส

ดังนั้นจะเห็นว่างานวิจัยทั้งสองตรงข้ามกับทฤษฎีการแยกทั่วไป จากงานวิจัยของ Sebastiao และ คณะ (1996) พบว่า ชนิดของเอนไซม์หรือโปรตีนให้แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของค่าสัมประสิทธ์การแยกแตกต่างกัน เมื่อปรับสัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างในระบบเดียวกัน และจากงานวิจัยของ Hotha และ Banik (1997) พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอสไม่มีแนวโน้มที่แน่นอนตามน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเมอร์ และให้แนวโน้มแตกต่างกันในแต่ละองค์ประกอบของระบบ ดังนั้นจะเห็นว่าไม่มีกฏเกณฑ์ใดแน่นอนในการบ่งบอกถึงค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์ เมื่อมีการปรับเปลี่ยนสัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่าง ดังนั้นจึงควรศึกษาจากผลการทดลองเท่านั้น

### 3.1.4 โครงสร้างและน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์หรือโปรตีน

จากการศึกษาถึงผลของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (amyloglucosidase),ซับทิซิลิน (subtilisin) และ ทริปซินอินฮิบิเตอร์ (trypsin inhibitor)ในระบบ PEG4000/ฟอสเฟต/น้ำ ของ Schemidt และคณะ (1996) พบว่าเมื่อโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากขึ้นจะให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกที่ลดลง ซึ่งไม่สอดคล้องกับสมการที่ 3.2 ที่ว่าค่าสัมประสิทธิ์การแยกจะแปรผันตามน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์หรือโปรตีน และจากการศึกษาการแยกโปรตีน 5 ชนิดใน ระบบ PEG/เด็กซ์แทรน/น้ำ ของ Forciniti และคณะ (1991) กลับพบว่าผลการทดลองไม่ได้เป็นไปตามสมการที่ 3.2 ซึ่งแสดงค่าดังตารางที่ 3.1 จะเห็นว่าไคโมทริปซิโนเจนจะมีค่าสัมประสิทธิ์การแยกสูงกว่าไลโซไซม์ ทั้งที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องจากความชอบที่จะอยู่ในแต่ละวัฏภาคของโปรตีนแต่ละชนิดแตกต่างกัน และอาจจะมีปัจจัยอื่นซึ่งอยู่ในรูปพารามิเตอร์ $\eta$ ที่มีอิทธิพลมากกว่าอิทธิพลของน้ำหนักโมเลกุล ดังนั้นจึงไม่สามารถอธิบายค่าสัมประสิทธิ์การแยกจากการพิจารณาผลกระทบจากปัจจัยสำคัญเพียงปัจจัยเดียวได้ ดังที่ได้กล่าวมาแล้วตอนต้น

ตาราง 3.3 ผลของชนิดและน้ำหนักโมเลกุลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก

| น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์หรือโปรตีนที่ต้องการ | ชนิดของเอนไซม์ | องค์ประกอบของระบบ | m |
|---|---|---|---|
| 1. Forciniti, และ คณะ (1991), | | | |
| 1. $1.32 \times 10^4$ | Lysozyme | PEG10000/ เด็กแทรน 500000/น้ำ | 0.69-0.54 |
| 2. $2.32 \times 10^4$ | Chymotrypsinogen A | | 1.64-2.7 |
| 3. $6.50 \times 10^4$ | Bovine Serum Albumin | | 0.37-.043 |
| 4. $7.30 \times 10^4$ | Transferrin | | 0.23-0.04 |
| 5. $25.0 \times 10^4$ | Catalase | | 0.037-0.025 |
| 2. Schemidt และ คณะ (1996) | | | |
| 1. 20.0 kDa | Trypsin inhibitor | PEG/ฟอสเฟต/น้ำ | 2.6 |
| 2. 27.5 kDa | Subtilisin | | 1.6 |
| 3. 97.0 kDa | Amyloglucosidase | | 0.11 |

### 3.2 การสกัดโดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในหอสกัด

การประยุกต์ใช้สารละลายน้ำสองวัฏภาคในหอสกัด ส่วนมากนิยมศึกษาเพื่อนำไปพัฒนากระบวนการออกแบบเครื่องมือสกัดและการขยายขนาดของการสกัดเอนไซม์ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ซึ่งอาศัยความรู้ทางอุทกพลศาสตร์ของวัฏภาคและข้อมูลการถ่ายเทมวลของเอนไซม์หรือโปรตีนภายในหอสกัด ที่ภาวะการดำเนินการที่ทำให้ประสิทธิภาพการสกัดในหอสกัดมีค่ามากที่สุด

จากงานวิจัยของ Save และ Pangarker (1993) ซึ่งศึกษาการแยก อะไมโลกลูโคซิเดส ที่มีความบริสุทธิ์ในระดับห้องปฏิบัติการ ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ PEG 1000 และโซเดียมฟอสเฟตในหอสกัดแบบ spray ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางและความสูง เท่ากับ 30 มิลลิเมตร และ 1000 มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยใช้เทคนิคการทำให้ PEG อยู่ในรูป ของ colloidal gas

aphrons (CGAs) โดยกวนอย่างปั่นกวนที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที หลังจากนั้น ปั่นกวนด้วย 1000 รอบต่อนาที เพื่อให้ CGAs สามารถแขวนลอยอยู่ได้จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง และทำให้ฟองอากาศใน PEG คงที่ด้วยสารลดแรงตึงผิว ดังนั้นวิธีการนี้จึงเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวอีกวิธีการหนึ่ง ซึ่งพบว่า การเพิ่มอัตราไหลของวัฏภาคกระจายตัวทำให้สัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวล ($K_d a$) มีค่าสูงขึ้น

Pawar และ คณะ (1997) ศึกษาการแยก อะไมโลกลูโคซิเดส และบีตา กาแลคโตซิเดส ที่มีความบริสุทธิ์ในระดับห้องปฏิบัติการ ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ PEG 4000 และโซเดียมฟอสเฟตในหอสกัดแบบ spray ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 50 มิลลิเมตรและ ส่วนสูงที่ใช้ในการสกัด 500 มิลลิเมตร โดยศึกษาอิทธิพลของความเร็วในการไหลของวัฏภาคกระจายตัวที่มีผลต่อการถ่ายเทมวลของเอนไซม์ทั้งสองชนิด โดยกำหนดให้วัฏภาคต่อเนื่องมีความเร็วในการไหลคงที่ที่ 0.2 มิลลิเมตรต่อวินาที ในขณะที่ปรับความเร็วในการไหลของวัฏภาคกระจายตัว เป็น 2-6 มิลลิเมตรต่อวินาที ซึ่งเมื่อให้มีการไหลขนาน (co-current) และสวนทางกัน (counter current) ของวัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่อง พบว่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวล ($K_d a$) มีค่ามากขึ้นตามความเร็วในการไหลของวัฏภาคกระจายตัว

Coimbra และคณะ (1998) ใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ PEG 6000 และไดเบสิค (diabasic) โพแทสเซียมฟอสเฟตศึกษาอิทธิพลที่มีผลต่อค่า hold up ของวัฏภาคกระจายตัวในหอสกัดแบบ PRDC ซึ่งออกแบบตาม Tambourgi และ คณะ (1993) ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 51 มิลลิเมตร และสูง 700 มิลลิเมตร แต่ส่วนที่ใช้สกัดสูงเพียง 300 มิลลิเมตร ซึ่งปัจจัยที่ทำการศึกษา ได้แก่ ความเร็วรอบในการปั่นกวน (34, 108 และ 152 รอบต่อนาที) และอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว (16, 32, 62, 70 และ 80 มิลลิลิตรต่อนาที) โดยกำหนดให้ความเร็วในการไหลของวัฏภาคต่อเนื่องคงที่ที่ 16 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งพบว่าจำนวนหยดของวัฏภาคกระจายตัวจะเพิ่มมากขึ้น และ ความเร็วในการ settling ของหยดจะลดลงเมื่อความเร็วรอบในการปั่นกวนมีค่าเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ hold up ของวัฏภาคกระจายตัวสูงขึ้น และพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวก็ส่งผลให้ hold up สูงตามไปด้วยเช่นกัน

ในขณะที่ Porto และคณะ (1997) ศึกษาการแยก ไซโตโครม บี 5 ที่สกัดจาก *E. coli* ซึ่งมีโปรตีนรวมที่ปนเปื้อนในระบบสสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ PEG 1000 (18 % w/w) และโพแทสเซียมฟอสเฟต (16% w/w) มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ในหอสกัดแบบ PRDC ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 32 มิลลิเมตรและ สูง 160 มิลลิเมตร โดยศึกษาอิทธิพลของความเร็ว

รอบในการปั่นกวน (35, 150, 250 รอบต่อนาที) และอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่อง เท่ากับ 3.0 และ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ พบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดคือภาวะที่ความเร็วรอบในการปั่นกวนเท่ากับ 140 รอบต่อนาที เพราะให้ค่าความบริสุทธิ์สูงกว่าในน้ำหมัก (purity factor) ถึง 1.7 เท่า แต่อย่างไรก็ตาม Porto และคณะ (1997) ก็ไม่ได้อธิบายถึงอิทธิพลของอัตราไหลเชิงปริมาตรที่มีผลต่อการสกัด ไซโตโครม บี 5 โดยอธิบายเพียงว่าการเพิ่มอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว เท่ากับ 0.5 –3 มิลลิลิตรต่อนาที โดยคงอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่องไว้ที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาทีเท่าเดิม ทำให้ hold up ของวัฏภาคกระจายตัวเพิ่มขึ้น ซึ่งจากงานวิจัยของ Porto และคณะ (1997) พบว่าประสิทธิภาพการสกัดของไซโตโครม บี 5 มีค่าประมาณ 1 ไม่ขึ้นกับความเร็วรอบในการปั่นกวนในขณะที่ (Tambourgi และคณะ 1993) กล่าวว่าประสิทธิภาพการสกัดจะสูงขึ้นเมื่อความเร็วรอบในการปั่นกวนมากขึ้น

จากงานวิจัยข้างต้นจะเห็นว่าไม่มีการศึกษาถึงอิทธิพลของปริมาณเอนไซม์เริ่มต้น ต่อการสกัดเลย ซึ่งเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการถ่ายเทมวลข้ามวัฏภาค โดยงานวิจัยนี้จะศึกษาอิทธิพลของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการถ่ายเทมวลภายในหอสกัด ซึ่งได้แก่ ความเร็วรอบในการปั่นกวน อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่อง และ ผลต่างของความเข้มข้นเอนไซม์ระหว่างวัฏภาค

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 4

# อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

## 4.1 อุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ( 4-digits balance) ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland.
2. เครื่องกวนแบบแม่เหล็กพร้อมเตาให้ความร้อน (magnetic stirrer / hot plate) ของบริษัท Ika Labortechnik, Germany.
3. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น MP 220 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland.
4. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Kubota 5100 ของบริษัท Kubota corporation, Japan
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Spectronic Instruments, USA
6. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker) รุ่น G-FS ของบริษัท Gessells Chaft fur labortechnik , Germany
7. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น Julabo HC-2/8 ของบริษัท Labortechnik GMBH,Germany.
8. ปั๊มรีด (Peristatic pump)
    - 8.1 รุ่น Master Flex 7518-10 ของบริษัท Cole Parmer Instrument, Co, USA.
    - 8.2 รุ่น Micro tube pump ของ บริษัท Tokyo Rikakikai, Japan

## 4.2 เคมีภัณฑ์

1. กรดไฮโดรคลอริก 37% (HCl) ของบริษัท BDH Laboratory, England.
2. กรดฟอสฟอริก ($H_3PO_4$) ของบริษัท Lipton Manufacturing Chemists, England.
3. กรดไตรคอลโรอะซีติก (TCA) ของบริษัท Merck, Germany.
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck,Germany
5. โบวีนซีรัมอัลบูมิน ( Bovine Serum Albumin, BSA) ของบริษัท Fluka, Switzerland
6. โพลีเอททิลีนไกลคอล น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ย 1000 (PEG 1000) ของ Ajax, Australia.

7. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($K_2HPO_4$) ของบริษัท Ajax, Australia.
8. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$) ของบริษัท Ajax, Australia.
9. เอโซเคซีน (Azocasein) ของ บริษัท Sigma, Germany
10. โคมาเซ บิเลียนบลู จี 250 (comasie billient blue G 250) ของบริษัท Ajax,Australia.
11. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \bullet 7H_2O_4$) ของบริษัท ASP. Ajax Finechem, Australia
12. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \bullet 2H_2O$) ของบริษัท ASP. Ajax Finechem, Australia
13. ยีสต์สกัด (Yeast extract) ของบริษัท Ajax, Australia
14. กลูโคส (glucose, $C_6H_{12}O_6$) ของบริษัท Ajax, Australia
15. ทริสเอชซีแอล ( Tris HCl) ของบริษัท Carlo ERBA,Italy
16. แอบโซลูท เอทานอล ( Absolute ethanol) ของบริษัท Carlo ERBA,Italy
17. โทลูอีน (Toluene) ของบริษัท Merck, Germany
18. น้ำกรอง

ซึ่งสารเคมีทั้งหมดมีความบริสุทธิ์ระดับห้องปฏิบัติการยกเว้น ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ดำเนินการในหอสกัด ซึ่งมีความบริสุทธิ์ระดับการค้า

## 4.3 เอนไซม์

งานวิจัยนี้ใช้แอลคาไลน์โพรทีเอสจาก *B. subtilis* TISTR 25 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์จาก รศ.นภา ศิวรังสรรค์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 (วรรณวิมล, 2539) ซึ่งมีสูตรอาหารดังนี้ ในน้ำกรอง 1 ลิตร ประกอบด้วย ยีสต์สกัด 20 กรัม กลูโคส 5 กรัม $KH_2PO_4$ 5 กรัม $MgSO_4 \bullet 7H_2O$ 0.5 กรัม และ $CaCl_2 \bullet 2H_2O$ 0.01 กรัม โดยค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 โดยเติมเชื้อลงไป 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรของสารอาหารทั้งหมด หลังจากนั้นนำไปเขย่าในเครื่องเขย่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วแยกน้ำหมักออกจากเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง แล้วนำน้ำหมักที่แยกได้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

**4.4 วิธีการทดลอง**

การสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอส จาก *B. subtilis* TISTR 25 แบ่งได้สองส่วน คือ ส่วนแรกเป็นการทดลองเพื่อหาภาวะเหมาะสมต่อการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสในบีกเกอร์ขนาดเล็ก ส่วนที่สองเป็นการหาภาวะที่เหมาะสมในการดำเนินการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัดแบบ Oldshue Rushton

4.4.1 การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสในบีกเกอร์ขนาดเล็ก

4.4.1.1 การหาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม

องค์ประกอบโดยน้ำหนักของ PEG 1000 และ โพแทสเซียมฟอสเฟตของระบบที่เหมาะสมต่อการแยกแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ ดังนี้ 20.70 % PEG 1000 และ 15.92% โพแทสเซียมฟอสเฟต (pH 7.5), 20.68% PEG 1000 และ 13.98% โพแทสเซียมฟอสเฟต (pH 8.5), 18% PEG 1000 และ 13.01%โพแทสเซียมฟอสเฟต (pH 9.5) 37.72% PEG 1000 และ 16.05% โพแทสเซียมฟอสเฟต (pH 10.5) ตามลำดับ (นันทิญา,2543) จากนั้นเติมน้ำและปั่นกวนให้สารละลายทั้งหมดผสมกันดีแล้ว เติมน้ำหมักลงไปปริมาณ 2 กรัม ในขณะที่มีการปั่นกวนตลอดเวลา หลังจากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ตามต้องการ (7.5, 8.5, 9.5 และ 10.5) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 นอร์มอลหรือกรดฟอสฟอริกเข้มข้นในปริมาณเล็กน้อย หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จึงนำตัวอย่างในแต่ละวัฏภาคไปหาแอคติวิตีของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีนทั้งหมดเพื่อคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การแยกและความบริสุทธิ์ของแอลคาไลน์โพรทีเอส

4.4.1.2 หาสัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างและปริมาณน้ำหมักที่เหมาะสม

นำค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองหัวข้อ 4.4.1.1 มาเลือกจุดบนเส้นผูกเส้นเดียวกัน 5 จุด เมื่อคิดเป็นสัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างจะมีค่าดังนี้ 22, 3, 1, 0.33 และ 0.06 โดยแต่ละจุดมีองค์ประกอบดังนี้ 41.67 % PEG 1000 และ 3.50% โพแทสเซียมฟอสเฟต, 31.67% PEG 1000 และ 9.50%โพแทสเซียมฟอสเฟต, 20.70 % PEG 1000 และ 15.92% โพแทสเซียมฟอสเฟต 10.83% PEG 1000 และ 21.75%โพแทสเซียมฟอสเฟต

1.67% PEG 1000 และ 27.00% โพแทสเซียมฟอสเฟต ตามลำดับ (นันทิญา,2543) หลังจากนั้นเติมน้ำและปั่นกวนให้สารละลายผสมกันดี โดยแต่ละจุดมีการแปรปริมาณน้ำหมัก 5 ค่า คือ 10, 20, 30, 40, และ 50 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักของระบบ โดยน้ำหนักรวมของทุกการทดลองมีค่าเท่ากับ 10 กรัม หลังจากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 นอร์มอลหรือกรดฟอสฟอริกเข้มข้นในปริมาณเล็กน้อย หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จึงนำตัวอย่างในแต่ละวัฏภาคไปหากิจกรรมของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีนทั้งหมดเพื่อคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การแยกและความบริสุทธิ์ของแอลคาไลน์โพรทีเอส

4.4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการดำเนินการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัดแบบ Oldshue Rushton

การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการดำเนินการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัดแบบ Oldshue Rushton โดยการให้วัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่องไหลสวนทางกัน โดยให้วัฏภาคที่มี PEG 1000 อยู่มากเป็นวัฏภาคที่ไหลขึ้น คือไหลเข้าทางด้านล่างของหอสกัด และให้วัฏภาคที่มีโพแทสเซียมฟอสเฟตอยู่มากเป็นวัฏภาคที่ไหลลง คือไหลเข้าหอสกัดทางด้านบน โดยมีองค์ประกอบของวัฏภาคกระจายตัวดังนี้ 42.5% PEG 1000 และ 2.49 % โพแทสเซียมฟอสเฟต ส่วนองค์ประกอบของวัฏภาคต่อเนื่องมีเพียงโพแทสเซียมฟอสเฟตและน้ำ คือ 28% โดยน้ำหนักของระบบ หลังจากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ตามต้องการด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 นอร์มอลหรือกรดฟอสฟอริกเข้มข้นในปริมาณเล็กน้อย หลังจากนั้นก็ดำเนินการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอส ตามภาวะที่ต้องการศึกษา คือ ความเร็วรอบในการปั่นกวนของใบพัด (0, 50, 100, 150, และ 200 รอบต่อนาที) อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว (1.0 , 2.1, 3.4 และ 5.3 มิลลิเมตรต่อนาที) และอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง (11.8 และ 17.9 มิลลิลิตรต่อนาที) ความเข้มข้นของน้ำหมักเริ่มต้นในวัฏภาคต่อเนื่อง (20,40,60, และ 72 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักของวัฏภาคต่อเนื่อง) โดยดำเนินการสกัดจนกระทั่งความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสและโปรตีนทั้งหมดของขาออกของทั้งสองวัฏภาคมีค่าคงที่ หลังจากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสและของโปรตีนเพื่อนำไปคำนวณเปอร์เซนต์ผลได้ จำนวนเท่าความบริสุทธิ์ และประสิทธิภาพการสกัด ทำการหาความคลาดเคลื่อนของการทดลอง โดยการทำการทดลองซ้ำกัน 3 การทดลอง ที่ภาวะการดำเนินการสกัดเหมือนกันพบว่า เปอร์เซนต์ผลได้มีค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่าง ± 4.57 เปอร์เซนต์

## 4.5 การวิเคราะห์

4.5.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอส (Raja และ คณะ 1993)

บ่มตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตรกับสารละลายเอโซเคซีน 0.2 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH เท่ากับ 10.5 เข้มข้น 0.1 โมลาร์ 0.9 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำขึ้นแช่ในอ่างน้ำเย็น 4 องศาเซลเซียส แล้วหยุดปฏิกิริยาทันทีด้วย 10 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก 2 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร เพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์ โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์เป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำกัน 3 ครั้งในหนึ่งชุดการทดลอง ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่าง(the coefficient of variation) เท่ากับ ± 3.7 เปอร์เซนต์ และของกระบวนการทดลองตั้งแต่เตรียมระบบจนกระทั่งเสร็จสิ้นกระบวนการ โดยทำการทดลองซ้ำกัน 3 ชุดการทดลอง พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่าง เท่ากับ ± 9.27 เปอร์เซนต์

ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ต้องทำหลอดควบคุมเปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนที่ได้จากการย่อยสลายโดยเอนไซม์อย่างแท้จริง โดยใส่ 10 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก 2 มิลลิลิตรลงไปก่อนแล้วจึงค่อยเติมตัวอย่าง,Tris-HCl บัฟเฟอร์ และสารละลายเอโซเคซีน 0.9 และ 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำแช่ในอ่างน้ำเย็น 4 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอน ดูดส่วนใสมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร นำค่าดูดกลืนแสงของหลอดควบคุมลบออกจากค่าการดูดกลืนแสงจากหลอดตัวอย่าง คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์หลังจากลบค่าดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม (แสดงวิธีคำนวณ ดังภาคผนวก ข)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5.2 การเตรียมสารละลายเพื่อหากิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอส (Raja และ คณะ 1993)

ก) สารละลายTris-HCl บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์

ละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ 6.05 กรัมในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 นอร์มอลหรือกรดไฮโดรคลอริก 2 นอร์มอลจนได้ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ข) สารละลายเอโซเคซีน 0.2 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เตรียมเอโซเคซีน 1 กรัม เติม Absolute ethanol 2 มิลลิลิตร โทลูอีน 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น คนจนเอโซเคซีนละลายจนหมด แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร หลังจากนั้นบรรจุในขวดคสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ค) กรดไตรคลอโรอะซีติก 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เตรียมกรดไตรคลอโรอะซีติก 50 กรัม เติมน้ำกลั่น คนจนกรดละลายจนหมดแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร บรรจุขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.5.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ( Sedmak และ Grossberg และ คณะ, 1977; Kaul และ คณะ Asenjo, 1993)

เติมตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 2.4 มิลลิลิตร และสารละลายโคมาเซ บิเลี่ยนบลู จี 250 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าดูดคลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร แล้วเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน (แสดงดังภาคผนวก ก) โดยความเข้มข้นของโปรตีนเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำกัน 3 ครั้งในหนึ่งชุดการทดลอง ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่าง (the coefficient of variation) เท่ากับ $\pm$ 5.36 เปอร์เซนต์ และของกระบวนการทดลองตั้งแต่เตรียมระบบจนกระทั่งเสร็จสิ้นกระบวนการ โดยทำการทดลองซ้ำกัน 3 ชุดการทดลอง พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่าง เท่ากับ $\pm$7.29 เปอร์เซนต์

<u>หมายเหตุ</u> หลอดเปรียบเทียบ ( blank)

- หลอดเปรียบเทียบของการวัดโปรตีนในน้ำหมัก เติมน้ำแทนตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร
- หลอดเปรียบเทียบของการวัดโปรตีนในวัฏภาคกระจายตัว เติมสารละลายของวัฏภาคกระจายตัว แทนตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตรที่มีองค์ประกอบเหมือนกับที่ใช้ในการทดลอง แต่ไม่มีเอนไซม์อยู่ในวัฏภาค
- หลอดเปรียบเทียบของการวัดโปรตีนในวัฏภาคต่อเนื่อง เติมสารละลายของวัฏภาคต่อเนื่องแทนตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตรที่มีองค์ประกอบเหมือนกับที่ใช้ในการทดลองแต่ไม่มีเอนไซม์อยู่ในวัฏภาค

4.5.4 เตรียมสารละลายเพื่อหาปริมาณโปรตีน ( Sedmak และ Grossberg และ คณะ, 1977; Kaul และ คณะ Asenjo, 1993)

ก) กรดไฮโดรคลอริก 0.6 นอร์มอล

เตรียมกรดไฮโดรคลอริก 37% 24.87 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลิลิตร

ข) สารละลายโคมาเซ บิเลี่ยนบลู G 250 0.06 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เตรียมโคมาเซ บิเลี่ยนบลู G 250 0.06 กรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริก 0.6 นอร์มอล คนจนละลาย หลังจากนั้นปรับปริมาตรด้วย กรดไฮโดรคลอริก 0.6 นอร์มอล จนมีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 และต้องทำการเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทำการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 5

## ผลการทดลองและวิเคราะห์ผล

จากวัตถุประสงค์ที่ต้องการพัฒนาการแยกแอลคาไลน์โพรทีเอส โดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของนันทิญา (2543) ซึ่งศึกษาการแยกแอลคาไลน์โพรทีเอสที่อยู่ในรูปของครูดเอนไซม์ผง (crude enzyme) จากเชื้อ *Bacillus subtilis* NS 99 ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ PEG 1000/โพแทสเซียมฟอสเฟต/น้ำ ที่อุณหภูมิห้องและความดันบรรยากาศ โดยศึกษาถึงอิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก ได้แก่ ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ความยาวของเส้นผูก และค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบที่สัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างเท่ากับ 1 พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอสจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่าง แต่จะลดลงเมื่อเพิ่มความยาวของเส้นผูกและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอส คือระบบที่ประกอบด้วย PEG1000 18.00% (w/w) ,โพแทสเซียมฟอสเฟต 13.01% (w/w) ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเท่ากับ 9.5 ซึ่งให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกเท่ากับ 20.0 และเปอร์เซนต์ผลได้เท่ากับ 95.1 โดยงานวิจัยนี้จะแยกแอลคาไลน์โพรทีเอสจากน้ำหมักโดยตรงแทนแอลคาไลน์โพรทีเอสซึ่งอยู่ในรูปครูดเอนไซม์ผง

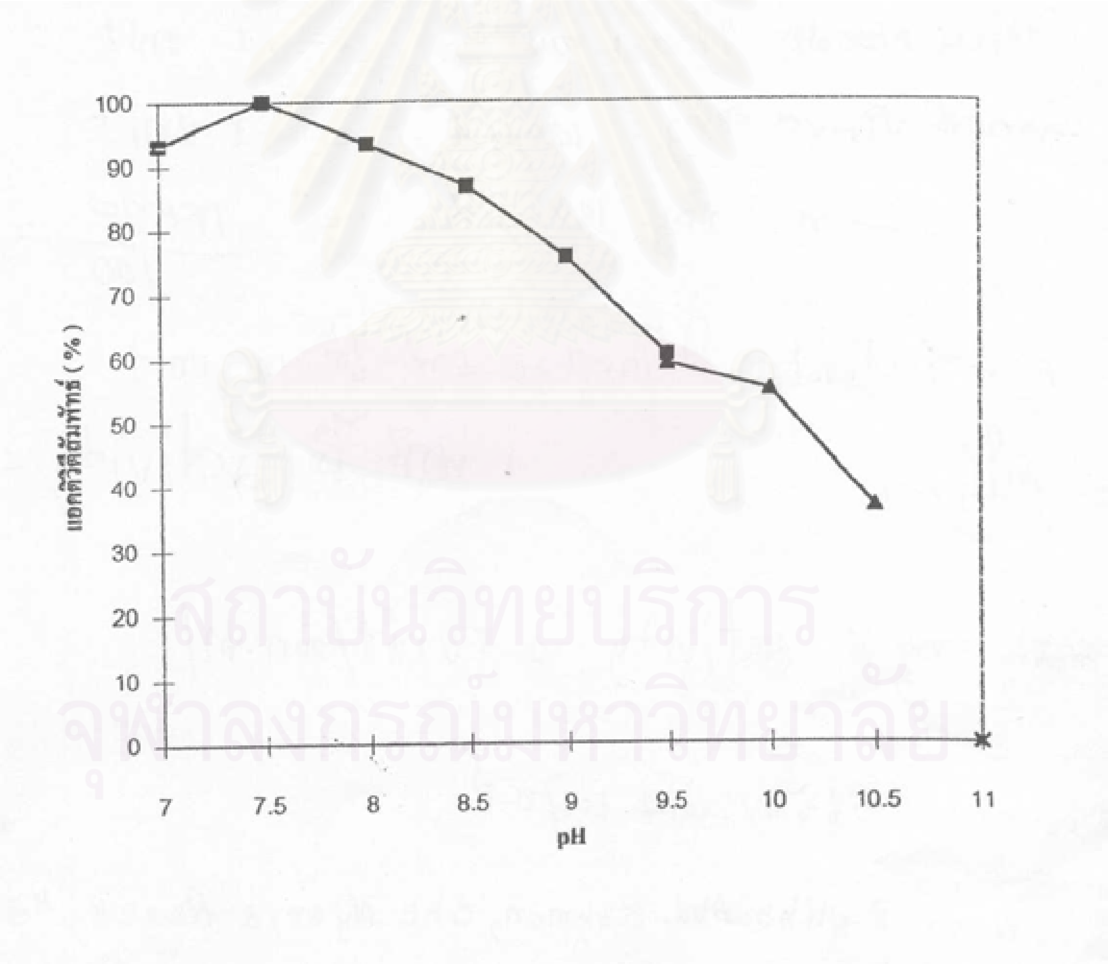
### 5.1 ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกแอลคาไลน์โพรทีเอสในบีกเกอร์

#### 5.1.1 อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

จากความต้องการแยกแอลคาไลน์โพรทีเอสโดยตรงจากน้ำหมัก ทำให้ภาวะของค่าความเป็นกรด-ด่างที่นันทิญา (2543) ศึกษาไว้ อาจจะไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้กับการแยกแอลคาไลน์-โพรทีเอสจากน้ำหมัก จากเชื้อ *B. Subtilis* TISTR 25 เนื่องจากนันทิญา (2543) ได้ศึกษาการ แยกแอลคาไลน์โพรทีเอสที่เป็นครูดเอนไซม์ ซึ่งผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่านเครื่องอัลตราฟิวเตชั่นและตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ดังนั้นเอนไซม์จึงมีความบริสุทธิ์และเข้มข้นอยู่ในระดับหนึ่ง ในขณะที่น้ำหมักจะประกอบด้วย ชีวโมเลกุลหลายชนิด ได้แก่ โปรตีน เปปไทด์ ต่างชนิดกันและสารอาหารที่อาจหลงเหลืออยู่ เช่น กลูโคส ยีสต์สกัด และเกลือชนิดต่างๆ เป็นต้น โดยที่โปรตีนต่างๆจะประกอบด้วยกลุ่มของกรดและเบสที่มีปริมาณแตกต่างกันซึ่งจะทำให้ค่า pI ของชีวโมเลกุลมีค่าแตกต่างกันด้วย ดังนั้นประจุบนชีวโมเลกุลเหล่านี้จะแตกต่างกัน เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างของ ตัวทำละลายเปลี่ยนไป (Zaslavsky,1995) ดังนั้นการแยกของชีวโมเลกุลต่างชนิด

กันในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคระบบเดียวกันจะแตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลต่อค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ต้องการ อย่างไรก็ตามการปรับเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่าง นอกจากจะเปลี่ยนประจุสุทธิบนตัวถูกละลายแล้วยังอาจจะทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไปด้วย ดังนั้นจากเหตุผลต่างๆข้างต้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาอิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการแยกแอลคาไลน์โพรทีเอสจากน้ำหมักเป็นการเพิ่มเติมจากงานวิจัยของนันทิญา (2543)

งานวิจัยนี้ศึกษาอิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบอยู่ในช่วง 7.5 ถึง 10.5 ซึ่งไม่ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีค่าต่ำกว่า 7.5 เนื่องจากไม่มีข้อมูลของเส้นแบ่งวัฏภาคที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 7.5 ประกอบกับพบว่ากิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสในสารละลายบัฟเฟอร์จะลดลงเมื่อค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายบัฟเฟอร์ต่ำกว่า 7.5 ดังกราฟรูปที่ 5.1



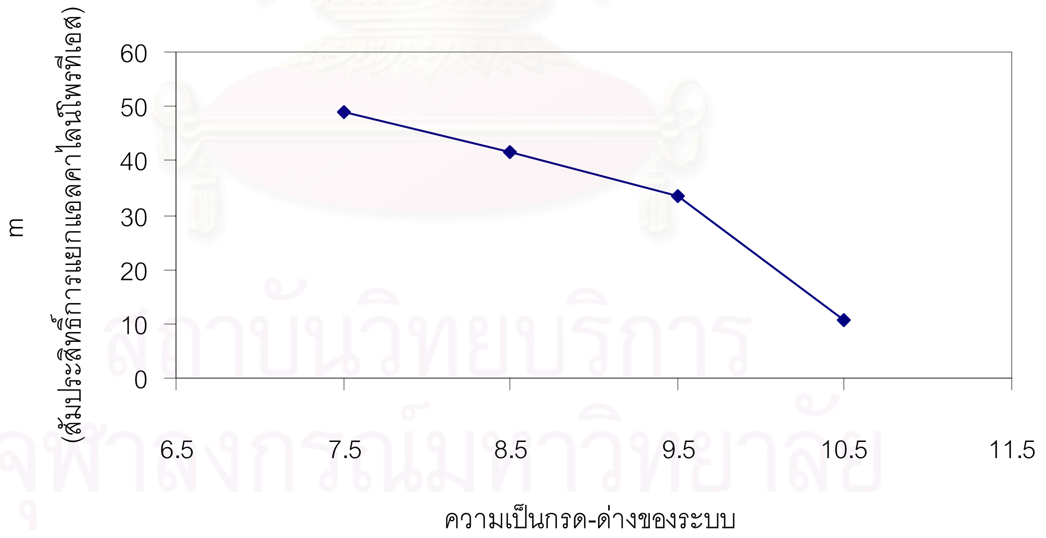

รูปที่ 5.1 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสผง จาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ( วรรณวิมล ,2540 )

ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5 วัดกิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงกว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างอื่น เนื่องจาก *B.subtilis* TISTR 25 ในขณะที่ผลิตแอลคาไลน์โพรทีเอสสามารถผลิตนิวทรอลโพรทีเอสได้ในปริมาณที่มากด้วย (ปกรณ์,2532) ซึ่งนิวทรอลโพรทีเอส เป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนได้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นกลางคือประมาณ 7-8 และมีความเสถียรอยู่ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 - 10 ดังนั้นจากนิวทรอลโพรทีเอสที่มีปริมาณมากอาจทำให้ผลวิเคราะห์ออกมาดังกราฟรูปที่ 5.1

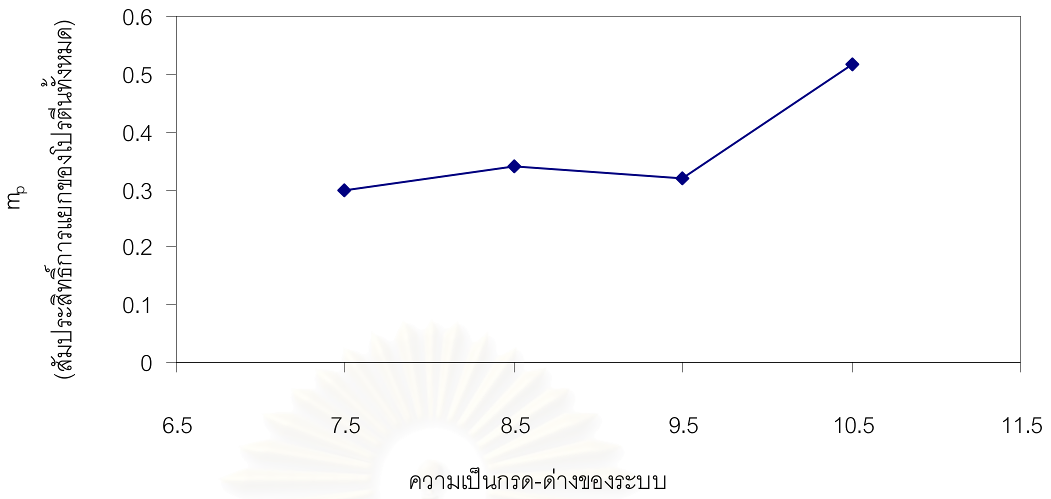
การปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในกรณีที่เป็นพอลิเมอร์-พอลิเมอร์ คือการปรับเปลี่ยนสัดส่วนของบัฟเฟอร์ที่เติมในระบบ ในกรณีของงานวิจัยนี้มีระบบเป็นพอลิเมอร์กับเกลือ (โพแทสเซียมฟอสเฟต) ดังนั้นการปรับเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่างสามารถทำได้โดยการเปลี่ยนสัดส่วนของ $K_2HPO_4$ และ $KH_2PO_4$ และปริมาณของโพแทสเซียมฟอสเฟตซึ่งเป็นองค์ประกอบของระบบ โดยค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบจะสูงขึ้นเมื่อสัดส่วนของ $K_2HPO_4$ และ $KH_2PO_4$ มากขึ้น ดังนั้นจะพบว่าการปรับเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่างจะส่งผลต่อคุณสมบัติสองประการของวัฏภาค ประการแรกคือ คุณสมบัติทางกายภาพของวัฏภาค โดยสัดส่วน $K_2HPO_4$ และ $KH_2PO_4$ ที่เปลี่ยนแปลงทำให้องค์ประกอบของระบบและวัฏภาคเปลี่ยน โดยโพแทสเซียมฟอสเฟตที่เพิ่มขึ้นทำให้ความหนาแน่นของวัฏภาคล่างมีค่ามากขึ้น ส่งผลให้การแยกตัวของวัฏภาคเร็วขึ้น นอกจากนี้ปริมาตรน้ำที่เอนไซม์สามารถละลายอยู่ได้ก็น้อยลงและจะส่งผลให้เอนไซม์ถูกผลักไปอยู่ในวัฏภาคบนมากขึ้น ตามปรากฏการณ์ '' salting – out '' (Sebastiao และคณะ,1996) ประการที่สอง คือ คุณสมบัติทางเคมี นั่นคือ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงไป จะเหนี่ยวนำให้ประจุมวลรวมของโมเลกุลของตัวถูกละลายเปลี่ยนไปด้วย ซึ่งจะส่งผลต่อแรงกระทำระหว่างตัวถูกละลายแต่ละชนิดและแรงกระทำระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายและโมเลกุลของพอลิเมอร์หรือเกลือที่มีในวัฏภาคเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นจากเหตุผลที่คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของวัฏภาคเปลี่ยนแปลงไป จึงส่งผลให้การแยกของตัวถูกละลายต่างชนิดกันที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างกันมีความแตกต่างกัน ดังนั้นจะเห็นได้ว่าค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นปัจจัยสำคัญซึ่งมีอิทธิพลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์ จากผลการทดลองในรูปที่ 5.2 พบว่า สัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอสจะมีค่าลดลงเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเพิ่มขึ้น โดยค่าสัมประสิทธิ์การแยกจะลดลงถึง 78.4 เปอร์เซนต์ เมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้นจาก 7.5 เป็น 10.5 รูปที่ 5.3 แสดงอิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีน (ซึ่งเป็นสารปนเปื้อน) ซึ่งให้ผลในทางตรงข้ามกับกรณีของแอลคาไลน์โพรทีเอส โดยพบว่าเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเพิ่มขึ้นจาก 7.5 เป็น 10.5 ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีนจะมีค่าสูงขึ้นถึง 42.2 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากโปรตีนที่ปนเปื้อนในระบบมีอยู่มากมายหลายชนิด ซึ่ง

จะมีความแตกต่างจากแอลคาไลน์โพรทีเอสทั้งในแง่ของน้ำหนักโมเลกุล และแรงกระทำระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายและตัวทำละลาย (สมการ 3.2) แต่อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอสจะมีค่าสูงกว่าค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีน ถึงประมาณ 20 เท่า เมื่อพิจารณาที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5 และ ประมาณ 170 เท่า เมื่อพิจารณาที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.5 แสดงให้เห็นว่าระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีองค์ประกอบดังที่พิจารณาในงานวิจัยนี้มีความสามารถในการสกัดแยกแอลคาไลน์โพรทีเอสออกจากเอนไซม์ปนเปื้อนชนิดอื่นได้ค่อนข้างดี

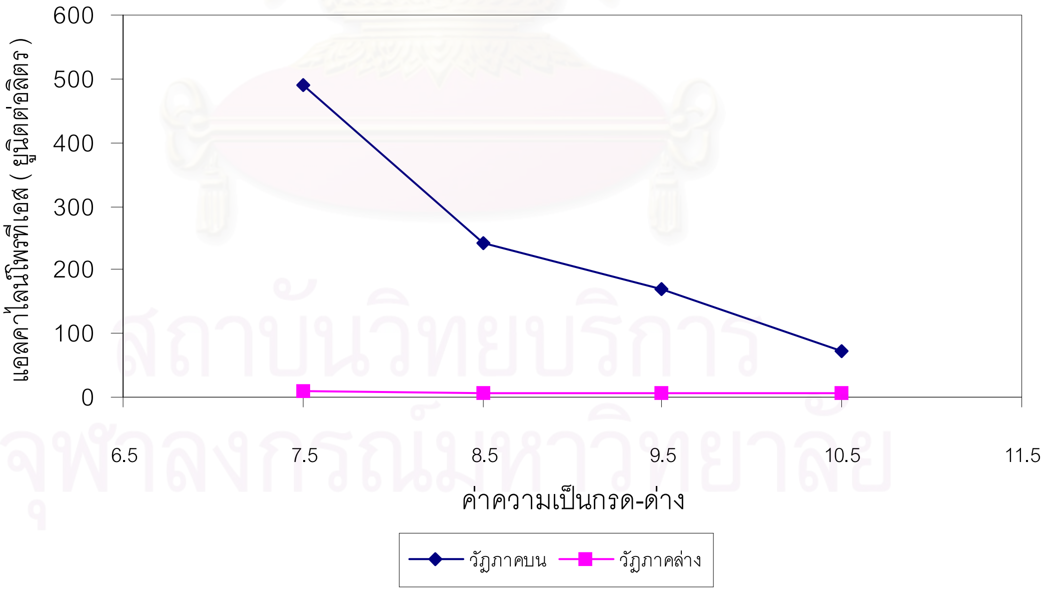
รูปที่ 5.4 แสดงถึงอิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบต่อความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสในแต่ละวัฏภาค โดยพบว่าความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคบน (จะมี PEG 1000 อยู่มาก) มีค่าลดลงเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเพิ่มขึ้น โดยที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง แทบไม่มีผลต่อค่าความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคล่าง (ซึ่งมีโพแทสเซียมฟอสเฟตอยู่มาก) เลย เป็นที่น่าสังเกตว่าในแต่ละชุดทดลอง เราเริ่มต้นด้วยปริมาณแอลคาไลน์โพรทีเอสที่เท่าๆ กัน (โดยมีองค์ประกอบของน้ำหมักเท่ากับ 20%(w/w) ในทุกค่าความเป็นกรด-ด่าง แต่ค่ากิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอส (หรือความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอส) ที่วัดได้




รูปที่ 5.2 อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกแอลคาไลน์โพรทีเอส ที่ปริมาณน้ำหมัก 20% (w/w) ที่อุณหภูมิและความดันบรรยากาศ

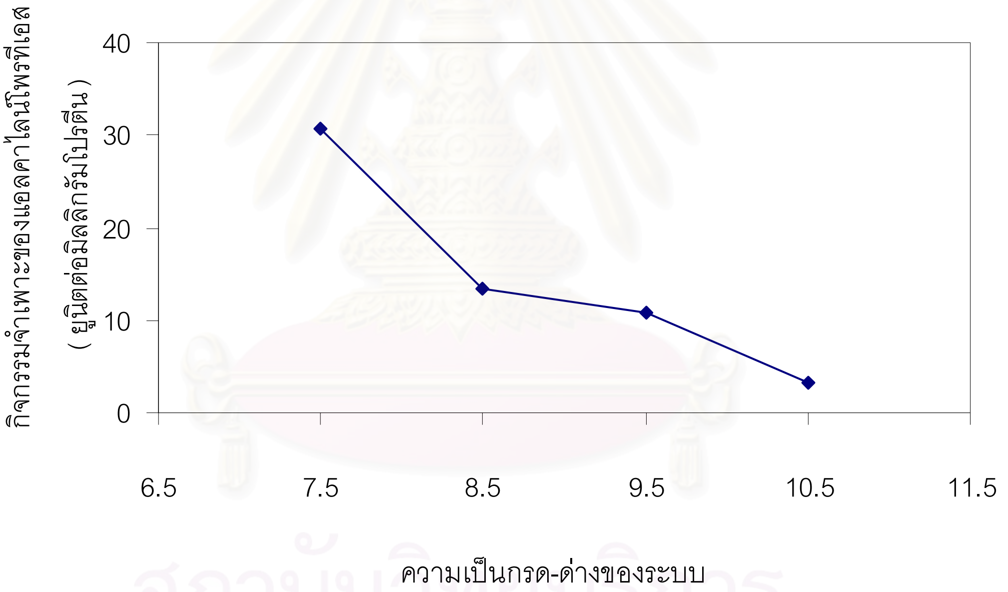



รูปที่ 5.3 อิทธิพลค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีนทั้งหมด ที่ปริมาณน้ำหนัก 20% (w/w) ที่อุณหภูมิและความดันบรรยากาศ




รูปที่ 5.4 อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่มีผลต่อกิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคบนและล่างที่ปริมาณน้ำหนัก 20% (w/w) ที่อุณหภูมิห้องและความดันบรรยากาศ

กลับลดลงเมื่อความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะระบบที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้นจะมีปริมาณของโพแทสเซียมฟอสเฟตเพิ่มขึ้นด้วย ทำให้ปริมาณน้ำที่เหลืออยู่สำหรับทำละลายแอลคาไลน์โพรทีเอสมีน้อยลง จึงอาจเกิดการตกตะกอนของเอนไซม์บางส่วนขึ้น (sebastiao และคณะ 1996) เป็นผลทำให้ปริมาณเอนไซม์ที่วัดได้ที่ภาวะสมดุลมีค่าน้อยกว่าเมื่อเริ่มต้น นอกจากนี้การเกิดแผ่นฟิล์มบางๆ ที่มีลักษณะเป็นฝ้าสีขาวๆ ตรงผิวสัมผัสระหว่างวัฏภาค (interface layer) ซึ่งสามารถเห็นได้ด้วยตา อาจจะทำให้มวลรวมของเอนไซม์ของระบบไม่สมดุลเมื่อคิดเทียบกับปริมาณเริ่มต้นที่เติมลงไปในระบบ ทั้งนี้ในแต่ละการทดลองจะมีฝ้าเกิดขึ้นไม่เท่ากัน ดังนั้นการเกิดฝ้าตรงผิวสัมผัสระหว่างวัฏภาคจึงอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้กราฟรูปที่ 5.4 มีมวลรวมของแต่ละระบบไม่เท่ากัน และเมื่อนำค่ากิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคบนในรูปที่ 5.4 หารด้วยปริมาณโปรตีนที่วัดได้ในวัฏภาคบน (ภาคผนวก ค) จะได้ค่ากิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอส ซึ่งแสดงดังรูปที่ 5.5




รูปที่ 5.5 อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีผลต่อกิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคบน มีปริมาณน้ำหมัก 20% (w/w) ที่อุณหภูมิห้องและความดันบรรยากาศ

ค่ากิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอส เป็นค่าที่แสดงถึงปริมาณของแอลคาไลน์โพรทีเอสต่อปริมาณโปรตีน ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ต่อโปรตีนทั้งหมดที่มีอยู่ แต่อาจจะยังมีสารปนเปื้อนอื่นๆนอกจากโปรตีนที่มีอยู่ในน้ำหมัก ซึ่งอาจจะปนเปื้อนอยู่ในวัฏภาค

บนกับแอลคาไลน์โพรทีเอส เช่น สารตั้งต้นในการหมัก เช่น กลูโคส แมกนีเซียมซัลเฟต แคลเซียม-ไดคลอไรด์ ซึ่งไม่ได้ทำการศึกษา ณ ที่นี้ รูปที่ 5.5 แสดงค่ากิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคบน ซึ่งมีค่าสูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5 ดังนั้น จากกราฟรูปที่ 5.2 และ 5.5 สามารถสรุปได้ว่า ที่ความเป็นกรด-ด่าง 7.5 เป็นภาวะที่ให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกแอลคาไลน์โพรทีเอสและค่ากิจกรรมจำเพาะสูงที่สุด จึงจะนำภาวะนี้ไปทำการทดลองเพื่อหาปริมาณน้ำหมักและสัดส่วนโดยปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างที่เหมาะสม ในการแยกแอลคาไลน์โพรทีเอสจากเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 ต่อไป

### 5.1.2 อิทธิพลของปริมาณน้ำหมักที่เติมในระบบและสัดส่วนโดยปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่าง

เส้นผูกที่เชื่อมองค์ประกอบของวัฏภาคบนและวัฏภาคล่างเป็นจุดที่อยู่ในภาวะสมดุล ทุกจุดบนเส้นผูกเดียวกันจะมีสัดส่วนเชิงปริมาตรของแต่ละวัฏภาคต่างกัน แต่องค์ประกอบของแต่ละวัฏภาคเท่ากัน ดังนั้นระบบที่อยู่บนเส้นผูกเดียวกันควรจะให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกเท่ากัน แต่เปอร์เซนต์ผลได้จะต่างกันซึ่งขึ้นอยู่กับสัดส่วนปริมาตรของระบบ ดังสมการที่ 5.1 (Kula และ คณะ 1982) เมื่ออ้างอิงวัฏภาคบน

$$Y_1(\%) = \frac{100}{1+\frac{V_2}{V_1}\frac{1}{m}} \qquad 5.1$$

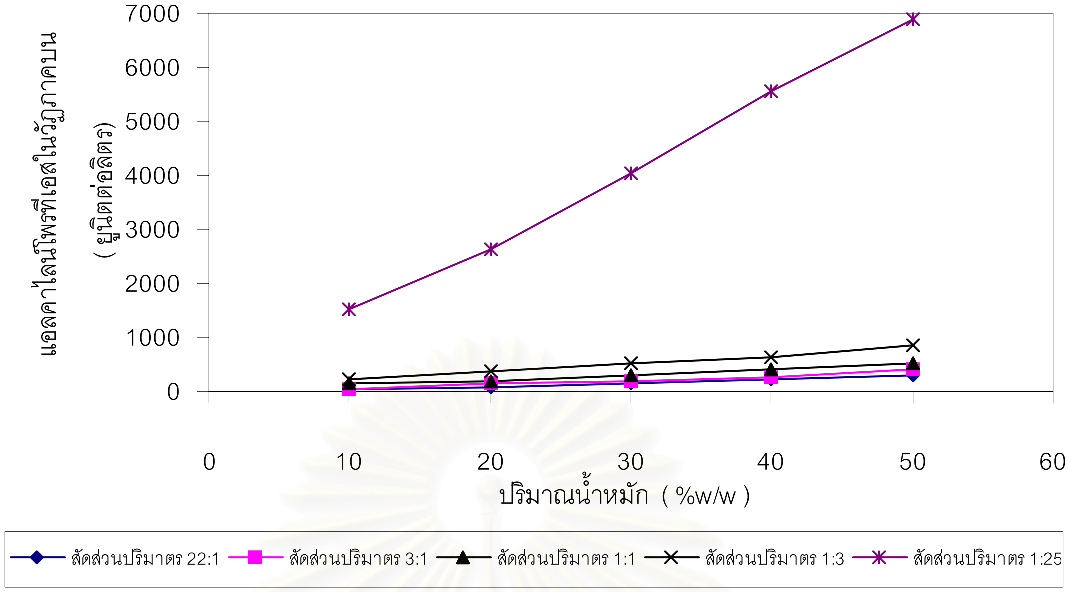
ค่าสัมประสิทธิ์การแยก เป็นค่าคงที่สมดุลค่าหนึ่งที่คำนวณจากภาวะสมดุล ซึ่งมี 3 ปัจจัยที่มีอิทธิพลโดยตรงต่อค่านี้ คือ อุณหภูมิ ความดัน องค์ประกอบของระบบ โดยปัจจัยทางเคมีและกายภาพอื่นๆ เช่น ชนิด น้ำหนักโมเลกุล และความเข้มข้นของพอลิเมอร์หรือของเกลือต่อการเกิดวัฏภาค ค่าความเป็นกรด-ด่าง ชนิดและความเข้มข้นของสารเติมแต่ง ฯลฯ เป็นปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะและคุณสมบัติของตัวถูกละลายซึ่งเป็นอิทธิพลที่ทำให้ตัวถูกละลายกระจายเข้าไปแต่ละวัฏภาคแตกต่างกันออกไป จากการทดลองนี้ทำที่ภาวะอุณหภูมิห้องและความดันบรรยากาศ ดังนั้นองค์ประกอบจึงเป็นอิทธิพลเดียวที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกที่สมดุล

ในการทดลองนี้เป็นการหาปริมาณน้ำหมักที่เติมไปในระบบที่เหมาะสมโดยทำการทดลองควบคู่ไปกับการหาสัดส่วนโดยปริมาตรของวัฏภาคบนและวัฏภาคล่างที่เหมาะสม โดยปริมาณของน้ำหมักที่เปลี่ยนไปในระบบจะใส่แทนที่ปริมาณน้ำ ดังนั้นเมื่อปริมาณน้ำหมักเพิ่มขึ้นก็จะทำให้

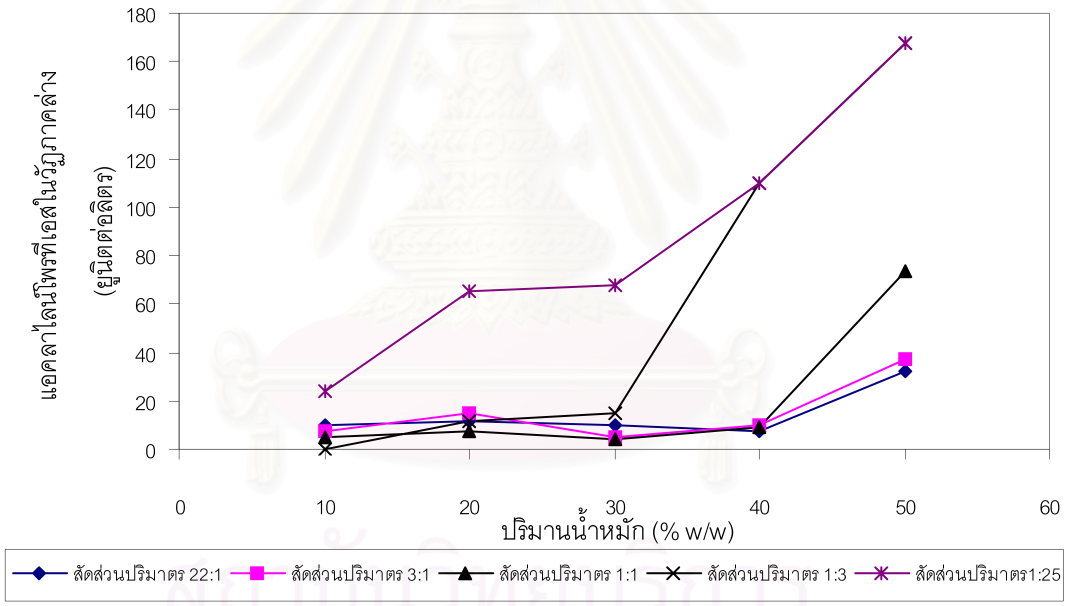
ปริมาณน้ำที่ต้องเติมลดลง เพื่อยังคงรักษาให้ทุกการทดลองมีน้ำหนักของระบบรวมเท่ากันหมด ดังนั้นปริมาณน้ำหมักที่เติมลงไปจะมีผลต่อองค์ประกอบทางเคมี คือ จากที่กล่าวแล้วว่าในน้ำหมักประกอบด้วยโมเลกุลของชีวโมเลกุลหลายชนิด ดังนั้นน้ำหมักที่เข้มข้นในระบบจะทำให้แรงกระทำระหว่างโมเลกุลชนิดเดียวกันและระหว่างโมเลกุลของตัวถูกละลายมากขึ้น โดยความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคบนจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อลดสัดส่วนโดยปริมาตรของวัฏภาคบนและวัฏภาคล่างที่ทุกปริมาณน้ำหมัก แต่จะมีค่าลดลงเมื่อลดปริมาณน้ำหมัก เพื่อคงให้สัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนและวัฏภาคล่างคงที่ แสดงดังกราฟรูปที่ 5.6 (a)

รูปที่ 5.6 (b) แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของอัตราส่วนเชิงปริมาตรของทั้งสองวัฏภาค และปริมาณน้ำหมักที่มีผลความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคล่าง จะเห็นว่าความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่สัดส่วนเชิงปริมาตร 1:25 จะมีค่าสูงกว่าที่สัดส่วนอื่นๆ อย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้เป็นเพราะที่สัดส่วนเชิงปริมาตร 1:25 จะประกอบด้วยวัฏภาคล่างในปริมาตรที่สูง ทำให้มีปริมาณของแอลคาไลน์โพรทีเอสมากตามไปด้วย อย่างเห็นได้ชัด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




(a)

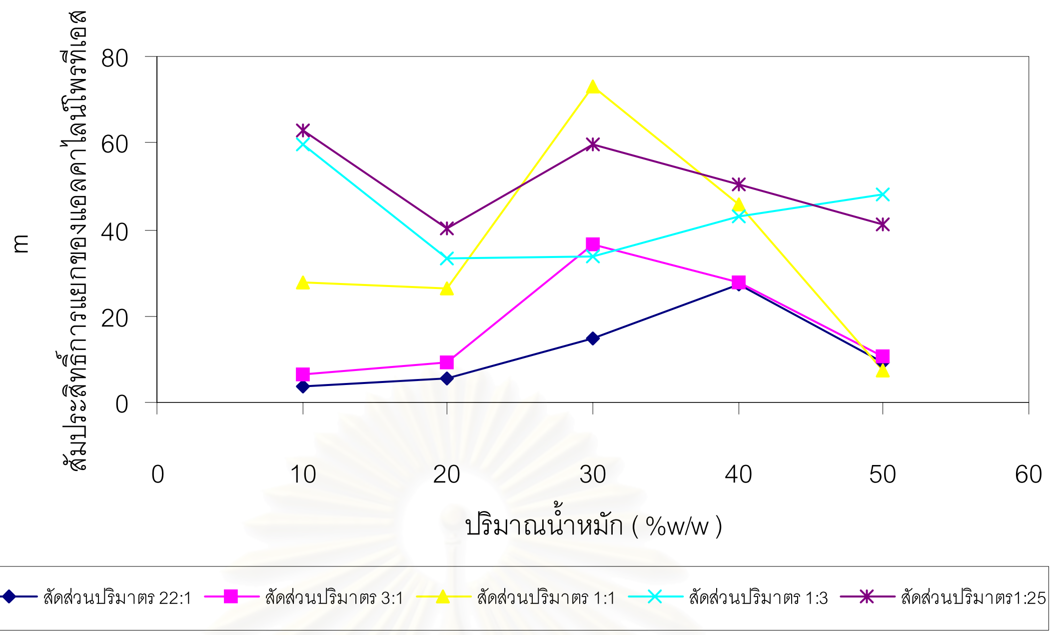



(b)

รูปที่ 5.6 อิทธิพลของสัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่าง และปริมาณน้ำหมักที่มีผลต่อผลของกิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคบน(a) และวัฏภาคล่าง(b) ที่อุณหภูมิห้องและความดันบรรยากาศ

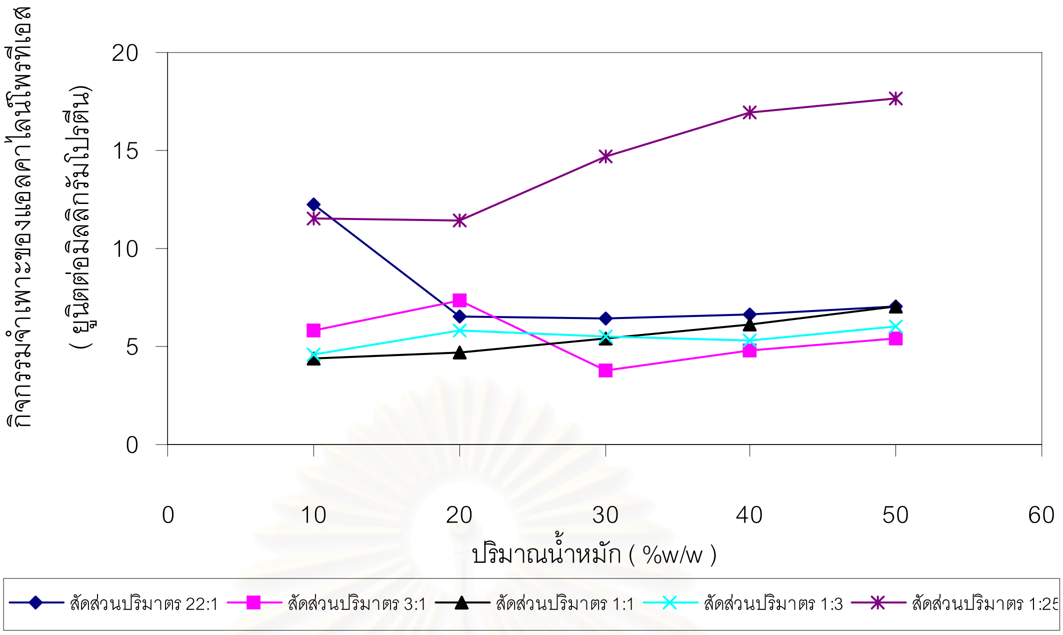
รูปที่ 5.7 แสดงค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ค่าปริมาณน้ำหนักและสัดส่วนเชิงปริมาตรที่แตกต่างกัน ผลการทดลองที่ได้ ไม่ได้ปรากฏแนวโน้มที่ชัดเจนพอที่จะอธิบายได้มากนัก แต่พบว่าที่สัดส่วนเชิงปริมาตร 1:25 จะให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกเฉลี่ยประมาณ 50 ในขณะที่สัดส่วนปริมาตร 22:1 จะให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกเฉลี่ยประมาณ 10 จะเห็นได้ชัดว่าแม้ว่าในแต่ละระบบจะมีองค์ประกอบของแต่ละวัฏภาคเหมือนกัน ต่างกันเพียงสัดส่วนเชิงปริมาตร แต่ค่าสัมประสิทธิ์การแยกที่ได้มีค่าแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยได้ทำการทดลองกวนระบบเป็นเวลา 40 นาทีเพื่อทดสอบว่าแอลคาไลน์โพรทีเอสมีเวลาเพียงพอสำหรับการถ่ายเทมวลก่อนที่จะเข้าสู่สมดุลด้วยการเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที (Forciniti และ Hall, 1991; Lee และ Chang และ คณะ 1990; Schmidt และ คณะ, 1995; Sebastiao และ คณะ, 1994; Sebastiao และ คณะ;1996; Videira และ Aires-Barros,1994; Yang และ คณะ, 1994) ซึ่งพบว่า ที่ภาวะสมดุลให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกที่ไม่แตกต่างกันมากนัก (ไม่ได้รายงานผลไว้ในงานวิจัยนี้) เมื่อเวลาเปลี่ยนแปลงไป 40 นาที ดังนั้นเราจึงค่อนข้างมั่นใจว่าค่าสัมประสิทธิ์ที่เปลี่ยนแปลงเมื่อสัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างเปลี่ยนไม่ได้เกิดจากการที่แอลคาไลน์โพรทีเอสถ่ายเทมวลได้ไม่เท่ากันก่อนที่จะเข้าสู่สมดุล ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hotha และ Banik (1996) และ Sebastiao และ คณะ (1996) โดย Sebastiao และ คณะ (1996) ให้เหตุผลว่าความแตกต่างของค่าสัมประสิทธิ์การแยกที่พบกับระบบที่อยู่บนเส้นผูกเดียวกัน อาจเนื่องมาจากความสามารถในการละลายเอนไซม์ที่แตกต่างกันของแต่ละระบบ แต่ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณเอนไซม์รวมที่พิจารณาในทั้งระบบ ปริมาณเอนไซม์ที่เข้าไปเกินความสามารถในการละลายของระบบ จึงอาจเกิดการตกตะกอนได้ ทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกที่วัดได้มีค่าแตกต่างกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



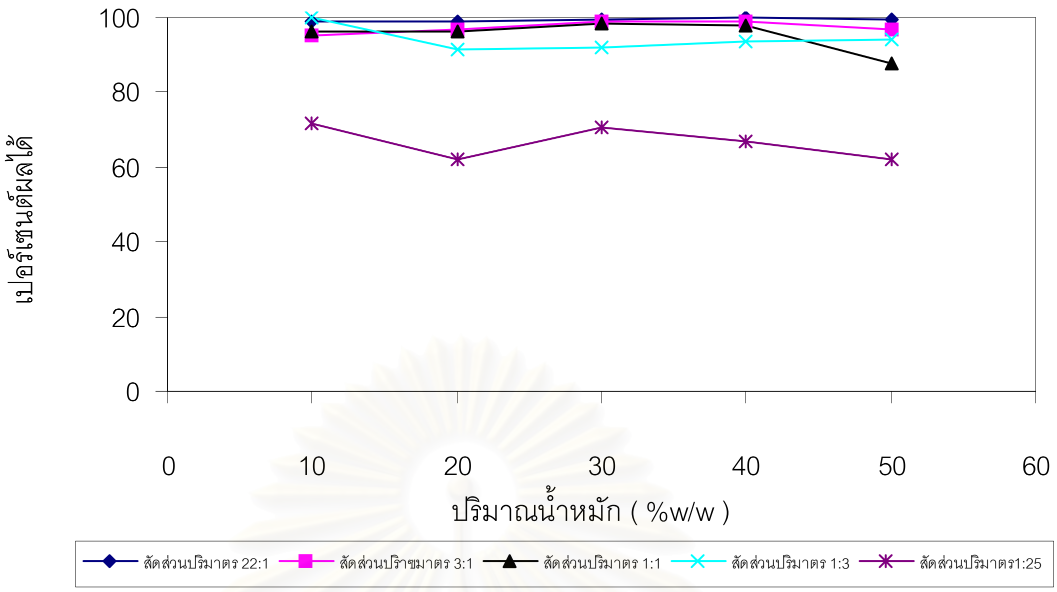

รูปที่ 5.7 อิทธิพลของสัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่าง และปริมาณน้ำหมักที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอส ที่อุณหภูมิห้องและความดันบรรยากาศ

รูปที่ 5.8 แสดงกิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคบนที่สัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างที่แตกต่างกัน ที่สัดส่วนเชิงปริมาตรเท่ากับ 22:1, 3:1, 1:1 1:3 จะมีค่ากิจกรรมจำเพาะไม่แตกต่างกันมากนักตลอดทุกช่วงของปริมาณน้ำหมัก ซึ่งหมายถึงว่าปริมาณน้ำหมักที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้การแยกแอลคาไลน์โพรทีเอสและของโปรตีนทั้งหมดเป็นไปในทิศทางเดียวกัน จึงทำให้ค่ากิจกรรมจำเพาะมีค่าค่อนข้างคงที่ ค่ากิจกรรมจำเพาะของแต่ละสัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างค่อนข้างคงที่ค่อนไปทางลดลงเล็กน้อย ในขณะที่กิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคบนที่สัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างเท่ากับ 1:25 มีค่ามากที่สุดและมีค่ามากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อปริมาณน้ำหมักเพิ่มขึ้น




รูปที่ 5.8 อิทธิพลของสัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างและปริมาณน้ำหมักที่มีผลต่อค่ากิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคบน ที่อุณหภูมิห้องและความดันบรรยากาศ

ซึ่งแสดงว่าที่สัดส่วนเชิงปริมาตรเท่ากับ 1:25 ความเข้มข้นของน้ำหมักมีอิทธิพลต่อการแยกแอลคาไลน์โพรทีเอสมากกว่าโปรตีนที่ปนเปื้อน ค่าเปอร์เซนต์ผลได้ของแอลคาไลน์โพรทีเอสคำนวณได้จากสมการที่ 5.1 แสดงให้เห็นในรูปที่ 5.9 จากผลการทดลองจะเห็นว่าเปอร์เซนต์ผลได้ที่สัดส่วนเชิงปริมาตร 1:25 มีค่าน้อยกว่าที่สัดส่วนอื่นๆ ถึงประมาณ 20 เปอร์เซนต์ โดยที่สัดส่วนเชิงปริมาตรที่เพิ่มขึ้นจาก 1:3 เป็น 22:1 แทบจะไม่มีผลต่อค่าเปอร์เซนต์ผลได้มากนัก




รูปที่ 5.9 อิทธิพลของสัดส่วนโดยปริมาตรของวัฏภาคบนและวัฏภาคล่าง และปริมาณน้ำหมักที่มีผลต่อค่าเปอร์เซนต์ผลได้ของแอลคาไลน์โพรทีเอส ที่อุณหภูมิห้องและความดันบรรยากาศ

ดังนั้นจากค่ากิจกรรมจำเพาะและค่าเปอร์เซนต์ผลได้ ภาวะที่สัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนและวัฏภาคล่างเท่ากับ 1:25 และน้ำหมักเท่ากับ 50 เปอร์เซนต์ให้ค่าบริสุทธิ์ของแอลคาไลน์โพรทีเอสสูงสุด (ค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 17.7 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) แต่ให้เปอร์เซนต์ผลได้ต่ำมาก (62.2 เปอร์เซนต์) ซึ่งจุดที่มีสัดส่วนปริมาตรเท่ากับ 1:25 และมีน้ำหมักเท่ากับ 30.0 เปอร์เซนต์ ให้เปอร์เซนต์ผลได้สูงกว่าที่น้ำหมักเท่ากับ 50 เปอร์เซนต์ ถึง 8.0 เปอร์เซ็นต์ แต่พบว่าค่ากิจกรรมจำเพาะมีค่าต่ำกว่าจุดที่น้ำหมักเท่ากับ 50 เปอร์เซนต์ ถึง 16.7 เปอร์เซนต์ จึงควรเลือกจุดที่มีสัดส่วนโดยปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่าง เท่ากับ 1:25 และมีปริมาณน้ำหมักเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก นำไปคัดเลือกและออกแบบหอสกัดต่อไป

## 5.2 การเลือกชนิดและออกแบบหอสกัด

### 5.2.1 การเลือกชนิดของหอสกัด

จากการค้นคว้าของผู้ทำวิจัย พบว่าหนังสือส่วนใหญ่ (Arthayukti,1998; Laddha และ Ernest ,1978; McCabe และ คณะ, 1993; Seader,1997; Walas,1988) จะกล่าวถึงหอสกัดแต่ละชนิดและข้อดีข้อเสียรวมถึงวิธีเลือกชนิดของหอสกัดอย่างคร่าวๆ ไม่มีหลักการเลือกหรือออกแบบหอสกัดที่เป็นกฎเกณฑ์แน่นอน ซึ่งจากการค้นคว้าของผู้ทำการวิจัยพบว่า Thornton (1992) ได้เสนอหลักการเลือกและออกแบบหอสกัดได้ละเอียดกว่าหนังสือเล่มอื่น ซึ่งมีปัจจัยที่ใช้ในการพิจารณาและเลือกหอสกัดตามตารางที่ 2.1 ซึ่งแสดงค่าปัจจัยต่างๆที่ต้องใช้ในการพิจารณาโดยระบุเลขที่หัวข้อด้วยตัวเลขของพารามิเตอร์ตามตารางที่ 2.1 เพื่อความง่ายในการพิจารณาเปรียบเทียบค่ากับตารางที่2.1

<u>ข้อมูลที่นำมาพิจารณาและเลือกชนิดของหอสกัด</u>

1.ปริมาตรไหลผ่านทั้งหมด $\leq 0.25\ m^3/h$

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการทดลองในหอสกัดขนาดห้องปฏิบัติการ ดังนั้นจะมีปริมาตรไหลผ่านทั้งหมดน้อยกว่า 250 ลิตรต่อชั่วโมง (0.25 ลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมง) ซึ่งเป็นระดับต่ำสุดที่ได้มีการกำหนดไว้ในตารางที่ 2.1

2. จำนวนขั้นตอนสมดุล ( Number of theoretical stage, NTS) : มากกว่า 1

จำนวนขั้นตอนสมดุล เป็นปัจจัยหนึ่งที่ควรได้จากการดำเนินการในหอสกัดหรือเกิดจากการกำหนดคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการสกัดแล้ว ซึ่งในงานวิจัยนี้ยังไม่มีการกำหนดคุณสมบัติของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ผ่านหอสกัดว่าควรมีความเข้มข้นหรือความบริสุทธิ์ระดับใด ดังนั้นจึงยังไม่ทราบว่าจำนวนขั้นตอนที่สมดุลที่ต้องการใช้ในการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสควรอยู่ในช่วงใด และจากตารางที่ 2.1 พบว่าหอสกัดแต่ละชนิดมีช่วงของจำนวนขั้นตอนที่สมดุลที่เหมาะสมแตกต่างกัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงกำหนดให้จำนวนขั้นตอนสมดุลที่จะใช้ในการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสควรมีค่ามากกว่า 1 จำนวนขั้นตอนสมดุล ทั้งนี้เพื่อต้องการให้หอสกัดที่จะออกแบบให้สามารถยืดหยุ่นในการใช้งานได้

3. คุณสมบัติทางกายภาพ

คุณสมบัติทางกายภาพที่สามารถวัดได้จากวัฏภาคทั้งสอง คือ ผลต่างของความหนาแน่นของวัฏภาคบนและวัฏภาคล่าง จากระบบซึ่งประกอบด้วย PEG 1.7 เปอร์เซนต์ และ โพแทสเซียมฟอสเฟต 27 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5 โดยการดึงปริมาตรของวัฏภาคบนและวัฏภาคล่างไปชั่งน้ำหนัก พบว่ามีความหนาแน่นเท่ากับ 1,021.8 และ 1,250.8 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร ตามลำดับ ดังนั้นผลต่างของความหนาแน่นของวัฏภาคทั้งสองเท่ากับ 229 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร

6. สัดส่วนของอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่อวัฏภาคต่อเนื่อง :0.04 (1:25)

สัดส่วนของอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่อวัฏภาคต่อเนื่อง เป็นข้อมูลหนึ่งที่ใช้ในการพิจารณาและเลือกชนิดของหอสกัดตามตารางที่ 2.1 และเป็นข้อมูลที่ควรได้จากการดำเนินการในหอสกัด แต่เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลนี้ ดังนั้นจึงใช้สัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างที่ภาวะเหมาะสมที่สุดต่อการแยกแอลคาไลน์โพรทีเอสในบีกเกอร์ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.04 แทนสัดส่วนของอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่อวัฏภาคต่อเนื่อง เพื่อใช้เป็นแนวทางในการเลือกชนิดของหอสกัด

8. ปริมาณของแข็งในระบบ : พอสมควร

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการแยกแอลคาไลน์โพรทีเอสจากน้ำหมัก ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่ามีเศษเซลล์ของแบคทีเรียตกค้างอยู่หลังจากการเหวี่ยงแยกน้ำหมักออกจากเซลล์แบคทีเรียแล้ว ประกอบกับต้องการออกแบบหอสกัดให้มีความยืดหยุ่นกับการใช้งาน ถ้าต้องการศึกษาระบบที่มีปริมาณของแข็งในระบบก็สามารถใช้หอสกัดนี้ได้ ดังนั้นจึงเลือกระดับปริมาณของแข็งที่มีในระบบปริมาณพอสมควร

13. ความง่ายในการทำความสะอาด

เนื่องจากงานวิจัยนี้ศึกษาการแยกแอลคาไลน์โพรทีเอสจากน้ำหมักในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ซึ่งอาจจะทำให้หลังจากการดำเนินการสกัดแล้วอาจมีเศษเซลล์และน้ำหมักรวมถึงสารละลายน้ำของวัฏภาคทั้งสองติดอยู่ตามหอสกัด ประกอบกับน้ำหมักมีกลิ่นค่อนข้างแรง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่หอสกัดควรจะทำความสะอาดได้ง่าย

14. การดูแลรักษาและซ่อมบำรุงง่าย

ในหัวข้อนี้จะมีลักษณะของรายละเอียดคล้ายกับข้อที่ 13 ดังนั้นควรเลือกการดูแลรักษาและซ่อมบำรุงได้ง่ายเพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย

โดยจะพิจารณาปัจจัยในการเลือกชนิดของหอสกัดในข้อ 3 ก่อน เหตุที่ไม่พิจารณาร่วมกับปัจจัยอื่น เนื่องจากความแตกต่างของความหนาแน่นระหว่างวัฏภาคที่วัดได้ไม่ได้อยู่ในช่วงที่ใช้พิจารณาในตารางที่ 2.1 ซึ่งความแตกต่างของความหนาแน่นระหว่างวัฏภาคที่วัดได้มีค่ามาก คือ 299 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร ทำให้วัฏภาคแยกตัวออกจากกันได้เร็ว ดังนั้นจึงจะคัดหอสกัดที่เหมาะสมกับระบบที่วัฏภาคทั้งสองมีความแตกต่างของความหนาแน่นน้อยและแยกตัวได้ช้าออก ซึ่งได้แก่ คอลัมน์ที่ไม่มีเครื่องกลเข้ามาช่วยทุกชนิด, RTL และ หอสกัดแบบหมุนเหวี่ยง (Centrifuge extractor) ออก

เมื่อตรวจสอบคุณสมบัติของปัจจัยกับหอสกัดที่เหลือจากการคัดออกแล้วพบว่ามี ‘U’ ซึ่งมีความหมายว่าไม่เหมาะสมในหอสกัดชนิดใดต้องคัดหอสกัดชนิดนั้นออก เนื่องจากมีคุณสมบัติบางพารามิเตอร์ไม่เหมาะสมกับความต้องการของการทำวิจัย ซึ่งแสดงชนิดของหอสกัดที่ถูกคัดออกดังตารางที่ 5.1 หลังจากนั้นก็เลือกหอสกัดที่มีความเหมาะสมมากที่สุด ซึ่งแสดงในตารางที่ 5.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.1 ชนิดของหอสกัดที่ถูกคัดออกเนื่องจากคุณสมบัติของปัจจัยไม่เหมาะสมกับความต้องการที่จะออกแบบ

| Ref | ชนิดของเครื่องสกัด | ไม่เหมาะสมกับข้อมูลในข้อที่ |
|---|---|---|
| Ac1(i) | Scheibel | 8, (13) |
| Ac1(ii) | Asymmetric RDC | (8) |
| Ac2(ii) | Rotary film | (1) |
| Ac3(i),(iii) | Pump-settler | 1, (6), (8) |
| Ac3(ii),(iv) | Mixer-settler | (8) |

หมายเหตุ หัวข้อที่อยู่ในวงเล็บ เป็นหัวข้อที่ให้ระดับของความเหมาะสมต่อหอสกัดเป็นค่า 'D' ซึ่งหมายความว่า อาจมีปัญหาถ้าเลือกหอสกัดชนิดนี้ ดังนั้นต้องศึกษารายละเอียดอื่นเพิ่มเติม และหัวข้อที่ไม่อยู่ในวงเล็บให้ค่า 'U'

ตารางที่ 5.2 หอสกัดที่เหลือจากการคัดออกและจะถูกประเมิน

| Ref | ชนิดเครื่องสกัด | ปัจจัยที่ใช้ในการพิจารณา | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 6 | 8 | 13 | 14 |
| Ab1(i) | Rotary disc | S | S | P | P | S | S |
| Ab1(ii) | Multi-impeller(Oldshue Rushton) | S | S | P | P | S | S |
| Ab1(iii) | Kuhni | S | S | P | P | P | S |
| Ab2(I) | Pulsed plate | S | S | P | P | S | S |
| Ab2(ii) | Reciprocating plate | S | S | P | P | S | S |

หมายเหตุ S หมายถึง มีความเหมาะสม

P หมายถึง มีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้กับปัจจัยที่ใช้ในการพิจารณา

จากตารางที่ 5.2 เมื่อพิจารณาปัจจัยที่ใช้ในการสกัดพบว่า หอสกัดแบบ Kuhni เป็นหอสกัดที่มีคุณสมบัติด้อยกว่าหอสกัดชนิดอื่น ทั้งนี้เนื่องจากเป็นหอสกัดที่ทำความสะอาดยากกว่าหอสกัดชนิดอื่น ดังนั้นจึงเหลือหอสกัดอีก 4 ชนิดที่มีระดับของคุณสมบัติของปัจจัยเท่ากัน คือ RDC, Mutti-impeller (Oldshue Rushton) , Pulsed plate และ Reciprocating plate โดย Pulsed

plate เป็นหอสกัดแบบมีแรงกลภายในหอสกัดชนิดเดียวที่ไม่มีส่วนประกอบของแกนใบพัดจึงไม่ต้องถอดแกนใบพัดออกมาทำความสะอาด ซึ่งอาจเป็นเหตุผลนี้ที่ส่วนใหญ่นิยมใช้งานในอุตสาหกรรมนิวเคลียร์ แต่อย่างไรก็ตามมักมีปัญหาทางเทคนิค อย่างเช่น การเพิ่มปริมาตรของ pulsed ให้มากขึ้นเป็นไปได้ยาก ซึ่งจากเหตุผลนี้อาจทำให้หอสกัดชนิดนี้ไม่เป็นที่นิยมในอุตสาหกรรมอื่น ส่วน Reciprocating plate เป็นหอสกัดที่ยุ่งยากในการสร้างเครื่องมือ เนื่องจากต้องให้แรงกลที่ทำให้ plate เคลื่อนที่ขึ้นลง และเป็นที่นิยมน้อยกว่าหอสกัดแบบที่มีใบพัดในหอสกัด หอสกัดที่เหลือ คือ RDC และ Oldshue Rushton ซึ่งเป็นหอสกัดแบบที่มีแรงกลจากใบกวนเหมือนกันนอกจากนี้ยังมีวงแหวนที่มีลักษณะเหมือนกันอีกด้วย ดังนั้นจึงสามารถเลือกหอสกัดชนิดใดก็ได้ แต่ในงานวิจัยนี้เลือกหอสกัดชนิด Oldshue Rushton เนื่องจากเป็นหอสกัดที่ได้รับการพัฒนาต่อมาจาก RDC และยังไม่ได้รับการวิจัยอย่างกว้างขวางมากนัก

5.2.2 การออกแบบหอสกัดแบบ Oldshue Rushton

เนื่องจากไม่มีรายละเอียดและหลักการในการออกแบบหอสกัดที่เป็นการทดลองขนาดห้องปฏิบัติการมากนัก โดย Thronton (1992) ได้เสนอแนะหลักการออกแบบหอสกัดแบบ Oldshue Rushton ซึ่งพอให้เป็นแนวทางในการออกแบบ โดยมีสูตรการคำนวณดังนี้

$$\begin{aligned} d_r/d_c &= 0.33-0.5 \\ d_s/d_c &= 0.35-0.55 \\ w_b/d_c &= 0.08 \\ h_c/d_c &= 0.4-0.6 \end{aligned} \qquad 2.8$$

จากที่กล่าวมาแล้วว่า มีหนังสือและงานวิจัยที่กล่าวถึงหลักการออกแบบหอสกัดน้อยมากและจากหนังสือของ Thronton (1992) ซึ่งได้กล่าวถึงงานวิจัยต่างๆที่ศึกษาภาวะและการดำเนินการในหอสกัด แบบ Oldshue Rushton โดยงานวิจัยเหล่านี้จะกล่าวถึงเส้นผ่านศูนย์กลางของของหอสกัดที่ใช้ในดำเนินการสกัดแต่ไม่มีการกล่าวถึงความสูงหรือสัดส่วนของความสูงต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของหอสกัด ทั้งนี้เนื่องจากความสูงของหอสกัดที่ใช้จะขึ้นอยู่กับจำนวนขั้นตอนสมดุลที่ใช้ในการสกัดให้ได้คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการและพารามิเตอร์การถ่ายเทมวล โดยพารามิเตอร์การถ่ายเทมวลจะขึ้นอยู่กับระบบที่ใช้ในการสกัด ชนิดของสารที่ต้องการสกัดรวมถึงภาวะต่างๆที่ใช้ในการดำเนินการสกัด ซึ่งจะส่งผลให้ลักษณะการไหลภายในหอสกัดแตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อการถ่ายเทมวลที่จะเกิดขึ้นภายในหอสกัด และยังไม่มีหนังสือ

และงานวิจัยใดระบุแน่นอนว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของหอสกัดแบบ Oldshue Rushton มีใช้อยู่ในช่วงใด แต่ Thornton (1992) และ Walas(1988) ได้อ้างถึงงานวิจัยของ Stichlmair (1980) ว่าได้ศึกษาการสกัดในระบบ โทลูอีน อะซีโตน น้ำ ซึ่งมีสัดส่วนความเร็วในการไหลของวัฏภาคกระจายตัวต่อ วัฏภาคต่อเนื่องเท่ากับ 1.5 ในหอสกัดขนาดห้องปฏิบัติการชนิดต่างๆ โดยใช้เส้นผ่านศูนย์กลางของหอสกัดอยู่ใน ช่วง 5.0 ถึง 15.0 เซนติเมตร ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงจะกำหนดให้หอสกัดที่จะออกแบบมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 5.0 เซนติเมตร ซึ่งเป็นค่าต่ำสุดที่ Stichlmair (1980) ได้ทำการศึกษา แต่เนื่องจากความจำกัดของขนาดหอสกัดที่ทำจากอะคลีลิก ที่มีขายอยู่ทั่วไป ไม่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในเท่ากับ 5.0 เซนติเมตร ดังนั้นจึงกำหนดให้เส้นผ่านศูนย์กลางภายในหอสกัดที่ออกแบบมีขนาดเท่ากับ 4.6 เซนติเมตร ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับ 5.0 เซนติเมตรมากที่สุด

ดังนั้นเมื่อกำหนดให้เส้นผ่านศูนย์กลางภายในเท่ากับ 4.6 เซนติเมตร และกำหนดค่าของสมการที่ 2.8 ใหม่ดังนี้

$$\begin{aligned} d_r/d_c &= 0.4 \\ d_s/d_c &= 0.5 \\ w_b/d_c &= 0.08 \\ h_c/d_c &= 0.5 \end{aligned} \qquad 2.8$$

พบว่าหอสกัดจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัดเท่ากับ ($d_r$) 1.8 เซนติเมตร และเส้นผ่านศูนย์กลางภายในของวงแหวน ($d_s$) เท่ากับ 2.3 เซนติเมตร แบฟเฟิล ($w_b$) เท่ากับ 0.4 เซนติเมตร และเนื่องจากไม่มีข้อมูลการถ่ายเทมวลเบื้องต้นในหอสกัดแบบ Oldshue Rushton และงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจะหาภาวะเหมาะสมจากการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอส เพื่อที่จะสามารถนำภาวะที่เหมาะสมจากงานวิจัยนี้ไปคำนวณหาข้อมูลการถ่ายเทมวล เพื่อใช้ในการออกความสูงของหอสกัดที่ถูกต้อง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงกำหนดความสูงของหอสกัดเท่ากับ 50 เซนติเมตร โดยไม่ได้ตั้งอยู่บนข้อมูลการถ่ายเทมวลใดเลย และเนื่องจากสมการที่ 2.8 คำนวณได้เพียงเส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัด แต่ไม่สามารถบอกความกว้างสูงของครีบของใบพัดที่ติดอยู่กับจานของใบพัด ดังนั้นจึงจะใช้การออกแบบ turbine ของ Macabe (1993) ซึ่งมีสมการดังนี้

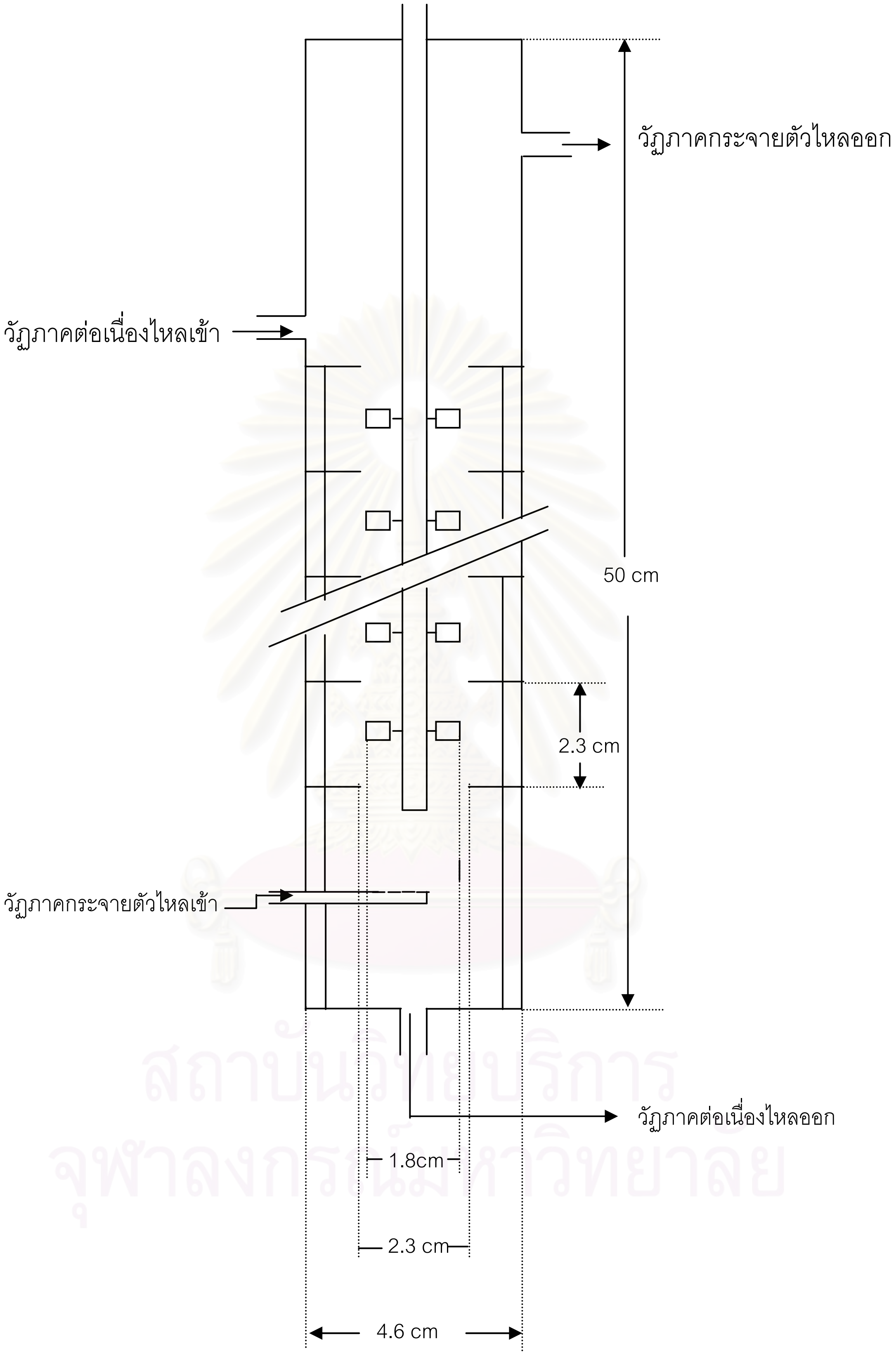
$$\frac{w}{d_r} = \frac{1}{5}$$

5.2

$$\frac{l}{d_r} = \frac{1}{4}$$

เพราะฉะนั้นจะได้ความกว้างและความยาวของครีบใบพัดเท่ากับ 0.4 และ 0.5 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยแสดงหอสกัดแบบ Oldshue Rushton และใบพัด พร้อมด้วยองค์ประกอบของหอสกัดและใบพัดที่ออกแบบเสร็จแล้วดังรูปที่ 5.10

แต่อย่างไรก็ตามเส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัด เส้นผ่านศูนย์กลางภายในของวงแหวนรวมถึงระยะห่างระหว่างวงแหวนที่เหมาะสมต่อการสกัดควรจะได้มาจากการทดลองเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากหนังสือแต่ละเล่มให้การคำนวณหาระยะห่างและเส้นผ่านศูนย์กลางขององค์ประกอบของหอสกัดดังกล่าวแตกต่างกัน อย่างเช่น Laddha และ Degeesan (1978) กล่าวว่า ระยะห่างของวงแหวนควรมีขนาดเท่ากับเส้นผ่านศูนย์กลางของหอสกัด นอกจากนี้ Thornton (1992) และ Laddha และ Degeesan (1978) ก็ยังอ้างถึงงานวิจัยต่างๆที่ศึกษาถึงอิทธิพลของระยะห่างและเส้นผ่านศูนย์กลางขององค์ประกอบของหอสกัดเหล่านี้ที่ส่งผลต่อการสกัดในการสกัดของเหลวด้วยของเหลว ดังนั้นจึงเป็นข้อพิสูจน์ได้ว่าไม่มีกฎเกณฑ์แน่นอนในการออกแบบหอสกัด ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะทางกายภาพของหอสกัดเหล่านี้จะมีผลต่อค่าอุทกพลศาสตร์และการย้อนกลับมาผสมของวัฏภาค ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อประสิทธิภาพถ่ายเทมวลของการสกัด ดังนั้นสมการที่ 2.8 เป็นเพียงแนวทางที่ใช้ในการออกแบบเท่านั้น ค่าที่เหมาะสมต่อการสกัดอย่างแท้จริงจึงควรมาจากการทดลองเท่านั้น นอกจากนี้พบว่างานวิจัยที่ศึกษาการสกัดเอนไซม์หรือโปรตีนในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในหอสกัด (Jafarabad และคณะ, 1992; Pawar และ คณะ, 1993; Pawar และคณะ, 1997; Porto และ คณะ, 1997) ไม่มีงานวิจัยใดกล่าวถึงที่มาและการออกแบบหอสกัดที่ใช้ในการสกัดเลย ยกเว้น Coimbra และคณะ(1998) ที่อธิบายว่าออกแบบหอสกัด แบบ PRDC ตามงานวิจัยของ Tamburgi และ คณะ (1993)




รูปที่ 5.10 แบบจำลองหอสกัดแบบ Oldshue Rushton ที่ใช้ในงานวิจัย

รูปที่ 5.11 หอสกัดแบบ Oldshue Rushton ที่ประกอบด้วยใบพัดอยู่ในภาวะพร้อมจะใช้งาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 5.3 การสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัด

จากการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสจากน้ำหมักโดยใช้สารละลายน้ำสองวัฏภาคของ PEG 1000 และ โพแทสเซียมฟอสเฟตในบีกเกอร์ โดยศึกษาอิทธิพลค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบ สัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างและปริมาณน้ำหมักที่เติมในระบบ พบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสมากที่สุด คือ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.5 และสัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่าง เท่ากับ 1:25 โดยมีปริมาณน้ำหมักที่เติมในระบบเท่ากับ 50 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักของระบบทั้งหมด ซึ่งเป็นปริมาณมากที่สุดที่สามารถเติมในระบบได้ ดังนั้นจึงนำเอาภาวะของค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5 มาดำเนินการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัดแบบ Oldshue Rushton แล้วทำการศึกษาภาวะของอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคบน (ในที่นี้คือวัฏภาคกระจายตัว ซึ่งมี PEG อยู่ปริมาณมาก ) ต่อวัฏภาคล่าง (วัฏภาคต่อเนื่อง ซึ่งมีฟอสเฟตอยู่ในปริมาณมาก) และปริมาณน้ำหมักที่เติมในระบบใหม่ ทั้งนี้เนื่องจากปัจจัยทั้งสองมีอิทธิพลต่อการถ่ายเทมวลข้ามวัฏภาคในหอสกัด ในขณะที่การดำเนินการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสในบีกเกอร์เป็นภาวะที่วัฏภาคอยู่ในภาวะสมดุล ซึ่งเป็นภาวะที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพการสกัดที่มากที่สุดที่สามารถเกิดขึ้นได้ในภาวะนั้น

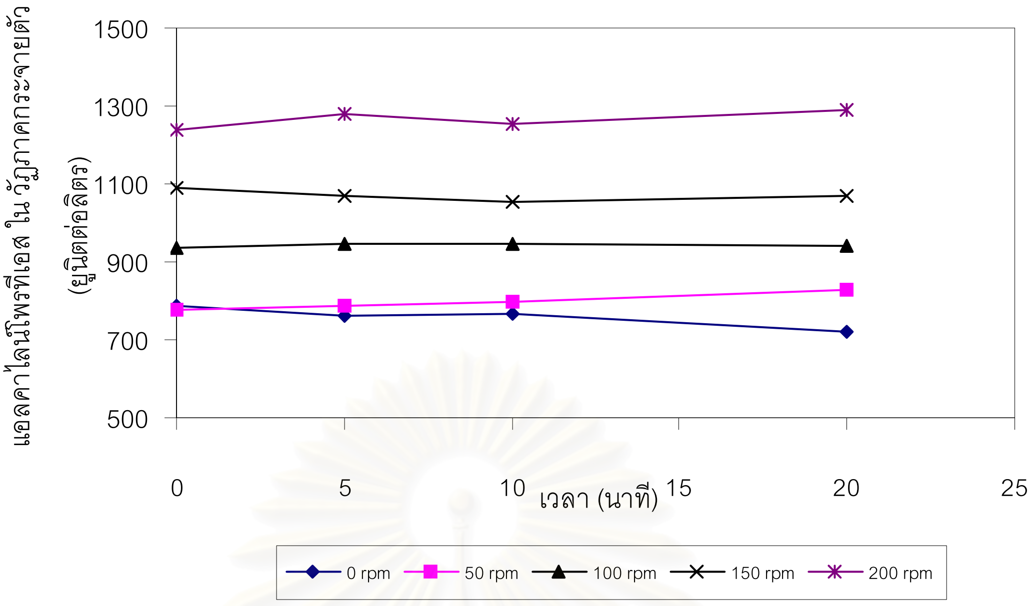
ในการศึกษาการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัด แบบ Oldshue Rushton จะทำการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายเทมวลข้ามวัฏภาคของแอลคาไลน์โพรทีเอส ซึ่งมีด้วยกัน 3 ปัจจัย ปัจจัยแรกคือ ความเร็วรอบในการปั่นกวนของใบพัด ปัจจัยที่สอง คือ อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่อง ปัจจัยที่สาม คือ ความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสเริ่มต้นในวัฏภาคต่อเนื่อง และเลือกภาวะการดำเนินการสกัด เมื่อเปรียบเทียบว่าภาวะใดเป็นการสกัดที่เหมาะสม โดยพิจารณา เปอร์เซนต์ผลได้ จำนวนเท่าความบริสุทธิ์ และประสิทธิภาพการสกัดควบคู่กันไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

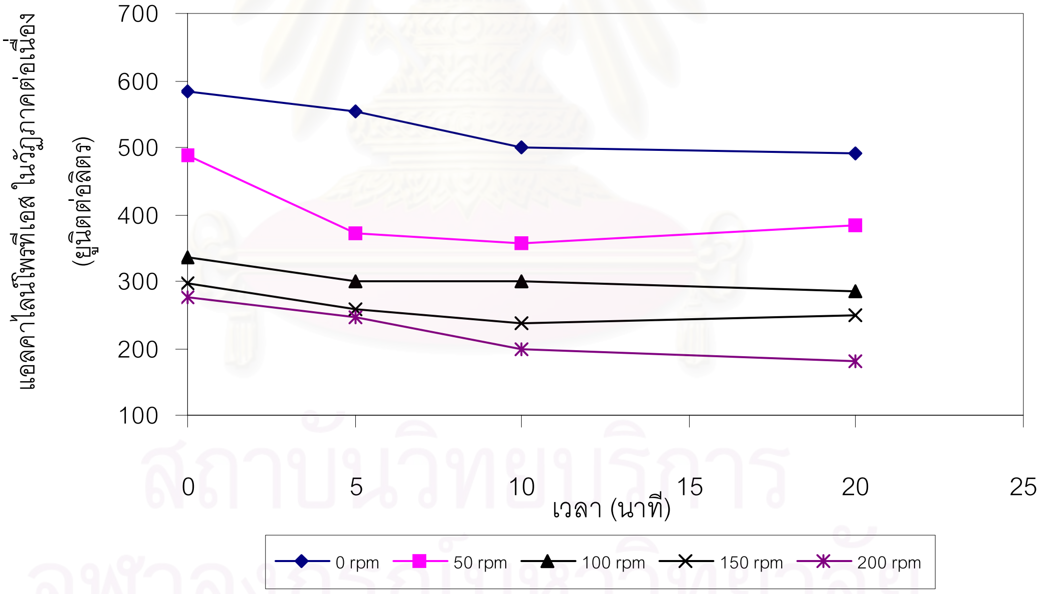
### 5.3.1 อิทธิพลของความเร็วรอบในการปั่นกวนต่อการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอส

จากการศึกษาอิทธิพลของความเร็วรอบในการปั่นกวนในการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอส โดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในหอสกัดแบบ Oldshue Rushton โดยให้วัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่องไหลสวนทางกันด้วยอัตราไหลเชิงปริมาตรเท่ากับ 2.1 มิลลิลิตรต่อนาที และ 17.9 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ และมีปริมาณน้ำหนักเริ่มต้นเท่ากับ 20 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักของวัฏภาคต่อเนื่อง โดยมีองค์ประกอบโดยน้ำหนักของวัฏภาคกระจายตัวดังนี้ PEG 1000 42.5 % (w/w) และ โพแทสเซียมฟอสเฟต 2.5 %(w/w) ส่วนองค์ประกอบของวัฏภาคต่อเนื่องคือโพแทสเซียมฟอสเฟต 28%(w/w) และน้ำผสมน้ำหมัก 72 %(w/w) (นันทิญา, 2543) โดยที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5 ซึ่งทำการทดลองที่อุณหภูมิห้องและความดันบรรยากาศที่ความเร็วรอบในการปั่นกวน 5 ระดับ คือ 0, 50, 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที โดยดำเนินการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอส จนกระทั่งความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสและความเข้มข้นของโปรตีนของสายออกของวัฏภาคทั้งสองมีค่าคงที่ ดังแสดงในรูปที่ 5.12 และ 5.13 ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสและโปรตีน (ซึ่งหมายถึง แอลคาไลน์โพรทีเอสและโปรตีนปนเปื้อนอื่นๆ ) จะค่อนข้างคงที่หลังจากวัฏภาคทั้งสองไหลออกจากหอสกัดเป็นเวลา 10 นาที (โดยนาทีที่ 0 คือเวลาที่หยดแรกของวัฏภาคทั้งสองไหลออกจากหอสกัด) ซึ่งถือว่าระบบเข้าสู่ภาวะคงที่ (steady state) การศึกษาถึงอิทธิพลของค่าตัวแปรดำเนินการต่างๆที่มีผลต่อการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสซึ่งรายงานในลำดับต่อมาจะเสนอค่าที่ภาวะคงที่เท่านั้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

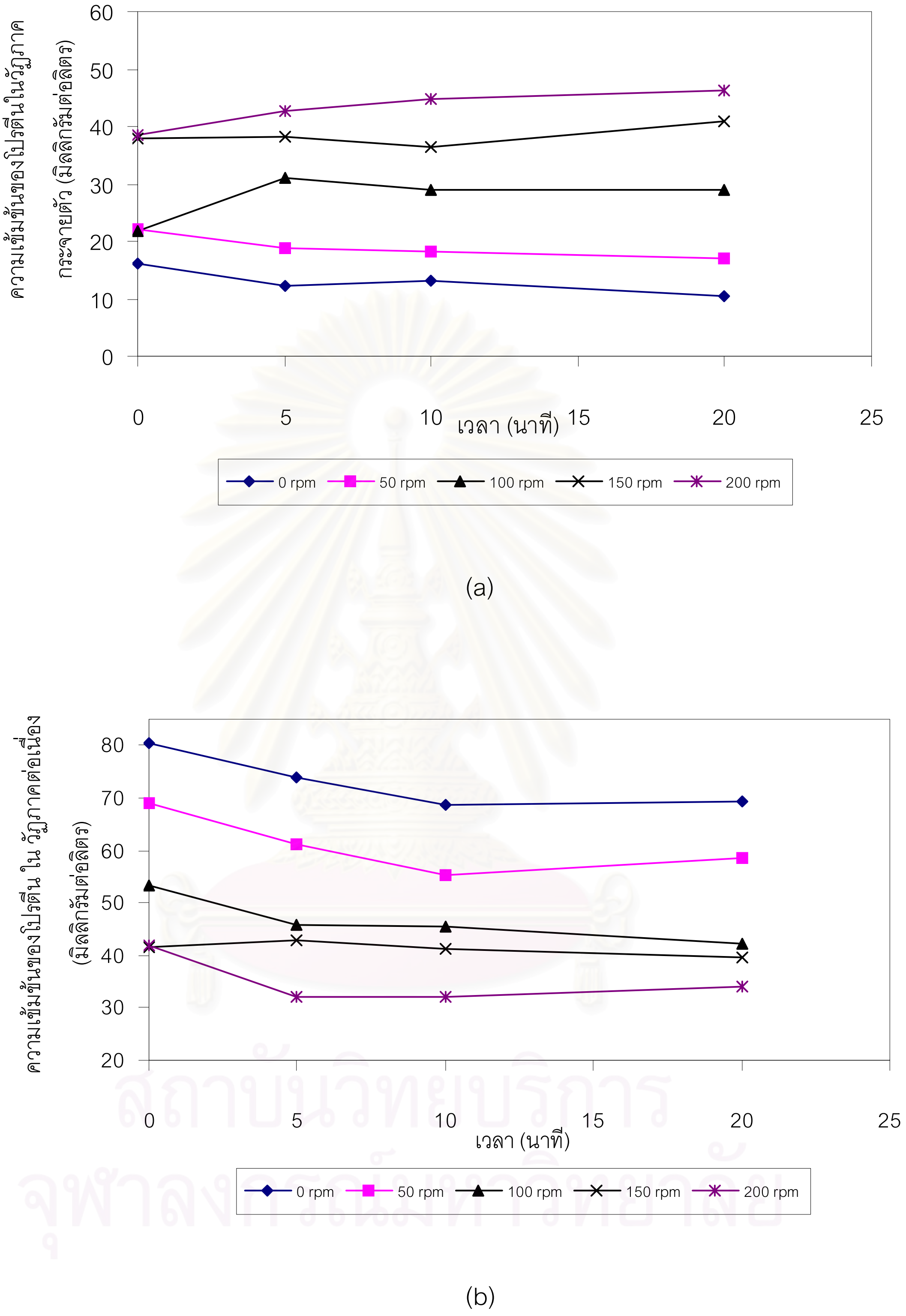



(a)



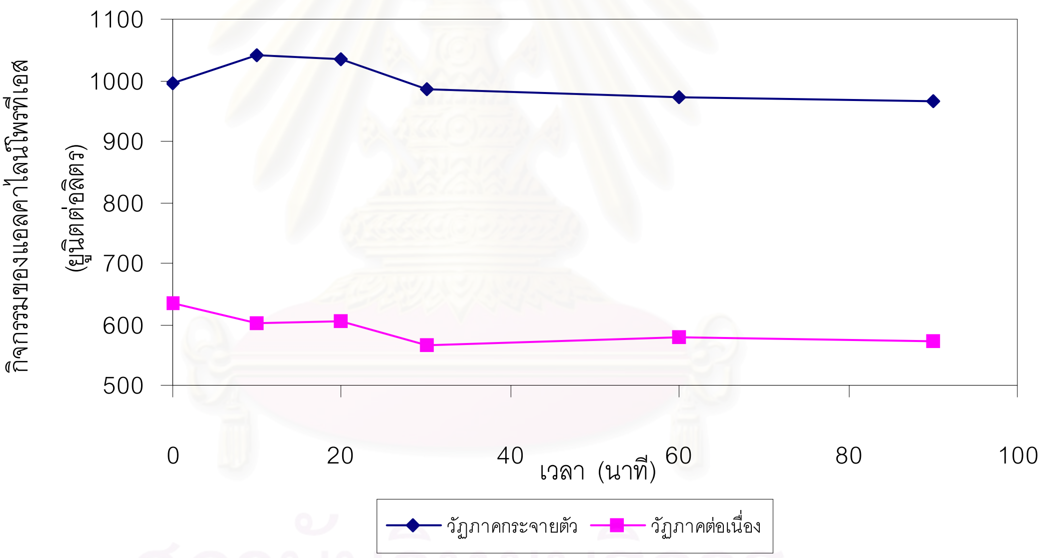

(b)

รูปที่ 5.12 กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคกระจายตัว (a) และวัฏภาคต่อเนื่อง (b) ตามเวลา ภาวะการทดลองคือ $F_d$ = 2.1 ml/min, $F_c$ = 17.9 ml/min, pH = 7.5 ปริมาณน้ำหมัก= 20%(w/w) ของวัฏภาคต่อเนื่อง

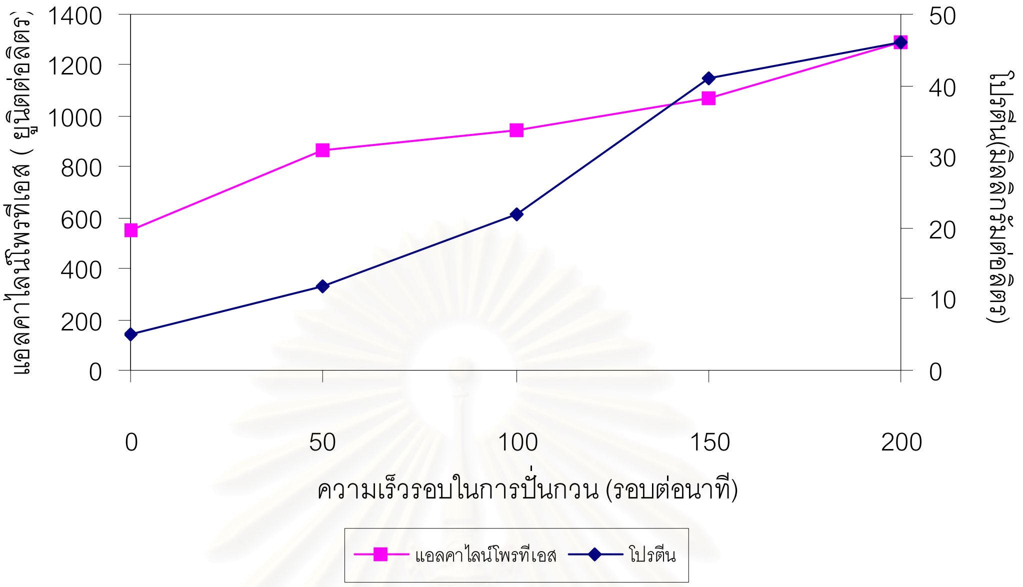



รูปที่ 5.13 ความเข้มข้นของโปรตีนในวัฏภาคกระจายตัว (a) และวัฏภาคต่อเนื่อง (b) ตามเวลา ภาวะการทดลองคือ $F_d$ = 2.1 ml/min, $F_c$ = 17.9 ml/min, pH = 7.5 ปริมาณน้ำหนัก= 20%(w/w) ของวัฏภาคต่อเนื่อง

เพื่อทดสอบว่าตัวทำละลายในแต่ละวัฏภาคมีอิทธิพลต่อการเสื่อมสภาพของแอลคาไลน์โพรทีเอสหรือไม่ จึงได้ทำการทดลองนำแอลคาไลน์โพรทีเอสละลายในวัฏภาคกระจายตัวซึ่งมี PEG อยู่มาก และ วัฏภาคต่อเนื่อง ซึ่งมีโพแทสเซียมฟอสเฟตอยู่มาก แล้ววัดกิจกรรมของเอนไซม์ตามเวลา จนถึงเวลา 90 นาที ซึ่งเป็นเวลาทั้งหมดที่แอลคาไลน์โพรทีเอสจะอยู่ในหอสกัดในแต่ละครั้งของการทดลอง ดังแสดงในกราฟรูปที่ 5.14 จากผลการทดลองพบว่า กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสมีค่าลดลงเพียง 3.0 และ 10.0 เปอร์เซนต์ ในวัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่องตามลำดับ (ค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างของการทดลองทั้งกระบวนการเท่ากับ ± 7.3 เปอร์เซนต์) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่ากิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ภาวะการสกัดคงที่ที่วัดได้เป็นผลมาจาก อิทธิพลของภาวะการสกัดนั้นๆ และมีผลเนื่องจากการเสื่อมสภาพของเอนไซม์โดยตัวทำละลายนั้นๆน้อยมากจนอาจสามารถละเลยได้ ซึ่งการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเสื่อมสภาพของเอนไซม์มีค่าน้อยมากตลอดระยะเวลาการทดลอง 90 นาที




รูปที่ 5.14 กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอส ในวัฏภาคกระจายตัวและในวัฏภาคต่อเนื่องตามเวลา ซึ่งทำการทดลองในบีกเกอร์ขนาดเล็กที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.5 อุณหภูมิห้องและความดันบรรยากาศ




รูปที่ 5.15 อิทธิพลของความเร็วรอบในการปั่นกวนที่มีผลต่อของแอลคาไลน์โพรทีเอสและโปรตีนในวัฏภาคกระจายตัว ภาวะการทดลองคือ $F_d$ = 2.1 ml/min, $F_c$ = 17.9 ml/min, pH = 7.5 ปริมาณน้ำหมัก= 20%(w/w) ของวัฏภาคต่อเนื่อง

จากรูปที่ 5.15 แสดงความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสและโปรตีนที่แพร่จากวัฏภาคต่อเนื่องเข้าสู่วัฏภาคกระจายตัว ด้วยการไหลสวนทางกันของวัฏภาค พบว่าความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสและโปรตีนในวัฏภาคกระจายตัวจะแปรผันตามความเร็วรอบในการปั่นกวน เนื่องจากความเร็วรอบในการปั่นกวนของใบพัดในหอสกัดจะมีอิทธิพลต่อพื้นที่ผิวสัมผัสของวัฏภาค (พารามิเตอร์ a ในสมการที่ 5.3) ผลต่างของความเข้มข้นของสารละลายระหว่างวัฏภาค ($\Delta C$) และสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวม ($K_{oy}$ ซึ่งในสมการนี้จะอ้างอิงวัฏภาคกระจายตัว แต่อย่างไรก็ตามสมการนี้สามารถอ้างอิงวัฏภาคต่อเนื่องได้เช่นกัน โดยรูปสมการยังคงเดิม) ซึ่งเป็นตัวแปรที่ส่งผลต่อการถ่ายเทมวลสาร สามารถอธิบายความสัมพันธ์ของอัตราการถ่ายเทมวลของตัวถูกละลายจากวัฏภาคต่อเนื่องไปยังวัฏภาคกระจายตัวได้ดังสมการที่ 5.3

$$N = K_{oy} a \Delta C \qquad 5.3$$

โดยความเร็วรอบในการปั่นกวนของใบพัดในหอสกัดมีอิทธิพลต่อ 3 ตัวแปรที่แสดงในสมการที่ 5.3 ตัวแปรแรกคือ พื้นที่ผิวสัมผัส ซึ่งเป็นพื้นที่ตั้งฉากกับทิศการถ่ายเทมวลสาร คือ เมื่อความเร็วรอบในการปั่นกวนสูงขึ้นจะทำให้ขนาดของหยดของวัฏภาคเล็กลงและ hold up เพิ่มขึ้น (Coimbra และ คณะ, 1998) ทำให้พื้นที่ผิวสัมผัสของวัฏภาคเพิ่มขึ้น ส่งผลให้แนวโน้มของอัตราการถ่ายเทมวลรวม (ความเข้มข้นต่อเวลา) เพิ่มขึ้น ตัวแปรที่สองคือผลต่างของความเข้มข้น ความเร็วรอบในการปั่นกวนที่เพิ่มขึ้นจะทำให้มีการผสมย้อนกลับ (back mixing) เกิดมากขึ้น ซึ่งมีผลทำให้ผลต่างของความเข้มข้นของสารละลายระหว่างวัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่องที่ทุกตำแหน่งในหอสกัดมีความแตกต่างกันน้อยกว่าที่ความเร็วรอบในการปั่นกวนของใบต่ำ (Arthayukti,1998) ทำให้อัตราการถ่ายเทมวลสารลดลง นอกจากนี้ความเร็วรอบในการปั่นกวนยังมีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวล คือ เมื่อความเร็วรอบในการปั่นกวนสูงขึ้น นอกจากจะทำให้หยดของวัฏภาคมีขนาดเล็กลงแล้ว แรงเฉือนจากใบพัดยังทำให้เกิดการไหลของวัฏภาคแบบปั่นป่วน (turbulence) มากขึ้น ซึ่งอธิบายความสัมพันธ์ความหนาของชั้นฟิล์มกับค่าสัมประสิทธ์การถ่ายเทมวลผ่านชั้นฟิล์ม (film coefficient) ของแต่และวัฏภาคดังสมการที่ 5.4 (Laddha และ Degaleesan, 1978)

$$k = \frac{D}{\delta} \tag{5.4}$$

จากสมการที่ 5.4 เมื่อความหนาของชั้นฟิล์มลดลง จะได้ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลผ่านชั้นฟิล์มของแต่ละวัฏภาคเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมในสมการที่ 5.5 และ 5.6 (Laddha และ Degaleesan, 1978) เพิ่มขึ้น โดยค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลผ่านชั้นฟิล์มของแต่ละวัฏภาคมีความสัมพันธ์กับค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวม ดังนี้

$$\frac{1}{K_{ox}} = \frac{1}{k_x} + \frac{1}{mk_y} \tag{5.5}$$

หรือ

$$\frac{1}{K_{oy}} = \frac{1}{k_y} + \frac{m}{k_x} \tag{5.6}$$

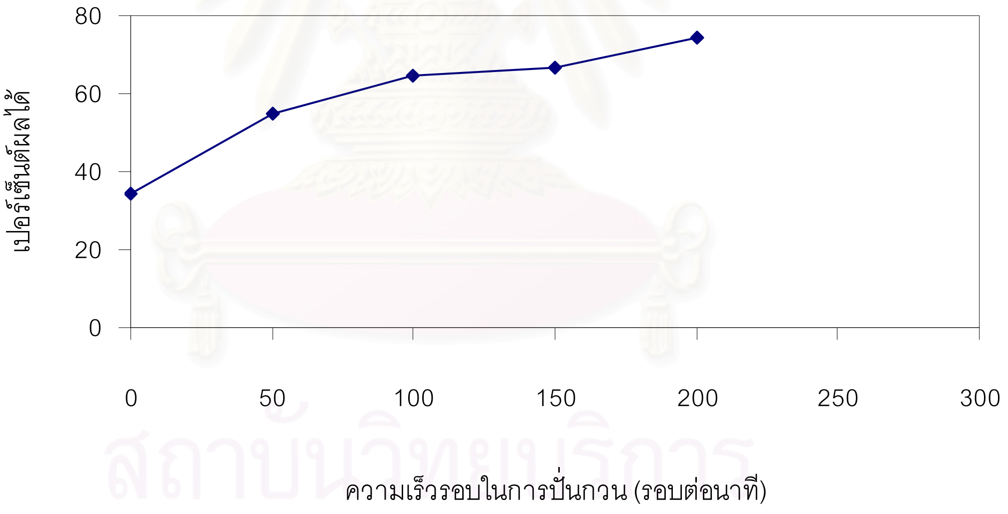
จากผลการทดลองพบว่าอัตราการถ่ายเทมวลของแอลคาไลน์โพรทีเอสจากวัฏภาคต่อเนื่องไปยังวัฏภาคกระจายตัวมีค่าสูงขึ้นตามความเร็วรอบของการปั่นกวน ทั้งนี้น่าจะเกิดเนื่องจากอิทธิพลของการเพิ่มพื้นที่การถ่ายเทมวลและค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวม ซึ่งมีอิทธิพลมากกว่าการลดผลต่างของความเข้มข้นอันเกิดเนื่องมาจากการผสมย้อนกลับที่มากขึ้นและ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากแอลคาไลน์โพรทีเอสที่แพร่เข้าไปอยู่ในวัฏภาคกระจายตัวมากขึ้นตามความเร็วรอบในการปั่นกวน ส่งผลให้เปอร์เซนต์ผลได้ในการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสซึ่งคำนวณดังสมการที่ 5.7 มีค่าสูงขึ้นตามความเร็วรอบในการปั่นกวนของใบพัด ซึ่งแสดงผลดังรูปที่ 5.16 แต่อย่างไรก็ตามจะเห็นว่า สมการที่ 5.7 จะเป็นคนละสมการกับสมการที่ 5.1 ทั้งนี้เนื่องจากสมการที่ 5.1 จะใช้กับกรณีที่ระบบอยู่ในภาวะสมดุล

$$\%\text{yield} = 100 - \left(\frac{C_{c2} \bullet F_{c2}}{C_{c1} \bullet F_{c1}} \times 100\right) \qquad 5.7$$

เนื่องจากงานวิจัยนี้เตรียมวัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่องที่ใช้ดำเนินการในหอสกัดอยู่ในภาวะสมดุล ดังนั้นจึงคาดว่าไม่มีการถ่ายเทมวลข้ามวัฏภาคของน้ำหรือสารที่เป็นองค์ประกอบอื่นของวัฏภาค มีเพียงตัวถูกละลาย (ที่อยู่ในน้ำหมัก) ที่อยู่ในวัฏภาคต่อเนื่องเท่านั้นที่มีการถ่ายเทมวลข้ามวัฏภาค เนื่องจากตัวถูกละลายในระบบของงานวิจัยนี้เป็นระบบสารละลายเจือ




รูปที่ 5.16 อิทธิพลของความเร็วรอบในการปั่นกวนที่มีผลต่อเปอร์เซนต์ผลได้ในการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอส ภาวะการทดลองคือ $F_d$ = 2.1 ml/min, $F_c$ = 17.9 ml/min, pH = 7.5 ปริมาณน้ำหมัก= 20%(w/w) ของ วัฏภาคต่อเนื่อง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

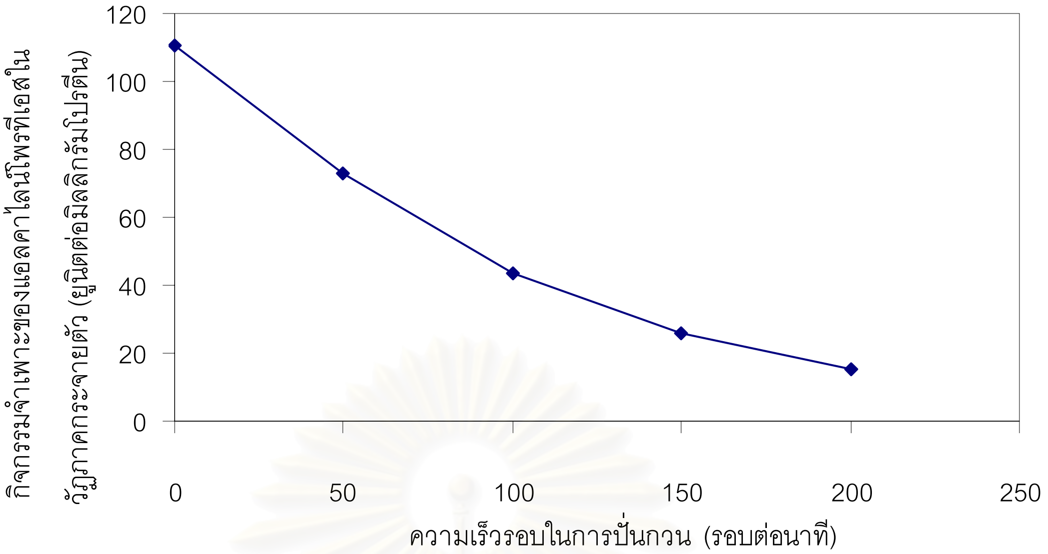
จาง (dilute solution) ดังนั้นจึงสามารถละเลยการถ่ายเทมวลของตัวถูกละลายได้ ซึ่งอาจประมาณได้ว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอัตราไหลเชิงปริมาตรของแต่ละวัฏภาค จึงสามารถเขียนสมการที่ 5.7 ได้ใหม่ดังนี้

$$\%\text{yield} = 100 - (\frac{C_{c2}}{C_{c1}} \times 100) \qquad 5.8$$

จากสมการที่ 5.3 และจากเหตุผลที่พื้นที่ผิวสัมผัสและสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมแปรผันตามความเร็วรอบในการปั่นกวน ทำให้โปรตีนที่เป็นสารปนเปื้อนก็แพร่เข้าไปอยู่ในวัฏภาคกระจายตัวได้มากขึ้นด้วย แต่อย่างไรก็ตามแม้ว่าพื้นที่ผิวในการสัมผัสและความหนาของชั้นฟิล์มของหยดวัฏภาคในการถ่ายเทมวลของโปรตีนและแอลคาไลน์โพรทีเอสจะมีค่าเท่ากัน แต่ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (Diffusion coefficient) ของแอลคาไลน์โพรทีเอสและโปรตีนมีค่าต่างกันจึงทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลผ่านฟิล์มของแต่ละวัฏภาคต่างกัน นอกจากนี้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอสและโปรตีน ในสมการที่ 5.5 และ 5.6 ก็มีค่าต่างกัน รวมทั้งความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสและโปรตีนในวัฏภาคต่อเนื่องก็มีค่าต่างกันด้วย ดังนั้นค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลของแอลคาไลน์โพรทีเอสและโปรตีนจึงมีค่าต่างกัน ส่งผลให้การถ่ายเทมวลของตัวถูกละลายทั้งสองชนิดให้ค่าไม่เท่ากัน

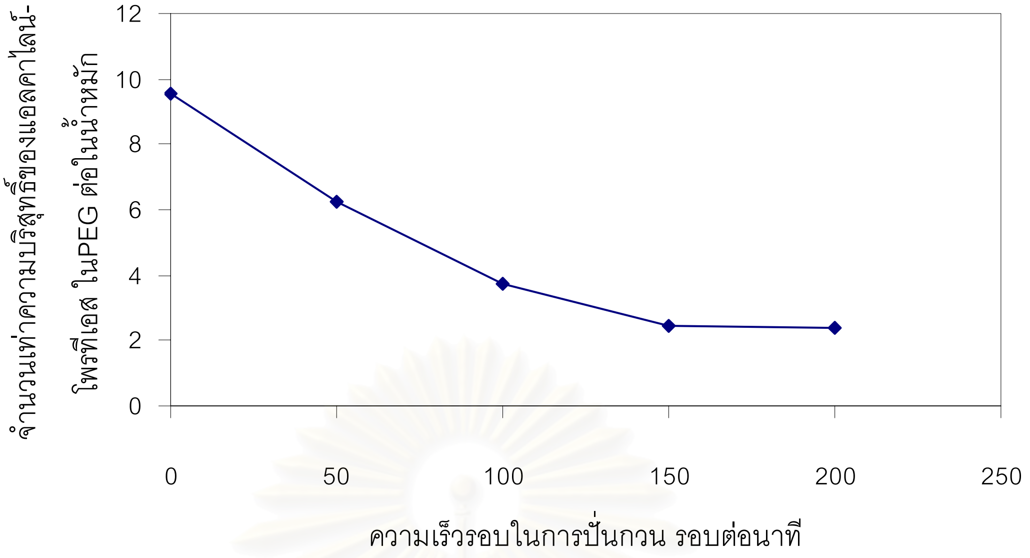
ดังนั้นจากการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสและโปรตีนให้วัฏภาคกระจายตัวตามความเร็วรอบในการปั่นกวนดังรูปที่ 5.15 จะทำให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอสมีค่าลดลงเมื่อความเร็วรอบสูงขึ้น ซึ่งแสดงดังรูปที่ 5.17

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




รูปที่ 5.17 อิทธิพลของความเร็วรอบในการปั่นกวนที่มีผลต่อค่ากิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคกระจายตัว ภาวะการทดลองคือ $F_d$ = 2.1 ml/min, $F_c$ = 17.9 ml/min, pH = 7.5 ปริมาณน้ำหมัก= 20%(w/w) ของวัฏภาคต่อเนื่อง

และเมื่อนำค่ากิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ได้จากการสกัดไปเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่อยู่ในน้ำหมักเริ่มต้นจะได้จำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ของแอลคาไลน์โพรทีเอส (purity factor) แสดงดังรูปที่ 5.18

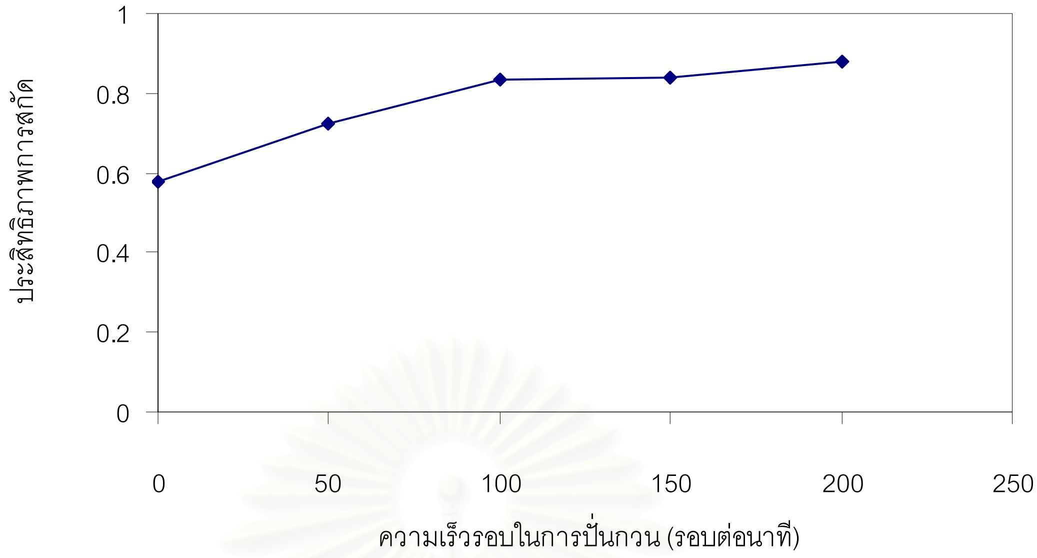



รูปที่ 5.18 อิทธิพลของความเร็วรอบในการปั่นกวนที่มีผลต่อค่าจำนวนเท่าความบริสุทธิ์ของแอลคาไลน์โพรทีเอสในภาคกระจายตัวต่อในน้ำหมัก ภาวะการทดลองคือ $F_d$ = 2.1 ml/min, $F_c$ = 17.9 ml/min, pH = 7.5 ปริมาณน้ำหมัก= 20%(w/w) ของวัฏภาคต่อเนื่อง

จากภาวะที่ใช้ในการดำเนินการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอส สามารถคำนวณหาประสิทธิภาพการสกัด ($\lambda$) ดังสมการที่ 5.8 (ดัดแปลงจากTambourgi และ คณะ 1993)

$$\lambda = \frac{C_c - C_r}{C_c - C_r^*} \qquad 5.9$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




รูปที่ 5.19 อิทธิพลของความเร็วรอบในการปั่นกวนที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัด ภาวะการทดลองคือ $F_d$ = 2.1 ml/min, $F_c$ = 17.9 ml/min, pH = 7.5 ปริมาณน้ำหมัก= 20%(w/w) ของวัฏภาคต่อเนื่อง

จากรูปที่ 5.19 พบว่า ประสิทธิภาพการสกัดจะแปรผันตามความเร็วรอบในการปั่นกวน ทั้งนี้เนื่องจากความเร็วรอบในการปั่นกวนที่สูงขึ้นทำให้ พื้นที่ผิวสัมผัสและค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมมีค่ามากขึ้น ส่งผลให้อัตราการถ่ายเทมวล (ความเข้มข้นต่อเวลา) เพิ่มขึ้น ซึ่งจากรูปที่ 5.19 จะพบว่าที่ความเร็วรอบในการปั่นกวนเท่ากับ 0 รอบต่อนาทีให้ประสิทธิภาพการสกัดเพียง 0.57 แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของแรงกลในหอสกัดต่อการถ่ายเทมวลสารที่มีผลต่อพื้นที่ผิวสัมผัสและสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวม ซึ่งพบว่าเมื่อความเร็วรอบในการปั่นกวนเพิ่มเป็น 50 รอบต่อนาทีให้ประสิทธิภาพการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสสูงขึ้นถึง 20.4 เปอร์เซนต์ ในขณะที่ ความเร็วรอบในการปั่นกวน 100 รอบต่อนาทีให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงกว่าที่ 50 รอบต่อนาทีเพียง 13.4 เปอร์เซนต์เท่านั้น

ดังนั้นจากรูปที่ 5.16, 5.18 และ 5.19 จึงเลือกความเร็วรอบในการปั่นกวนที่มีค่าเท่ากับ 0 50 และ 100 รอบต่อนาที เพื่อหาอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่องที่เหมาะสม เนื่องจากเป็นช่วงที่ให้จำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ของแอลคาไลน์โพรทีเอสต่อน้ำหมักสูง แม้ว่าเปอร์เซนต์ผลและประสิทธิภาพการสกัดจะให้ผลตรงกันข้ามกับความบริสุทธิ์ แต่

เปอร์เซนต์ผลได้และประสิทธิภาพการสกัดสามารถพัฒนาให้มากขึ้นได้โดยการเพิ่มอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว

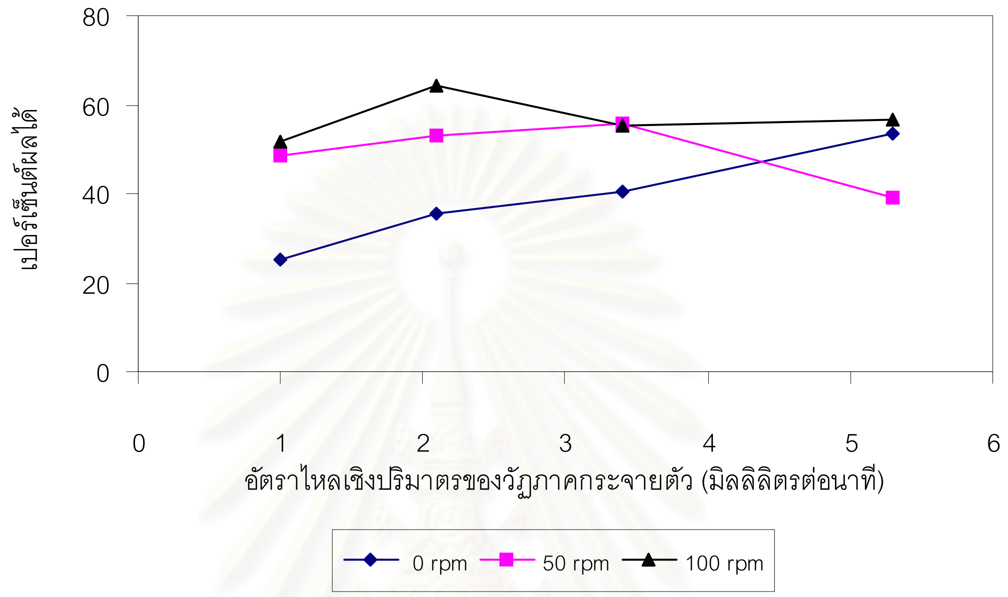
### 5.3.2 อิทธิพลของความเร็วรอบในการปั่นกวนร่วมด้วยอิทธิพลของอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว

อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่องที่ไหลผ่านหอสกัด มีอิทธิพลต่อพื้นที่ผิวสัมผัส ปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวในหอสกัด (hold up) สัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวม (save และ คณะ, 1992; Coimbra และคณะ,1998) เวลาที่วัฏภาคทั้งสองใช้สัมผัสกัน ซึ่งจะส่งผลต่อการถ่ายเทมวลและประสิทธิภาพของการสกัด โดยในงานวิจัยส่วนใหญ่ที่ศึกษาสกัดโปรตีนหรือเอนไซม์โดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในหอสกัด (Jafarabad และ คณะ, 1992; Pawar และ คณะ, 1993; Pawar และคณะ, 1997 Porto และ คณะ, 1997; Coimbra และคณะ, 1998) จะกำหนดให้อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่องมีค่าคงที่แล้วจะปรับเปลี่ยนอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว ซึ่งการเพิ่มอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวจะเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสของวัฏภาคทั้งสองเนื่องจากปริมาณของวัฏภาคกระจายตัวไหลผ่านหอสกัดมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามถ้าวัฏภาคกระจายตัวไหลผ่านหอสกัดเร็วเกินไปอาจส่งผลให้ประสิทธิภาพการสกัดที่เกิดขึ้นยังไม่ถึงค่าสูงสุด เพราะเวลาในการถ่ายเทมวลสารมีน้อย (Laddha และ Degaleesan ,1978)

จากการทดลองเปลี่ยนอัตราไหลเชิงปริมาตร โดยการกำหนดให้วัฏภาคต่อเนื่องมีค่าคงที่ที่ 17.9 มิลลิลิตรต่อนาที และแปรค่าอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวเป็น 4 ค่า คือ 1, 2.1, 3.4, และ 5.3 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความเร็วรอบ 0, 50 และ 100 รอบต่อนาที โดยมีปริมาณน้ำหมักเท่ากับ 20 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักของวัฏภาคต่อเนื่อง

จากการปรับเปลี่ยนค่าอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบปริมาณของแอลคาไลน์โพรทีเอสในหน่วยของความเข้มข้นได้ เนื่องจากการปรับเปลี่ยนความเร็วในการไหลของวัฏภาคกระจายตัวออกเป็น 4 ระดับ ทำให้ปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวที่ไหลผ่านหอสกัดรวมทั้งที่รวมตัวอยู่ในส่วน settler ซึ่งเป็นส่วนบนของหอสกัดมีปริมาณต่างกัน ดังนั้นจึงจะอธิบายถึงปริมาณแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคกระจายตัวด้วยค่าเปอร์เซนต์ผลได้ ซึ่งแสดงค่าดังรูปที่ 5.20 พบว่าค่าเปอร์เซนต์ผลได้ที่ความเร็วรอบในการปั่นกวนที่มีค่าเท่ากับ 100 รอบต่อนาที จะให้เปอร์เซนต์ผลได้สูงที่สุดที่ทุกค่าอัตราไหลเชิงปริมาตรของ

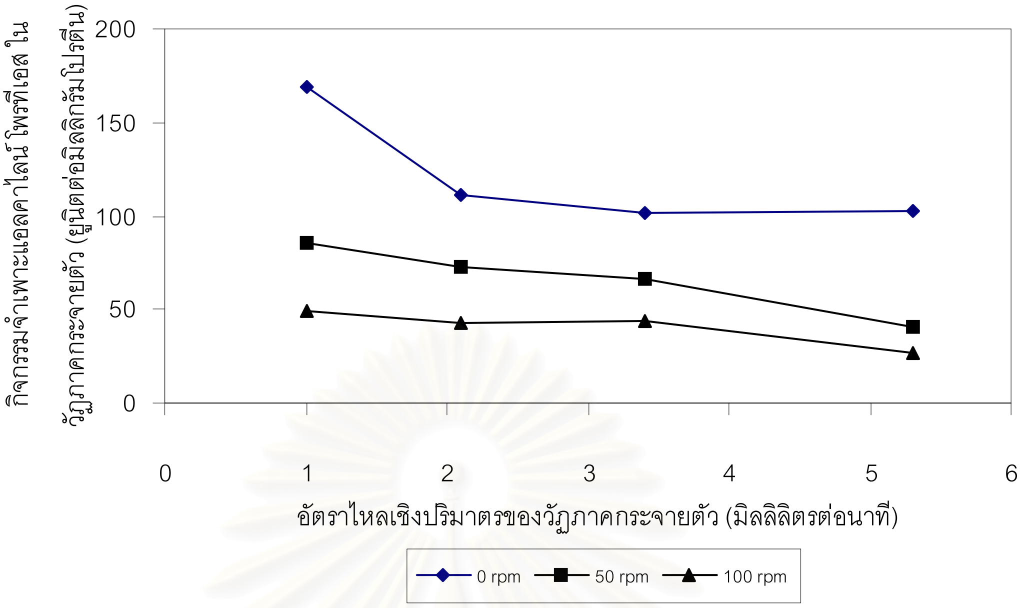
วัฏภาคกระจายตัว และที่ความเร็วรอบในการปั่นกวนที่มีค่าเท่ากับ 0 รอบต่อนาที พบว่าเปอร์เซนต์ผลได้จะมีค่าสูงขึ้นตามค่าอัตราไหลเชิงปริมาตร คือแอลคาไลน์โพรทีเอสได้แพร่เข้าไปในวัฏภาคกระจายตัวได้มากขึ้น




รูปที่ 5.20 อิทธิพลของความเร็วรอบในการปั่นกวนร่วมด้วยค่าอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวที่ส่งผลต่อค่าเปอร์เซนต์ผลได้ในการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอส ภาวะการทดลอง คือ $F_c$ = 17.9 ml/min, pH = 7.5 ปริมาณน้ำหมัก= 20%(w/w) ของวัฏภาคต่อเนื่อง

แต่ในกรณีที่การปั่นกวนเท่ากับ 50 และ 100 รอบต่อนาทีเปอร์เซนต์ผลได้จะสูงที่สุดเมื่ออัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว มีค่าเท่ากับ 2.1 และ 3.4 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ หลังจากนั้นจะลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากวัฏภาคทั้งสองมีเวลาสำหรับการถ่ายเทมวลสารในหอสกัดน้อยลงเมื่ออัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวเพิ่มขึ้นจึงทำให้การถ่ายเทมวลเกิดขึ้นได้ไม่เต็มที่

รูปที่ 5.21 แสดงอิทธิพลของอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่อค่ากิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอส โดยจะพบว่าค่ากิจกรรมจำเพาะมีค่าลดต่ำลงเมื่ออัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวมีค่าสูงขึ้น แสดงว่าโปรตีนปนเปื้อนสามารถถูกสกัดไปยังวัฏภาคกระจายตัวได้มากขึ้น (และในอัตราเพิ่มขึ้นมากกว่าแอลคาไลน์โพรทีเอส) ตามอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว

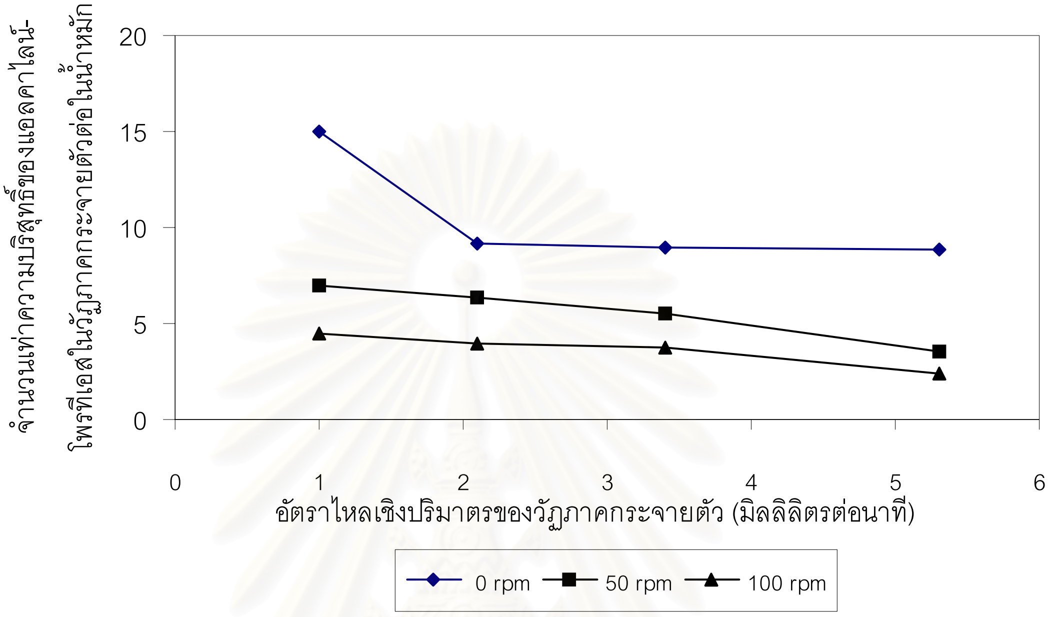



รูปที่ 5.21 อิทธิพลของความเร็วรอบในการปั่นกวนร่วมด้วยค่าอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวที่มีผลต่อค่ากิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอสในการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอส ภาวะการทดลอง คือ $F_c$ = 17.9 ml/min, pH = 7.5 ปริมาณน้ำหนัก= 20%(w/w) ของวัฏภาคต่อเนื่อง

นอกจากนี้ยังพบว่าค่าความชันของกราฟที่แต่ละความเร็วรอบในการปั่นกวนมีค่าความชันของกราฟต่างกัน คือ ที่ความเร็วรอบในการปั่นกวนของใบพัดเท่ากับ 50 และ 100 รอบต่อนาที ค่ากิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอสลดลง 55.9 และ 42.2 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ เมื่ออัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวเพิ่มขึ้นจาก 1.0 เป็น 5.3 มิลลิลิตรต่อนาที โดยความชันของเส้นกราฟทั้งสองเส้นค่อยๆลดลง เมื่ออัตราไหลเชิงปริมาตรมีค่าสูงขึ้น ในขณะที่ความเร็วรอบในการปั่นกวนของใบพัดเท่ากับ 0 รอบต่อนาที กิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอสลดลง 39.0เปอร์เซนต์ โดยลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวเท่ากับ 1.0 - 2.1 มิลลิลิตรต่อนาที หลังจากนั้นค่อยๆ ลดลงจนเกือบจะคงที่ในช่วงอัตราไหล 3.4 ถึง 5.3 มิลลิลิตรต่อนาที

รูปที่ 5.22 แสดงถึงค่าจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ผ่านการสกัดแล้ว พบว่าจำนวนเท่าความบริสุทธิ์จะลดลงเมื่ออัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวในทุกๆความเร็วรอบของการปั่นกวนและจะลดลงเมื่อความเร็วรอบในการปั่นเพิ่มขึ้นโดยจำนวนเท่าความบริสุทธิ์มีค่าสูงสุดเท่ากับ 15 เท่าที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว 1.0

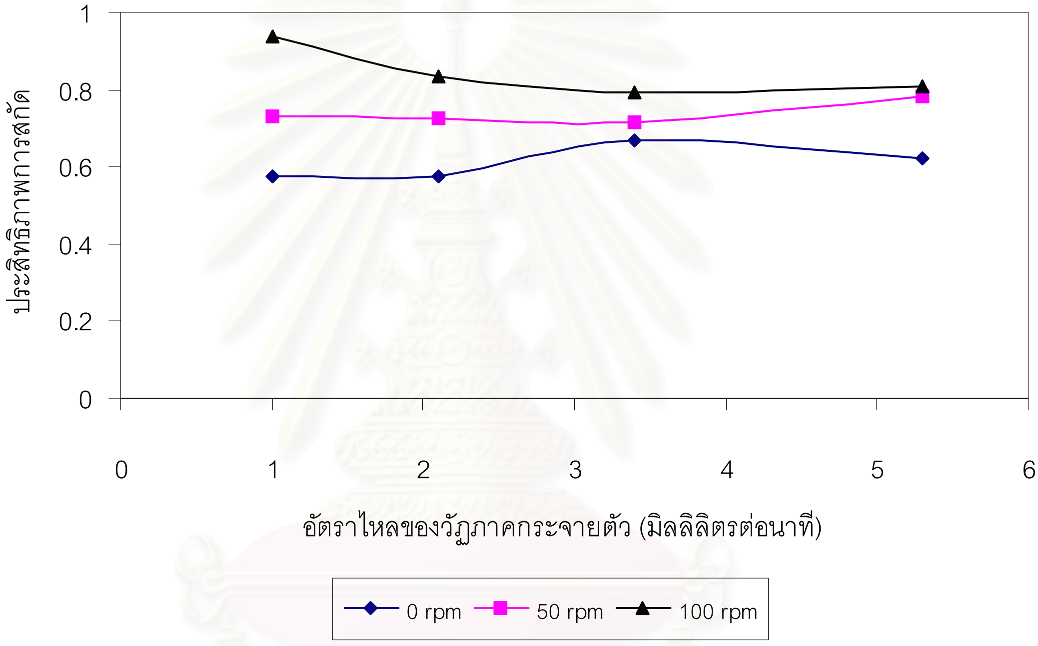
มิลลิลิตรต่อนาทีและที่ความเร็วรอบในการปั่นกวน 0 รอบต่อนาที และมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 2.36 เท่าที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว 5.3 มิลลิลิตรต่อนาทีและที่ความเร็วรอบในการปั่นกวน 100 รอบต่อนาที




รูปที่ 5.22 อิทธิพลของความเร็วรอบในการปั่นกวนร่วมด้วยค่าอัตราไหลเชิงปริมาตรต่อค่าจำนวนเท่าความบริสุทธิ์ของแอลคาไลน์โพรทีเอสกิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอสในการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอส ภาวการณ์ทดลอง คือ $F_c$ = 17.9 ml/min, pH = 7.5 ปริมาณน้ำหมัก= 20% (w/w) ของวัฏภาคต่อเนื่อง

ในการทดลองนี้อัตราการถ่ายเทมวลรวมในหน่วยมวลต่อเวลาควรจะเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวมากขึ้น ดังนั้นสามารถพิจารณาการถ่ายเทมวลในการทดลองนี้ เป็น 2 กรณี กรณีที่หนึ่ง คือ ปรับเปลี่ยนความเร็วรอบในการปั่นกวนของใบพัด โดยกำหนดให้อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวคงที่ ซึ่งความเร็วรอบในการปั่นกวนที่สูงจะส่งผลให้สัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมและพื้นที่ผิวสัมผัสเพิ่มขึ้น แม้ว่าผลต่างของความเข้มข้นของสารละลายระหว่างวัฏภาคทั้งสองจะลดลงแต่ก็เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลน้อย ดังนั้นจึงยังส่งผลให้ประสิทธิภาพการสกัดเพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 5.23 ซึ่งให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับหัวข้อที่ 5.31 กรณีที่สอง คือ ปรับเปลี่ยนอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว โดยกำหนดให้ความเร็วรอบในการปั่นกวนคงที่ เมื่ออัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวเพิ่มขึ้น ทำให้ปริมาตรของ

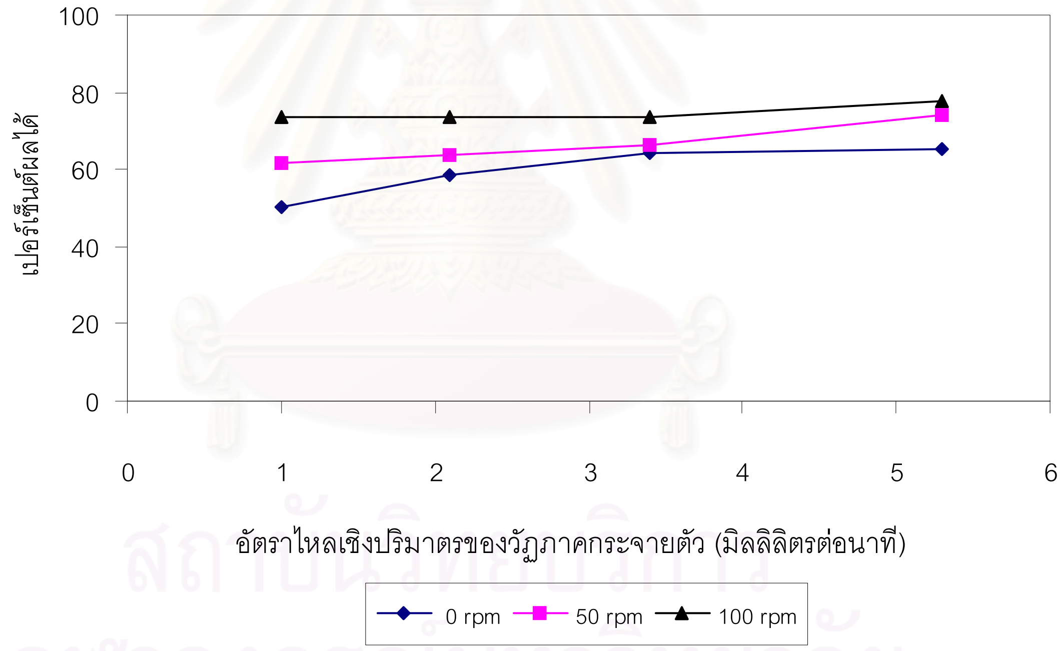
วัฏภาคกระจายตัว (hold up)ในหอสกัดมีค่ามากขึ้น ส่งผลให้พื้นที่ผิวสัมผัสของวัฏภาคมีมากขึ้น (Coimbra และ คณะ 1998) และยังเป็นการเพิ่มค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมอีกด้วย (Save และ คณะ, 1993) ซึ่งจะทำให้อัตราการถ่ายเทมวลเกิดได้ดีขึ้น โดยพิจารณาได้จากเปอร์เซนต์ผลได้ที่เพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวมีข้อเสีย คือ ทำให้วัฏภาคไหลผ่านหอสกัดเร็วเกินไป ทำให้เวลาที่ใช้ในการถ่ายเทมวลน้อย ส่งผลให้การถ่ายเทมวลเกิดขึ้นได้ไม่เต็มที่ ดังแสดงในผลการทดลองรูปที่ 5.23 ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพการสกัดมีแนวโน้มลดลงเมื่ออัตราการไหลเพิ่มขึ้น




รูปที่ 5.23 อิทธิพลของความเร็วรอบในการปั่นกวนร่วมด้วยอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏกระจายตัวต่อค่าประสิทธิภาพการสกัด ในการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสในการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอส ภาวะการทดลอง คือ $F_c$ = 17.9 ml/min, pH = 7.5 ปริมาณน้ำหมัก= 20%(w/w) ของวัฏภาคต่อเนื่อง

จากการทดลองในชุดต่อมาเป็นการทดลองลดอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง จาก 17.9 มิลลิลิตรต่อนาที เป็น 11.8 มิลลิลิตรต่อนาที (ซึ่งเป็นอัตราไหลเพียงระดับเดียวที่สามารถลดลงและปั๊มยังสามารถทำงานได้) โดยยังคงอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวไว้ที่ระดับเดิมคือ 1.0 , 2.1, 3.4 และ 5.3 มิลลิลิตรต่อนาที ทั้งนี้เพื่อศึกษาถึงผลที่มีต่อเปอร์เซนต์ผลได้ จำนวนเท่าความบริสุทธิ์และประสิทธิภาพการสกัด

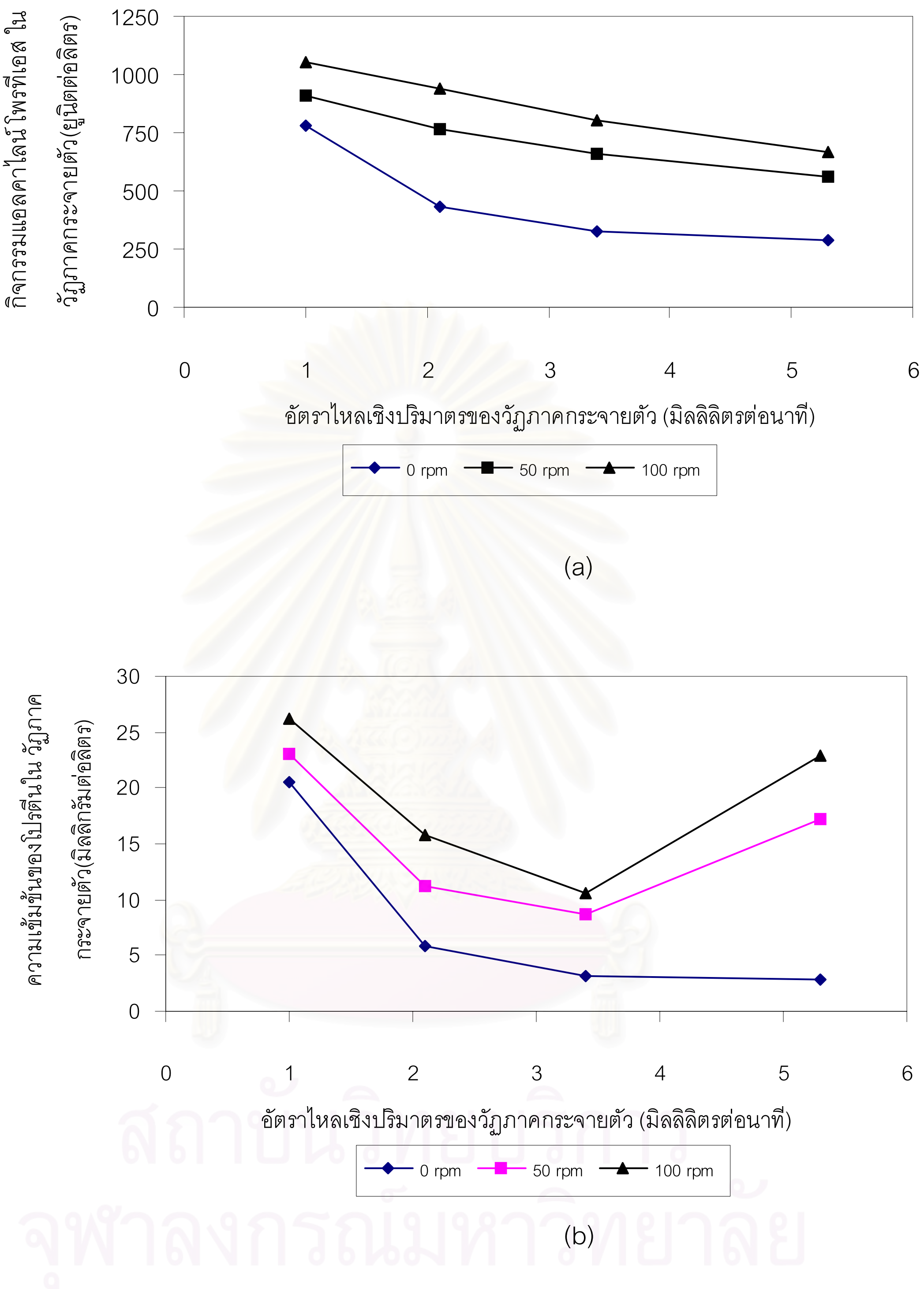
จากการลดอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง จาก 17.9 มิลลิลิตรต่อนาที เป็น 11.8 มิลลิลิตรต่อนาที ทำให้เวลาในการสัมผัสของวัฏภาคทั้งสองมากขึ้น แอลคาไลน์โพรทีเอสสามารถถ่ายเทมวลจากวัฏภาคต่อเนื่องสู่วัฏภาคกระจายตัวได้มากขึ้น ส่งผลให้เปอร์เซนต์ผลได้มีค่าสูงขึ้นที่ทุกความเร็วรอบ และทุกค่าอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวซึ่งแสดงดังกราฟรูปที่ 5.24




รูปที่ 5.24 อิทธิพลของความเร็วรอบในการปั่นกวนร่วมด้วยค่าอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว ที่มีผลต่อค่าเปอร์เซนต์ผลได้ ภาวะการทดลอง คือ $F_c$= 11.8 ml/min ปริมาณน้ำหนัก = 20 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักของวัฏภาคต่อเนื่อง pH=7.5

จากรูปที่ 5.24 พบว่า การเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสโดยการเพิ่มความเร็วรอบในการปั่นกวนของใบพัดจะมีอิทธิพลในการถ่ายเทมวลของแอลคาไลน์โพรทีเอสมากกว่าการเพิ่มพื้นที่ผิวโดยการเพิ่มอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว คือ ที่ความเร็วรอบในการปั่นกวนเท่ากับ 50 และ 100 รอบต่อนาที เมื่ออัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวเพิ่มขึ้นจาก 1.0 ถึง 5.3 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าเปอร์เซนต์ผลได้ค่อนข้างคงที่โดยมีค่าเพิ่มขึ้นเพียง 16.8 และ 5.4 เปอร์เซนต์ตามลำดับ เนื่องจากความเร็วรอบในการปั่นกวนนอกจากจะให้ขนาดหยดของทั้งสองวัฏภาคเล็กลงแล้ว ยังทำให้ความหนาของชั้นฟิล์มของหยดวัฏภาคบางลง ทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ฟลักซ์ของตัวถูกละลายเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นไปตามสมการที่ 5.3 ในขณะที่การเพิ่มอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวจะทำให้ขนาดเล็กลงเนื่องจากไหลผ่านรูที่ไหลกำเนิดได้เร็วขึ้น ซึ่งพบว่าขนาดหยดเล็กลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อสังเกตด้วยตา ประกอบกับปริมาตรที่เพิ่มขึ้นจึงทำให้พื้นที่ผิวสัมผัสเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามเปอร์เซนต์ผลได้ก็ไม่เปลี่ยนแปลงตามอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวมากนัก (5.4 เปอร์เซนต์) แต่สำหรับที่ไม่มีการปั่นกวน หรือที่ความเร็วในการปั่นกวนของใบพัดเท่ากับ 0 รอบต่อนาที พบว่า การเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสด้วยการเพิ่มอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวที่เพิ่มขึ้นมีอิทธิพลอย่างมากต่อการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซนต์ผลได้ เนื่องจากเป็นปัจจัยเดียวที่ทำให้พื้นที่ผิวสัมผัสเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเปอร์เซนต์ผลได้เริ่มคงที่เมื่อ อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวเท่ากับ 3.4 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งอาจคาดได้ว่า แม้จะเพิ่มความเร็วในการไหลของวัฏภาคกระจายตัวมากขึ้นไปกว่านี้จะไม่ทำให้เปอร์เซนต์ผลได้เพิ่มขึ้นมากนัก

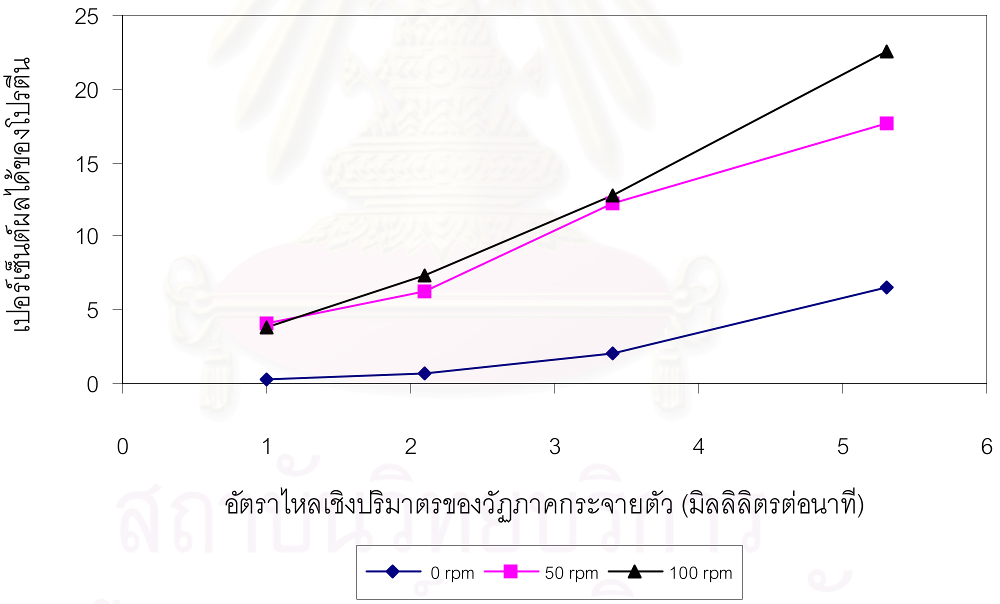
จากรูปที่ 5.25 (a) พบว่าความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสแปรผันตามความเร็วรอบในการปั่นกวน ซึ่งพบว่าที่ความเร็วรอบในการปั่นกวนเท่ากับ 50 และ 100 รอบต่อนาทีมีลักษณะของเส้นกราฟคล้ายกันและค่อนข้างมีค่าใกล้เคียงกันอย่างเป็นลำดับ คือที่ความเร็วรอบในการปั่นกวน 100 รอบต่อนาที มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าที่ 50 รอบต่อนาที ที่ทุกอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว ในขณะที่ 0 รอบต่อนาที มีค่าเส้นกราฟคล้ายกับที่ 50 และ 100 รอบต่อนาที แต่มีค่าต่ำกว่ามาก ซึ่งแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของการมีและไม่มีแรงกลภายในหอสกัดต่อค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมและพื้นที่ผิวสัมผัส ซึ่งส่งผลต่อการถ่ายเทมวลได้อย่างชัดเจน




รูปที่ 5.25 อิทธิพลของความเร็วรอบในการปั่นกวนร่วมด้วยกับค่าอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏกระจายตัวที่มีผลต่อความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอส (a) และความเข้มข้นของโปรตีน (b) ในวัฏภาคกระจายตัว ภาวะการทดลอง คือ $F_c$= 11.8 ml/min ปริมาณน้ำหมัก = 20 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักของวัฏภาคต่อเนื่อง pH=7.5

แต่พบว่าความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสแปรผกผันกับอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว เนื่องจากแอลคาไลน์โพรทีเอสถูกเจือจางด้วยปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวที่เพิ่มขึ้น แม้ว่าเปอร์เซนต์ผลได้จะเพิ่มขึ้นก็ตาม แต่ยังไม่มากเพียงพอที่จะให้ค่าความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสเพิ่มขึ้นตาม เนื่องจากกำหนดให้ค่าความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสเริ่มต้นในวัฏภาคต่อเนื่องก่อนจะไหลเข้าหอสกัดมีค่าคงที่เท่ากันทุกการทดลอง

จากกราฟรูปที่ 5.25 (b) พบว่าการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของโปรตีนในวัฏภาคกระจายตัวที่ทุกความเร็วรอบในการปั่นกวนก็ลดลงตามอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว โดยจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรกและจะลดช้าลงในช่วงอัตราไหลเชิงปริมาตร อยู่ในช่วง 2.1 ถึง 3.4 มิลลิลิตรต่อนาที แต่จะเพิ่มขึ้นเมื่อ อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว 3.4 ถึง 5.3 มิลลิลิตรต่อนาที ทั้งนี้เนื่องจากเปอร์เซนต์ผลได้ของโปรตีน ซึ่งแสดงในกราฟรูปที่ 5.26 พบว่าเปอร์เซนต์ผลได้ของโปรตีนจะแปรผันตามความเร็วรอบในการปั่นกวนและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตาม



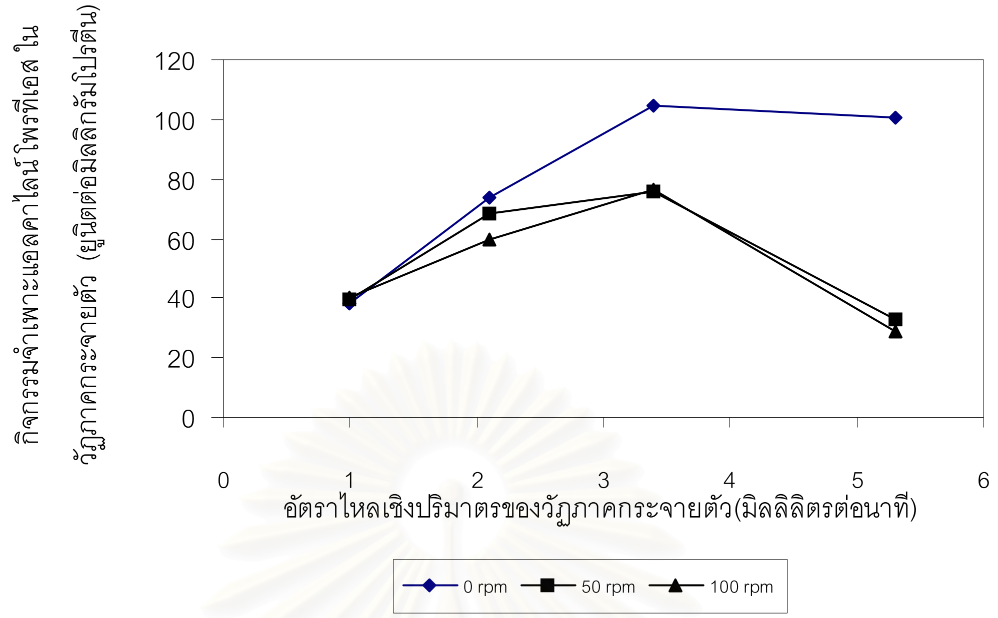

รูปที่ 5.26 อิทธิพลของความเร็วรอบในการปั่นกวนร่วมด้วยกับค่าอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวที่มีผลต่อเปอร์เซนต์ผลได้ของโปรตีน ภาวะการทดลอง คือ $F_c$= 11.8 ml/min ปริมาณน้ำหนัก = 20 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักของวัฏภาคต่อเนื่อง pH=7.5

อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวที่มีค่าสูงขึ้น ซึ่งจะเห็นว่าที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว เท่ากับ 5.3 มิลลิลิตรต่อนาที เปอร์เซนต์ผลได้มีค่าสูงมาก จึงอาจทำให้ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดที่วัดได้ดังรูปที่ 5.25 (b) มีค่าเพิ่มขึ้น

จากที่อธิบายถึงอิทธิพลของการมีและไม่มีแรงกลภายในหอสกัดที่ส่งผลต่อการถ่ายเทมวลของแอลคาไลน์โพรทีเอสในรูปที่ 5.25 (a) ซึ่งพบว่ามีอิทธิพลเช่นเดียวกับของโปรตีนในรูปที่ 5.26 แต่พบว่าเปอร์เซนต์ผลได้ของโปรตีนจะมีค่าต่ำกว่าของแอลคาไลน์โพรทีเอสมากแม้ว่าภาวะในการดำเนินการเดียวกันก็ตาม (โดยเปอร์เซนต์ผลได้สูงสุดของโปรตีนเท่ากับ 22.6 เปอร์เซนต์ เมื่อเปรียบเทียบกับ 77.6 เปอร์เซนต์ในกรณีของแอลคาไลน์โพรทีเอส) ดังนั้นอิทธิพลต่างๆที่ส่งผลต่อการแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอสก็จะส่งผลต่อโปรตีนเช่นกัน แต่เนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีนและแอลคาไลน์โพรทีเอสมีค่าต่างกันจึงทำให้การถ่ายเทมวลมีอัตราแตกต่างกัน

ดังนั้นจากรูปที่ 5.25 (a) และ 5.25 (b) จะได้ค่ากิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอสจากผลหารของความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสกับความเข้มข้นของโปรตีนในวัฏภาคกระจายตัว ซึ่งแสดงผลดังกราฟรูปที่ 5.27 พบว่าที่ทุกความเร็วรอบในการปั่นกวน กิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอสมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเป็นเส้นตรง และมีค่าสูงสุดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวมีค่าเท่ากับ 3.4 มิลลิลิตรต่อนาที หลังจากนั้นจะลดต่ำลงเนื่องจากความเข้มข้นของแอลคาไลน์ที่ถูกเจือจางด้วยปริมาตรที่มากขึ้นของวัฏภาคกระจายตัวและความเข้มข้นของโปรตีนที่เพิ่มขึ้น โดยจะมีค่าลดต่ำลงมาทันทีที่ความเร็วรอบในการปั่นกวนของใบพัดเท่ากับ 50 และ 100 รอบต่อนาที แต่ที่ 0 รอบต่อนาที ค่ากิจกรรมจำเพาะจะลดต่ำลงมาเพียง 3.4 เปอร์เซนต์ ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของโปรตีนที่วัดได้ที่ความเร็วในการปั่นกวนเท่ากับ 0 รอบต่อนาที ที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวเท่ากับ 5.3 ดังรูปที่ 5.26 เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในขณะที่ ความเร็วรอบในการปั่นกวน 50 และ 100 รอบต่อนาที ความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้นมาก ทั้งนี้เนื่องจากอิทธิพลของการมีแรงกลในหอสกัดที่ส่งผลต่อการถ่ายเทมวลมากกว่าในกรณีที่ไม่มีแรงกล

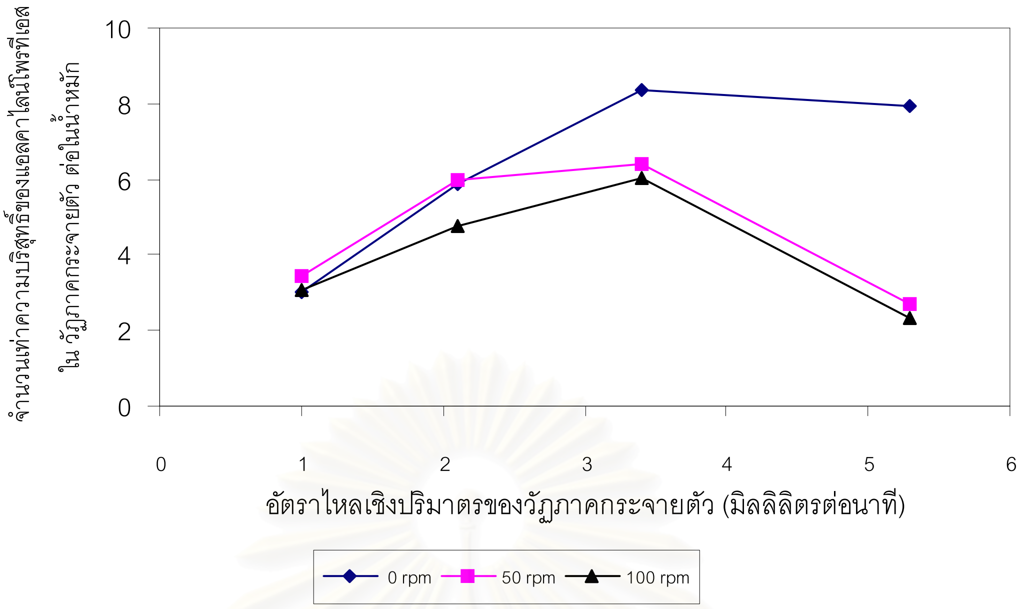
สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




รูปที่ 5.27 อิทธิพลของความเร็วรอบในการปั่นกวนร่วมด้วยกับค่าอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวที่มีผลต่อกิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคกระจายตัว ภาวะการทดลอง คือ $F_c$= 11.8 ml/min ปริมาณน้ำหมัก = 20 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักของวัฏภาคต่อเนื่อง pH=7.5

ดังนั้นจากรูปที่ 5.27 เมื่อนำค่ากิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคกระจายตัวไปหารด้วยค่ากิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอสในน้ำหมัก ก็จะได้จำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ของการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอส ซึ่งแสดงดังรูปที่ 5.28 พบว่าที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวเท่ากับ 3.4 มิลลิลิตรต่อนาที จะให้จำนวนเท่าของความบริสุทธิ์สูงที่สุดในทุกความเร็วรอบในการปั่นกวน โดยมีค่าเท่ากับ 8.3, 6.4 และ 6.0 ที่ ความเร็วรอบในการปั่นกวนเท่ากับ 0, 50 และ 100 รอบต่อนาที ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



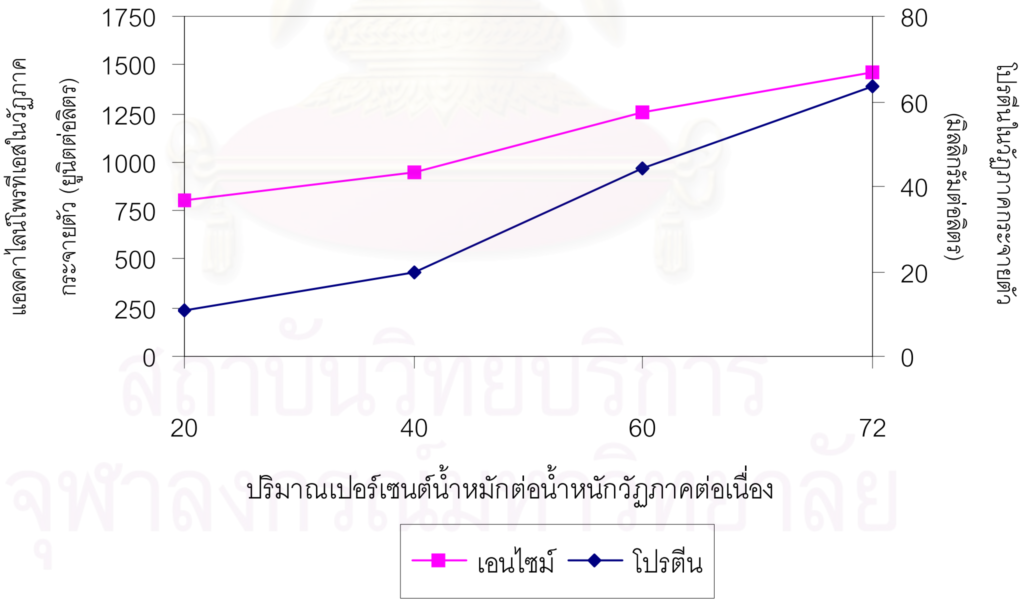

รูปที่ 5.28 อิทธิพลของความเร็วรอบในการปั่นกวนร่วมด้วยค่า $F_d$ ที่มีผลต่อจำนวนเท่าความบริสุทธิ์ของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคกระจายตัวต่อน้ำหมัก ภาวะการทดลอง คือ $F_c$= 11.8 ml/min ปริมาณน้ำหมัก = 20 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักของวัฏภาคต่อเนื่อง pH=7.5

ดังนั้นจากการลดอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่องจาก 17.9 มิลลิลิตรต่อนาที เป็น 11.8 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่า เปอร์เซนต์ผลได้มีค่าสูงขึ้นที่ทุกภาวะของการทดลองในขณะที่ประสิทธิภาพการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสและค่าความบริสุทธิ์สูงสุดของแต่ละความเร็วรอบในการปั่นกวนของใบพัดมีค่าใกล้เคียงกัน (ยกเว้นความบริสุทธิ์ที่ความเร็วรอบในการปั่นกวนเท่ากับ 0 รอบต่อนาที) ดังนั้นจะเห็นว่าการลดอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่องจาก 17.9 มิลลิลิตรต่อนาที เป็น 11.8 มิลลิลิตรต่อนาที ให้ค่าการสกัดของเกือบทุกตัวแปรดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถสรุปได้ว่าที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่องมีค่าต่ำกว่า 11.8 มิลลิลิตรต่อนาที จะมีค่าการสกัดของตัวแปรดีกว่าที่ 11.8 มิลลิลิตรต่อนาทีเสมอไป ทั้งนี้ต้องพิจารณาจากผลการทดลองเท่านั้น และจากเปอร์เซนต์ผลได้ ค่าความบริสุทธิ์ และประสิทธิภาพการสกัดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่องมีค่าเท่ากับ 11.8 มิลลิลิตรต่อนาที จึงควรเลือกภาวะที่ความเร็วรอบปั่นกวนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่องเท่ากับ 3.4 มิลลิลิตรต่อนาที เนื่องจากเป็นภาวะให้เปอร์เซนต์ผลได้สูง และได้ค่าความบริสุทธิ์และประสิทธิภาพการสกัด เท่ากับ 73.7 เปอร์เซนต์ และ 0.79 ตามลำดับ เพื่อไปหาปริมาณความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคต่อเนื่องก่อนการเข้าหอสกัดที่เหมาะสมต่อไป

### 5.3.3 อิทธิพลของความเข้มข้นของน้ำหมัก

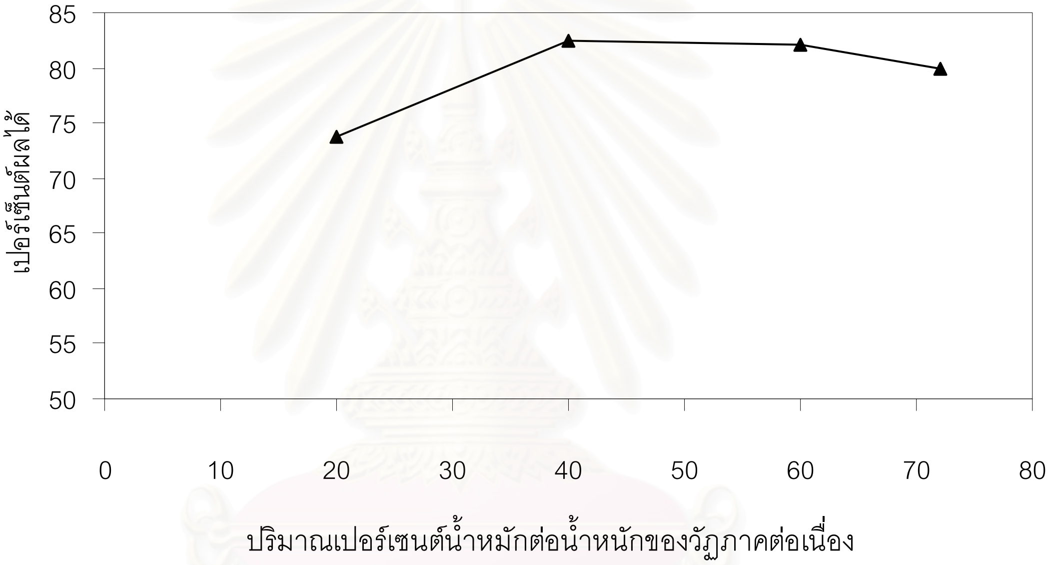
จากการนำภาวะที่เหมาะสมในการปั่นกวนของใบพัดและอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว ซึ่งมีค่าเท่ากับ 100 รอบต่อนาที และ 3.4 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ โดยมีอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่องเท่ากับ 11.8 มิลลิลิตรต่อนาที มาปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของน้ำหมักที่เติมในวัฏภาคต่อเนื่อง เพื่อศึกษาอิทธิพลของแรงขับ (driving force) ของผลต่างของความเข้มข้นของน้ำหมักระหว่างวัฏภาคทั้งสอง โดยทำการปรับเปลี่ยนความเข้มของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเป็น 4 ระดับคือ 20, 40, 60 และ 72 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนักของวัฏภาคต่อเนื่อง ซึ่ง 72 เปอร์เซนต์เป็นปริมาณน้ำหมักที่สูงที่สุดที่สามารถเติมในวัฏภาคต่อเนื่องได้ ดังนั้นที่ความเข้มข้นที่ระดับนี้จึงไม่มีน้ำเปล่าผสมอยู่ในวัฏภาคต่อเนื่องเลย

เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องมากขึ้นผลต่างของความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสระหว่างวัฏภาคและวัฏภาคต่อเนื่องก็จะมีค่ามากขึ้น ส่งผลให้แรงขับระหว่างวัฏภาคมีค่าสูงขึ้น ดังนั้นแอลคาไลน์โพรทีเอสจะแพร่จากวัฏภาคต่อเนื่องไปสู่วัฏภาคกระจายตัวได้ในอัตราที่เร็วขึ้น จึงพบว่าความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคกระจายตัวดังแสดง ในรูปที่ 5.29

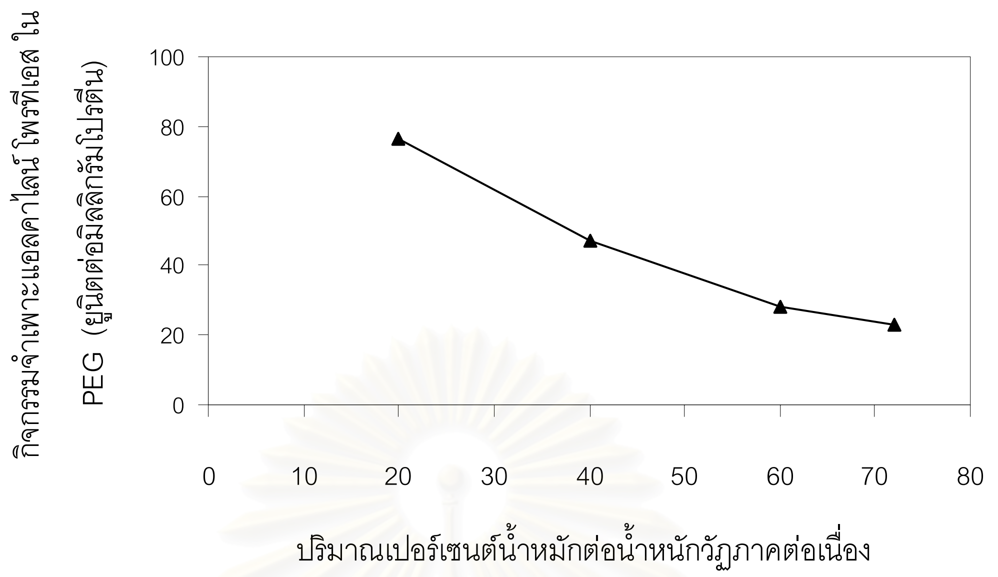



รูปที่ 5.29 อิทธิพลของปริมาณน้ำหมักเริ่มต้นในวัฏภาคต่อเนื่องที่มีผลต่อความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสและโปรตีนที่วัดได้ในวัฏภาคกระจายตัว ภาวะการทดลอง คือ ที่ความเร็วรอบในการปั่นกวนของใบพัดเท่ากับ 100 rpm และ $F_d$และ$F_c$ = 3.4 11.8 ml/min ตามลำดับ pH = 7.5

มีค่าเพิ่มขึ้น ผลของความเข้มข้นของน้ำหมักต่อความความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้ในวัฏภาคกระจายตัว แสดงและอธิบายได้ในลักษณะเช่นเดียวกับกรณีของความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอส เมื่อแอลคาไลน์โพรทีเอสสามารถแพร่เข้าสู่วัฏภาคกระจายตัวได้ในอัตราที่สูงขึ้น เมื่อปริมาณน้ำหมักเริ่มต้นมีค่ามากขึ้น เมื่อผลต่างของความเข้มข้นที่มากขึ้น ทำให้เปอร์เซนต์ผลได้มีค่ามากขึ้น ดังรูปที่ 5.30 และจะลดต่ำลงเล็กน้อยที่ระดับความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องมากกว่า 40 เปอร์เซนต์ โดยลดลงประมาณ 2-3 เปอร์เซนต์ เมื่อปริมาณน้ำหมักเริ่มต้นเพิ่มขึ้นจาก 40 เป็น 72 เปอร์เซนต์ จะเห็นได้ว่าเปอร์เซนต์ผลได้เปลี่ยนแปลงน้อยมาก และยังอยู่ในช่วงความคลาดเคลื่อนของการทดลอง

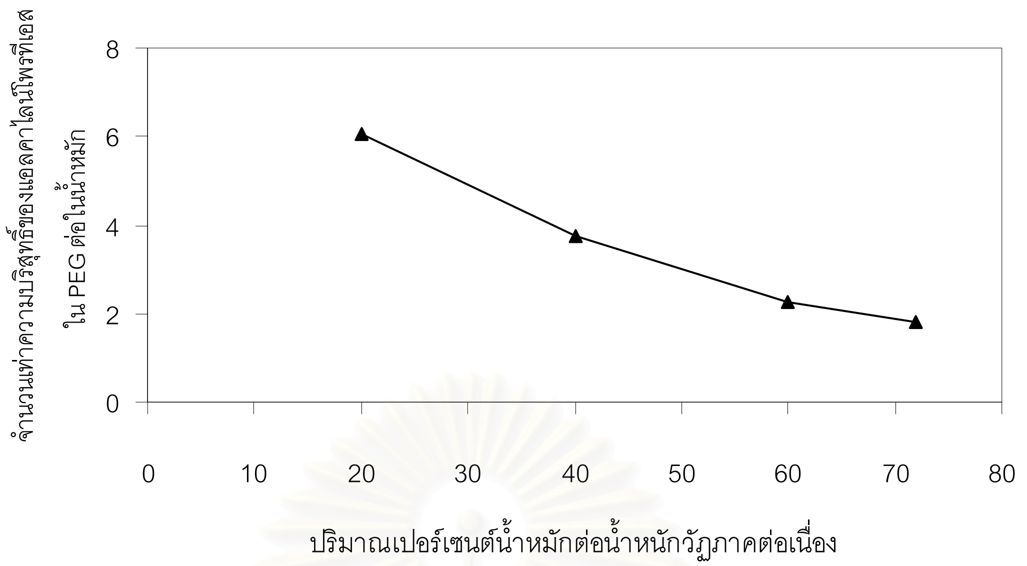



รูปที่ 5.30 อิทธิพลของปริมาณน้ำหมักเริ่มต้นในวัฏภาคต่อเนื่องที่มีผลต่อเปอร์เซนต์ผลได้ ภาวะการทดลอง คือ ความเร็วรอบในการปั่นกวนของใบพัด = 100 rpm และค่า $F_d$และ$F_c$ = 3.4 และ 11.8 ml/min ตามลำดับ pH= 7.5




รูปที่ 5.31 อิทธิพลของปริมาณน้ำหมักเริ่มต้นในวัฏภาคต่อเนื่องที่มีผลต่อค่ากิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอส ภาวะการทดลอง คือ ความเร็วรอบในการปั่นกวนของใบพัด = 100 rpm และค่า $F_d$และ$F_c$ = 3.4 และ 11.8 ml/min ตามลำดับ pH= 7.5

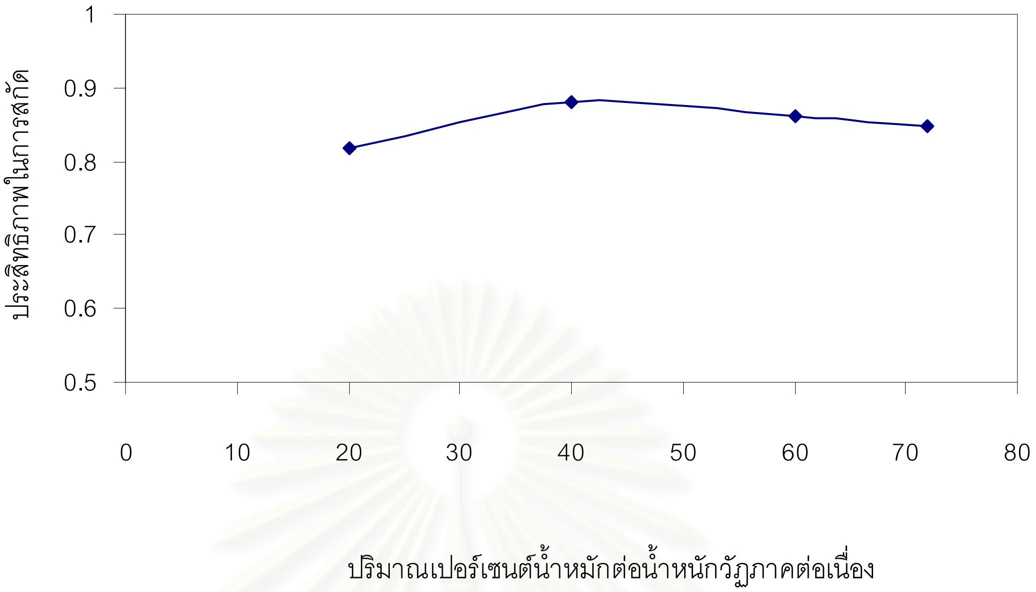
และจากกราฟรูปที่ 5.31 แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอสมีค่าลดต่ำลง เมื่อความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องมีค่ามากขึ้น ซึ่งส่งผลให้จำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ของแอลคาไลน์โพรทีเอสต่อในน้ำหมักมีค่าลดต่ำลงด้วย ดังรูปที่ 5.32 เนื่องจากความเข้มข้นของโปรตีนที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากแรงขับของผลต่างของความเข้มข้นของโปรตีนจะมีอิทธิพลมากกว่าที่แรงขับของผลต่างของความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอส




รูปที่ 5.32 อิทธิพลของปริมาณน้ำหมักเริ่มต้นในวัฏภาคต่อเนื่องที่มีผลต่อจำนวนเท่าความบริสุทธิ์ของแอลคาไลน์โพรทีเอสต่อน้ำหมัก ภาวะการทดลองคือ ความเร็วรอบในการปั่นกวนของใบพัด = 100 rpm และค่า $F_d$และ$F_c$ = 3.4 และ 11.8 ml/min ตามลำดับ pH= 7.5

ผลของความเข้มข้นน้ำหมักเริ่มต้นในวัฏภาคต่อเนื่องต่อค่าประสิทธิภาพการสกัดแสดงดังรูปที่ 5.33 ซึ่งพบว่า เมื่อความเข้มข้นของน้ำหมักเพิ่มขึ้น จาก 20 เป็น 40 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก ประสิทธิภาพการสกัดจะมีค่าเพิ่มขึ้น 8.0 เปอร์เซนต์ และหลังจากนั้นจะมีค่าลดลงประมาณ 3-5 เปอร์เซนต์ ซึ่งค่อนข้างคงที่หลังจากความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องมีค่าสูงกว่า 40 เปอร์เซนต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่อง มีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพการสกัดน้อยกว่าปัจจัยความเร็วรอบในการปั่นกวนของใบพัดและปัจจัยอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่อง ซึ่งอาจสรุปได้ว่า ความเร็วรอบในการปั่นกวนของใบพัดมี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




รูปที่ 5.33 อิทธิพลของความเข้มข้นของน้ำหมักเริ่มต้นในวัฏภาคต่อเนื่องที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดของแอลคาไลน์โพรทีเอสต่อน้ำหมัก ภาวะการทดลอง คือ ความเร็วรอบในการปั่นกวนของใบพัด = 100 และค่า $F_d$ และ$F_c$ = 3.4 และ 11.8 ml/min ตามลำดับ pH= 7.5

จากเปอร์เซนต์ผลได้และประสิทธิภาพการสกัดที่เพิ่มขึ้นที่ถึง 8.9 และ 8.0 เปอร์เซนต์ ที่ความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเท่ากับ 40 เปอร์เซนต์เมื่อเปรียบเทียบกับที่ 20 เปอร์เซนต์ แต่ในทางกลับกันกลับพบว่าความบริสุทธิ์แสดงในรูปของค่ากิจกรรมจำเพาะลดลงถึง 37.5 เปอร์เซนต์ ดังนั้นจึงควรเลือกความเร็วรอบในการปั่นกวนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่องเท่ากับ 3.4 และ11.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ และความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่องเท่ากับ 20 เปอร์เซนต์ เป็นภาวะการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ดีสุด เนื่องจากให้เปอร์เซนต์ผลได้เท่ากับ 73.7 เปอร์เซนต์ ประสิทธิภาพการสกัด 0.79 และให้จำนวนเท่าความบริสุทธิ์สูงถึง 6.0 เท่า ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าค่าที่ความเข้มข้นของน้ำหมักอื่นๆในวัฏภาคต่อเนื่อง

ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบความเสถียรของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ผ่านการสกัดแล้วและละลายอยู่ในวัฏภาคกระจายตัว ซึ่งประกอบด้วย PEG 42.5 %, โพแทสเซียมฟอสเฟต 2.5% และน้ำ 55.0 % โดยน้ำหนัก เพื่อหาระยะเวลาที่สามารถเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ในวัฏภาคกระจายตัวก่อนที่จะนำไปใช้งาน ด้วยการเก็บไว้เป็นเวลา 1 เดือนที่อุณหภูมิ 32 ± 2 , 4 และ -20 องศาเซลเซียส พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์มีการลดลงจากค่าเริ่มต้น 12.9, 9.2 และ 6.2 เปอร์เซนต์ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าความเสถียรของเอนไซม์แปรผกผันกับอุณหภูมิที่เก็บรักษา ซึ่งจากการทดลองอาจถือว่าเอนไซม์มีความเสถียรค่อนข้างมากแม้เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวัฏภาคกระจายตัว ซึ่งประกอบด้วย PEG1000 อยู่มากสามารถป้องกันให้เอนไซม์เสื่อมสภาพได้ช้าลงแม้จะเป็นที่อุณหภูมิห้อง

จากการตรวจเอกสารในหัวข้อ 3.2 พบว่ามีงานวิจัยที่ศึกษาการสกัดเอนไซม์ในหอสกัดโดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคไม่มากนัก และ ยังไม่มีงานวิจัยใดศึกษาการสกัดเอนไซม์ในหอสกัดแบบ Oldshue Rushton ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงไม่สามารถเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นได้เลย ทั้งนี้เนื่องจากงานวิจัยส่วนใหญ่จะศึกษาคุณสมบัติของการดำเนินการในหอสกัดที่มีผลต่อค่า hold up ( Coimbra และ คณะ, 1998; Save pangarker,1993; Pawar และ คณะ 1997) และยังเป็นการศึกษาการสกัดเอนไซม์ที่มีความบรุสิทธิ์ในระดับห้องปฏิบัติการ (Save pangarker,1993; Pawar และ คณะ 1997) ดังนั้นงานวิจัยเหล่านั้นจึงไม่มีข้อมูลที่งานวิจัยนี้สามารถนำมาเปรียบเทียบได้ แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยของ Porto และ คณะ (1997) ได้ศึกษาการสกัดเอนไซม์ไซโตโครมบี 5 ที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในหอสกัดแบบ PRDC ซึ่ง Porto และ คณะ (1997) พบว่าจำนวนเท่าความบริสุทธ์มีค่าเท่ากับ 1.7 ในขณะที่มีประสิทธิภาพการสกัดประมาณ 1 และไม่ขึ้นกับความเร็วรอบในการปั่นกวน ซึ่งเป็นงานวิจัยที่มีลักษณะหอสกัดและการดำเนินงานวิจัยใกล้เคียงกับงานวิจัยนี้ แต่ก็ไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบกับงานวิจัยนี้ได้ ซึ่งมีเหตุผลที่เกี่ยวข้องด้วยกัน 3 ข้อ ข้อที่ 1 คือ ไซโตโครมบี 5 และแอลคาไลน์โพรทีเอสมีน้ำหนักโมเลกุลและความเป็นประจุต่างกัน ข้อที่ 2 คือ ระบบที่ใช้แยกสารชีวโมเลกุลทั้งสองมีองค์ประกอบต่างกัน ข้อที่ 3 คือลักษณะทางกายภาพภายในหอสกัดมีลักษณะแตกต่างกัน ดังนั้น จากข้อที่ 1 และ 2 จะให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกที่ภาวะสมดุลมีค่าต่างกัน ดังสมการของ Bronstadt (สมการที่ 3.2) ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวม ดังสมการที่ 5.5 และ 5.6 และจากข้อที่ 3 จะทำให้ค่า อุทกพลศาสตร์ของของเหลวภายในหอสกัดแตกต่างกัน ซึ่งจะทำให้ผลของการสกัดที่ได้แตกต่างกัน

จากการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัดแบบ Oldshue Rushton ในงานวิจัยนี้ทำให้สามารถนำมาใช้เป็นภาวะที่สำหรับการหาข้อมูลเบื้องต้นเพื่อใช้ในการออกแบบหอสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสที่มีขนาดใหญ่ขึ้นต่อไป โดยมีพารามิเตอร์สำคัญสำหรับการออกแบบ 2 พารามิเตอร์ คือ พื้นที่หน้าตัดของหอสกัด ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 5.10 หรือ 5.11

$$A = \frac{F_c}{U_c} \qquad 5.10$$

$$A = \frac{F_d}{U_d} \qquad 5.11$$

โดยส่วนมาก $U_c$ และ $U_d$ ที่ใช้ในการดำเนินการในหอสกัดจะมีค่าน้อยกว่าความเร็วในการไหลที่ความจุสูงสุด (flooding point) โดยสามารถคำนวณ ความเร็วในการไหลของวัฏภาคที่ความจุสูงสุดได้จากการ ดิฟเฟอเรนชีเอส (differentiate) สมการ ที่ 5.12 ( Thornton ,1992 อ้างถึง Gayler และ คณะ ,1953) เทียบกับ hold up ให้มีค่าเท่ากับ 0 ดังนี้

$$U_d + U_c \frac{\varphi}{1-\varphi} = V_N \varphi (1-\varphi) \qquad 5.12$$

$$\frac{dU_d}{d\varphi} = 0: \qquad U_{cf} = V_N (1-2\varphi_f)(1-\varphi_f)^2 \qquad 5.13$$

$$\frac{dU_c}{d\varphi} = 0: \qquad U_{df} = 2V_N \varphi_f^2 (1-\varphi_f) \qquad 5.14$$

$$\varphi_f = \frac{(U_r^2 + 8U_r)^{1/2} - 3U_r}{4(1-U_r)} \;,\; U_r = \frac{U_d}{U_c} = \frac{F_d}{F_c} \qquad 5.15$$

แต่อย่างไรก็ตาม จากสมการที่ 5.13 และ 5.14 จะมีพารามิเตอร์ที่ไม่ทราบค่า นั่นคือ ค่า $V_N$ ซึ่งสามารถคำนวณ ได้ 2 วิธี วิธีแรกคือ จากการทดลองโดยให้หยดของวัฏภาคกระจายตัวหนึ่งหยดไหลภายในหอสกัดที่มีวัฏภาคต่อเนื่องอยู่เต็มหอ แต่ไม่มีการไหลของวัฏภาคต่อเนื่องที่ภาวะในการกวนที่ใช้ในการสกัด แล้ววัดเวลาที่หยดของวัฏภาคกระจายตัวไหลออกจากหอสกัด อีกวิธีหนึ่งคือ หาได้จากการเขียนกราฟความสัมพันธ์ของสมการทางซ้ายมือและขวามือของสมการที่

5.12 โดย $V_N$ คือความชันของกราฟที่ได้ อย่างไรก็ตาม $V_N$ ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงค่าอุทกพลศาสตร์ของของไหล ซึ่งจะขึ้นกับความเร็วรอบในการปั่นกวน เส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัด เส้นผ่านศูนย์กลางภายในของวงแหวน ระยะห่างระหว่างวงแหวน ดังนั้นการปรับเปลี่ยนค่าใดค่าหนึ่งของปัจจัยเหล่านี้จะทำให้ค่า $V_N$ เปลี่ยนแปลงไปด้วย พารามิเตอร์ที่สอง คือ ความสูงของหอสกัด เนื่องจาก Oldshue Rushton เป็นหอสกัดแบบ ดิฟเฟอเรนเชียล (differential) ดังนั้น จึงสามารถคำนวณความสูงของหอสกัดได้เมื่อทราบค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวม ซึ่งหอสกัดแบบ Oldshue Rushton มีความสัมพันธ์ของค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมกับสัมประสิทธิ์ของขั้นตอนสมดุลดังสมการที่ 5.16

$$\frac{K_{od}a}{U_d} = \frac{-\ln(1-M_d)}{Z_c} \tag{5.16}$$

ซึ่งเป็นสมการที่มาจากการสมดุลมวลภายในหอสกัด ดังนั้นเมื่อทราบค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมแล้วสามารถคำนวณหาขั้นตอนสมดุลของหอสกัดได้จากสมการที่ 5.17

$$\frac{F_x}{K_{ox}a(1-x)^*_{lm}} \int_{x_{out}}^{x_{in}} \frac{(1-x)^*_{lm}\,dx}{((1-x)(x-x^*))} = L \tag{5.17}$$

หรือ

$$\frac{F_y}{K_{oy}a(1-y)^*_{lm}} \int_{y_{in}}^{y_{out}} \frac{(1-y)^*_{lm}\,dy}{((1-y)(y^*-y))} = L \tag{5.18}$$

$$HTU \bullet NTU = L \tag{5.19}$$

ซึ่งเป็นผลคูณของจำนวนขั้นตอนสมดุลกับเทอมของความสูงของการถ่ายเทมวลต่อหนึ่งหน่วยขั้นตอนสมดุล อย่างไรก็ตามค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมควรจะต้องมาจากภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อภาวะการสกัดที่ต่างกันจะทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมต่างกันด้วย

# บทที่6

# สรุปผลการทดลอง

## 6.1 สรุปผลการทดลอง

6.1.1 การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการแยกแอลคาไลน์โพรทีเอสในบีกเกอร์

- อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบ

ที่ทำการศึกษามีทั้งหมด 4 ค่า คือ 7.5 8.5 9.5 และ 10.5 พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.5 เป็นภาวะที่ให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแอลคาไลน์โพรทีเอสและค่ากิจกรรมจำเพาะ (ความบริสุทธิ์) สูงสุด คือ มีค่าเท่ากับ 49.1 และ 31.8 ตามลำดับ

- อิทธิพลของปริมาณน้ำหมักและสัดส่วนโดยปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่าง

จากการทดลองในชุดนี้คงค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบไว้ที่ 7.5 ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมที่สุด เพื่อศึกษาอิทธิพลของปริมาณน้ำหมัก 5 ค่า คือ 10, 20, 30, 40, 50 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนักของระบบร่วมกับอิทธิพลของสัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่าง 5 ค่า คือ 22:1 3:1 1:1 1:3 และ 1:25 ต่อการสกัดโดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การแยก กิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอสและเปอร์เซนต์ผลได้ พบว่าที่สัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อ วัฏภาคล่างเท่ากับ 1:25 และปริมาณน้ำหมักเท่ากับ 50 %(w/w) เป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสในบีกเกอร์ คือให้สัมประสิทธิ์การแยก กิจกรรมจำเพาะของแอลคาไลน์โพรทีเอสและเปอร์เซนต์ผลได้เท่ากับ 48.3, 17.7 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ 62.2 %ตามลำดับ

6.1.2 การเลือกชนิดและออกแบบหอสกัด

การเลือกชนิดและออกแบบหอสกัดในงานวิจัยนี้อ้างอิงหลักการของ Thornton (1992) โดยมีปัจจัยที่นำมาเป็นเกณฑ์ในการพิจารณาดังนี้

- ปริมาตรการไหลผ่านทั้งหมด $\leq$ 0.25 ลูกบาศเมตรต่อชั่วโมง

- จำนวนขั้นตอนสมดุล มากกว่า 1 ขั้นตอนสมดุล
- คุณสมบัติทางกายภาพ พิจารณาในแง่ของผลต่างของความหนาแน่นของวัฏภาคทั้งสอง โดยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ทำการศึกษามีผลต่างของความหนาแน่นเท่ากับ 229 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร
- สัดส่วนของอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่อวัฏภาคต่อเนื่อง เท่ากับ 0.04
- ปริมาณของแข็งในระบบ : พอสมควร
- ต้องการให้หอสกัดง่ายต่อการทำความสะอาด
- ต้องการให้หอสกัดง่ายต่อการดูแลรักษาและซ่อมบำรุง

ชนิดของหอสกัดที่เหมาะสมคือ หอสกัดแบบ Oldshue Rushton โดยออกแบบให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางของหอสกัด โดยมีระยะห่างระหว่างวงแหวนและความสูงหอสกัดเท่ากับ 23 และ 500 มิลลิเมตร ตามลำดับ

6.1.3 การศึกษาการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัดชนิด Oldshue Rushton การทดลองในชุดนี้ ศึกษาถึงอิทธิพลของความเร็วรอบในการปั่นกวน อัตราการไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวและความเข้มข้นของน้ำหมักที่ภาวะคงที่ ต่อ จำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ เปอร์เซนต์ผลได้ และประสิทธิภาพการถ่ายเทมวล โดยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ใช้ในการสกัดมีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.5 ประกอบด้วย วัฏภาคกระจายตัว ซึ่งมีสัดส่วนเชิงมวลดังนี้ PEG1000 โพแทสเซียมฟอสเฟต และน้ำ เท่ากับ 42.5 และ 2.5 เปอร์เซนต์ตามลำดับ ส่วน วัฏภาคต่อเนื่องประกอบด้วย โพแทสเซียมฟอสเฟต และ น้ำ (หรือน้ำหมัก) เท่ากับ 28.0 และ 72.0 เปอร์เซนต์ ทำการสกัดโดยมีวัฏภาคกระจายตัวไหลขึ้นสวนทางกับวัฏภาคต่อเนื่องซึ่งไหลลง

- อิทธิพลของความเร็วรอบในการปั่นกวน

ในการทดลองนี้ควบคุมให้อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่องมีค่าคงที่เท่ากับ 2.1 และ 17.9 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับและวัฏภาคต่อเนื่องประกอบด้วยปริมาณน้ำหมัก 20 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก ส่วนความเร็วรอบในการปั่นกวนที่ทำการศึกษาคือ 0, 50, 100, 150, และ 200 รอบต่อนาที พบว่าความเร็วรอบในการปั่นกวนที่สูงขึ้นมีผลทำให้ เปอร์เซนต์ผลได้และประสิทธิภาพการถ่ายเทมวลสูงขึ้น ในขณะที่จำนวนเท่า

ความบริสุทธิ์ลดต่ำลง ทั้งนี้เนื่องจากปั่นกวนที่สูงขึ้นส่งผลให้การถ่ายเทมวลสารของโปรตีนปนเปื้อนสูงขึ้นด้วยเช่นกัน โดยพบว่าที่ 0 รอบต่อนาทีได้ค่าจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ เปอร์เซนต์ผลได้ และประสิทธิภาพการถ่ายเทมวลเท่ากับ 9.2, 35.6 เปอร์เซนต์ และ 0.58 ตามลำดับ ในขณะที่ 200 รอบต่อนาทีให้ค่า 2.2 , 74.4 เปอร์เซนต์ และ 0.9 ตามลำดับ

- อิทธิพลของอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว

ในหอสกัดนี้ควบคุมให้อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่องมีค่าคงที่เท่ากับ 17.9 มิลลิลิตรต่อนาที แล้วปรับค่าอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว 4 ค่า คือ 1.0, 2.1, 3.4 และ 5.3 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ โดยทำการศึกษาที่ความเร็วรอบในการปั่นกวน 0, 50 และ 100 รอบต่อนาที ในทุกชุดการทดลองนี้ทำการสกัดที่ปริมาณน้ำหมัก 20 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่อง พบว่า อัตราไหลเชิงปริมาตรที่มีค่าสูงเกินไปจะทำให้เปอร์เซนต์ผลได้ลดลง ทั้งนี้เนื่องจากเวลาในการสัมผัสกันของวัฏภาคทั้งสองมีน้อยจึงทำให้การถ่ายเทมวลเกิดขึ้นได้ไม่เต็มที่ โดยที่ความเร็วรอบในการปั่นกวน 50 และ100 รอบต่อนาที และอัตราไหลเชิงปริมาตรเท่ากับ 5.3 มิลลิลิตรต่อนาทีให้เปอร์เซนต์ผลได้ต่ำกว่าที่อัตราไหลเชิงปริมาตรเท่ากับ 2.1 มิลลิลิตรต่อนาที ถึง 12.9 เปอร์เซนต์ และ 7.8 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และ จำนวนเท่าความบริสุทธิ์ก็ลดลงถึง 45.1 และ 41.0 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ในขณะที่ความเร็วรอบในการปั่นกวน 0 รอบต่อนาที ที่ระดับอัตราไหลเชิงปริมาตรเดียวกันกลับให้ปริมาตรสูงขึ้นถึง 33.3 เปอร์เซนต์ และจำนวนเท่าความบริสุทธิ์ลดลงเพียง 4.1 เปอร์เซนต์ แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการสกัดของทั้ง 3 ความเร็วรอบที่ระดับอัตราไหลเชิงปริมาตรเดียวกับที่กล่าวข้างต้นมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 3.0 – 7.0 เปอร์เซนต์ เท่านั้น

- อิทธิพลของอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง

จากการทดลองลดอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่องจาก 17.9 มิลลิลิตรต่อนาทีเป็น 11.8 มิลลิลิตรต่อนาที โดยยังคงให้อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวมีค่า 4 ค่าดังเดิมคือ 1.0, 2.1, 3.4, 5.3 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นการแก้ไขเพื่อให้วัฏภาคทั้งสองใช้เวลาสัมผัสกันมากขึ้น เพื่อให้เกิดการถ่ายเทมวลขึ้นได้เต็มที่ และทำการศึกษาที่ความเร็วรอบในการปั่นกวน 0, 50 และ 100 รอบต่อนาที และ ปริมาณน้ำหมักเริ่มต้นเท่ากับ 20 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักของวัฏภาคต่อเนื่อง พบว่า ที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่องมีค่าเท่ากับ 11.8 มิลลิลิตรต่อนาที ให้ค่าเปอร์เซนต์ผลได้ดีกว่าที่ทุกการทดลองของอัตราไหล

เชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่องเท่ากับ 17.9 มิลลิลิตรต่อนาที ในขณะที่จำนวนเท่าของความบริสุทธิ์และประสิทธิภาพการสกัดที่มีค่าสูงสุดในแต่ละความเร็วรอบในการปั่นกวนมีค่าใกล้เคียงกัน พบว่าที่อัตราไหลของวัฏภาคต่อเนื่องและวัฏภาคกระจายตัวเท่ากับ 11.8 และ 3.4 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความเร็วรอบในการปั่นกวน 100 รอบต่อนาที ให้เปอร์เซนต์ผลได้ จำนวนเท่าของความบริสุทธิ์และประสิทธิภาพการสกัดดีที่สุดของการทดลองในนี้ คือ มีค่าเท่ากับ 6.0, 73.7 เปอร์เซนต์ และ 0.79 ตามลำดับ

- อิทธิพลของความเข้มข้นของน้ำหมักเริ่มต้นในวัฏภาคต่อเนื่อง

จากการทดลองนี้ควบคุมให้อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่อง รวมถึงความเร็วรอบในการปั่นกวนมีค่าคงที่ที่ 3.4 และ 11.8 มิลลิลิตรต่อนาที 100 รอบต่อนาที ตามลำดับ แล้วปรับเปลี่ยนปริมาณน้ำหมักเริ่มต้นที่เติมในวัฏภาคต่อเนื่องเป็น 4 ค่า คือ 20, 40, 60 และ 72 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก ซึ่ง 72 เปอร์เซนต์เป็นปริมาณน้ำหมักมากที่สุดที่สามารถเติมไปในวัฏภาคต่อเนื่องได้ ดังนั้นที่ความเข้มข้นนี้จึงไม่มีน้ำเปล่าในวัฏภาคต่อเนื่องเลย ซึ่งพบว่า ที่ระดับปริมาณน้ำหมักเริ่มต้นเท่ากับ 40 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักให้เปอร์เซนต์ผลได้ที่มีค่าสูงสุดคือ 82.5 เปอร์เซนต์ ซึ่งมีค่าสูงกว่าที่ระดับความเข้มข้นของน้ำหมักเท่ากับ 20, 60 และ 72 เท่ากับ 8.9 0 และ 2.6 เปอร์เซนต์ตามลำดับ และพบว่าจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์จะลดต่ำลงเมื่อปริมาณน้ำหมักเริ่มต้นในวัฏภาคต่อเนื่องมีมากขึ้น พบว่า ที่ระดับปริมาณน้ำหมักเริ่มต้นเท่ากับ 20 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักให้จำนวนเท่าของความบริสุทธิ์สูงที่สุด คือ 6.0 เท่า ซึ่งมีค่าสูงกว่าที่ระดับปริมาณน้ำหมักเริ่มต้นเท่ากับ 40 และ 72 เปอร์เซนต์ ถึง 37.5 และ 69.8 เปอร์เซนต์ตามลำดับ ในขณะที่ประสิทธิภาพการสกัดมีแนวโน้มเช่นเดียวกับค่าเปอร์เซนต์ผลได้ คือ ที่ระดับปริมาณน้ำหมักเริ่มต้นเท่ากับ 40 เปอร์เซนต์เป็นระดับที่ให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงสุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.88 ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่าที่ระดับปริมาณน้ำหมักเท่ากับ 20 เปอร์เซนต์เท่ากับ 10.2 เปอร์เซนต์

6.1.4 ภาวะเหมาะสมที่สุดในการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัดแบบ Oldshue Rushton โดยให้วัฏภาคกระจายตัว ซึ่งมีองค์ประกอบของ PEG1000 เท่ากับ 42.5% (w/w) และโพแทสเซียมเท่ากับ 2.5%(w/w) ไหลสวนทางกับวัฏภาคต่อเนื่องซึ่งมีองค์ประกอบของโพแทสเซียมเท่ากับ 28% (w/w) ซึ่งทำการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายเทมวลภายในหอสกัด โดยใช้ จำนวนเท่าความบริสุทธิ์ เปอร์เซนต์ผลได้และประสิทธิภาพการสกัดเป็นเกณฑ์ในการเลือกภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัด พบว่าที่ความเร็วรอบในการปั่นกวนเท่ากับ 100 อัตราไหลเชิง

ปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่องเท่ากับ 3.4 และ 11.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ และปริมาณน้ำหนักเท่ากับ 20 %(w/w) เป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัดแบบ Oldshue Rushton คือ มี ความบริสุทธิ์ของแอลคาไลน์โพรทีเอสมากกว่าในน้ำหมัก 6.0 เท่า เปอร์เซนต์ผลได้เท่ากับ 73.7 และประสิทธิภาพการสกัดเท่ากับ 0.79

6.1.5 ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบความเสถียรของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ผ่านการสกัดแล้วและละลายอยู่ในวัฏภาคกระจายตัว ซึ่งประกอบด้วย PEG 42.5 %, โพแทสเซียมฟอสเฟต 2.5% และน้ำ 55.0 % โดยน้ำหนัก เพื่อหาระยะเวลาที่สามารถเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ในวัฏภาคกระจายตัวก่อนที่จะนำไปใช้งาน ด้วยการเก็บไว้เป็นเวลา 1 เดือนที่อุณหภูมิ 32±2, 4 และ -20 องศาเซลเซียส พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์มีการลดลงจากค่าเริ่มต้น 12.9, 9.2 และ 6.2 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

## 6.2 ข้อเสนอแนะ

ควรทำการศึกษาปัจจัยที่เป็นองค์ประกอบทางกายภาพของหอสกัด ได้แก่ ระยะห่างระหว่างวงแหวน เส้นผ่านศูนย์กลางภายในวงแหวน รวมถึงเส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัด เพราะปัจจัยเหล่านี้มีอิทธิพลต่อการถ่ายเทมวล รวมถึงการย้อนกลับมาผสมกันของสารละลายภายในหอสกัด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# รายการอ้างอิง


<u>ภาษาไทย</u>

นันทิญา วงศ์มงคล. 2543 ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคสำหรับการสกัดแอลคาไลน์โพรทีเอส วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิศวกรรมเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปกรณ์ จิโรจน์กุลกิจ. 2532 การแยกให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของแอลคาไลน์โพรทีเอสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี บัณฑิตวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วรรณวิมล ทรัพย์ดี. 2540 การผลิตแยกแอลคาไลน์โพรทีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในระดับถังหมัก 5 ลิตรา แบบไม่ต่อเนื่อง วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>ภาษาอังกฤษ</u>

Andersson, Elis.,Mattiasson, Bo., Hahn-Hagerdal,Barbel. 1983. Enzymeatic conversion in aqueous two-phase systems:deacylation of benzylpenicillin to 6-aminoopenicillanic acid with penicillin acylase.Applied **Enzyme Microbi.Techno** 6 :301-306 .

Arthayukti, Woraphat.1998. **Column modeling for liquid-liquid extraction.**

Bayoudh, A.,Charsallah, N., Chamkha, M.,Dhouib, A., Ammar, S., and Nasri, M.2000. Purification and characteriszation of an alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* MN1. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** 24 :291-295.

Cabral, J. M. S., and Aires-Barros, M.R. 1993. Liquid-Liquid extraction of biomolecules using aqueous two-phase system. In J.F. Kennedy, and M. S. Cabral (eds.), **Recovery processes for biological materials**, pp. 273-302. New York: John Wiley&Sons.

Coimbra, Jane S. R. , Mojola, Fabiane., and Meiellas , Antonio J. A. 1998. Dispersed Phase Hold-up in Perforated Rotating Disc Contactor (PRDC) Using Aqueous Two-Phase Systems. **Jounal of Chemical Engineeing of Japan** 31(2) :277-280

Duarte, M.C.T., Portugal, E.P., Ponezi, A.N., Bim, M.A.,Tagliari, C.V. , and Franco, 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.

Jafarabad, K. R. , Sawant , S. B. and Joshi, J. B. 1992. Enzyme and protein masstranfer coefficient in aqueous two – phase system-1.Spray extraction column. **Chem. Eng. Sci.** 47 :57-56.

Kaul, A., and Asenjo, J. A. 1994 Partition of soluble proteins from *E.Coli* in polyethyleneglycol-salt two-phase stytems. In D. L. Pyle (ed.), **Separations for biotechnology 3**, pp 235-241.London:Bookcraft.

Kula, M.-R.,Kroner,K.H., andHustedt, H. 1982. Purification of enzymes by liquid-liquid extraction. In A. Flechter (ed.), **Adavances in Biochem.Eng** 24 Vols, pp. 73-118.Berlin : Springer-Verlag.

Laddha, G.S., and Degaleesan,T.E.1978. **Transport phenomena in Liquid Extraction** New-delhi:McGraw-Hill.

Lee, Yong Hee., and Chang Ho Nam. 1990. Production of Alkaline Protease by *Bacillus licheniformis* in an Aqueous Two-Phase System. **J. Fermentation and Bioengineering** 69(2) : 89-92.

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.

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** A741 : 151-163.

Ng, T.K., Kenealy, W.R.,Industial applications of thermostable enzymes.In:Brock, T.D.(Ed) **Thermophiles General, Molecular and Applied Microbiology** :197-205.

Papamichael, N. , Borner, B., and Hustedt, H. 1991. Continuous aqueous phase extraction of protein : automated on-line monitoring of fumarase activity and protein concentration. **J. Chem. Tech.Biotechno** 50:457-467.

Pawar, P. A., Veera. U. Parasu. , Sawant, S. B. and Joshi, J. B. 1997. Enzyme mass transfer coefficient in aqueous two-phase systems : modified spray extraction columns. **The Canadian of Journal of Chemical Engineering** 75 :751-758.

Porto, ALF., LimaFilho,JL., AiresBarros ,MR., Cabral, JMS.,Tambougri, EB. 1997. Extraction of recombinant cytochrome b(5) from disrupted *Escherichia coli* cells with an aqueous two-phase system in a continuous perforated rotating disc contactor.**Biotechnology Techiques** 11(9) : 641-643.

Raja, Noor Aaliha Abd.Rahman., Chenyonya, Razak.,Kamaruzaman, Ampon., Mahiran, Basri.., Wan Md. Zin Wan Yunus., Abu Baker Salleh,.1994 Purification and characterization of a heat - stable alkaline protease from *Bacillus Stearothemophilus* F1, **Appl Microbiol Biotecnol** .40: 822-827

Sarmento, 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 patition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: effect of overall protein concentration. **Biotechnol.Bioeng** 50(6) :617-626.

Seader ,J. D., and Ernest ,J. Henley.1997. **Separation process principles**. John Wiley&Sons.

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. 1996. Improved purification protocol of a *Fusarium solani pisi* cutinase recombinant cutinase by phase partitioning in aqueous two- phase systems of polyethylene glycol and phosphate. **Enzyme and Microbial Technology** 18:251-260

Sedmark,J.J.,Grossberg, S.E.,1977.**Anal.Biochem.**,79 : 544

Sinha, R., Singh, S.P., Ahmed,S.,and Garg,S.K.1996.Partitioning of a Bacillus alkaline protease in aqueous two-phase system.**Bioresource Technology** 55(2): 163-166.

Tanuja, S., Srinivas, N. D., Rao K. S. M. S. R. , and Gowthanman, M. K. 1997. Aqueous two-phase extraction for downstream processing of amyloglucosidase. **Process Biochemistry** 32 (8) : 635-641.

Videira, M. , and Aires-Barros, M.R. 1994. Liquid-Liquid extraction of clavulanic acid using an aqueous two-phase system of polyehtylene glycol and potassium phosphate. **J. Chromatogr. A** 668:237-240

Walas, M. Slanley. 1988. **Chemical process Equipment select and design Department of Chemical and petroleum Engineering** . University of Kansas. 476 –487.

Yang, Wu – Yang., Lin, Chun-Der., Lee, Lee, Chau-Jen., 1994 Extraction of cephalosporin C from whole broth and separation of decacetyl cephalosporin C by aqueous two-phase partition. **Biotechnology and Bioengineering** 43(6) : 439-445

Zaslavsky, B. Y. 1995. **Aqueous two-phase partitioning : physical chemistry and bioanalytical applications** New York : MARCEL DEKKER.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

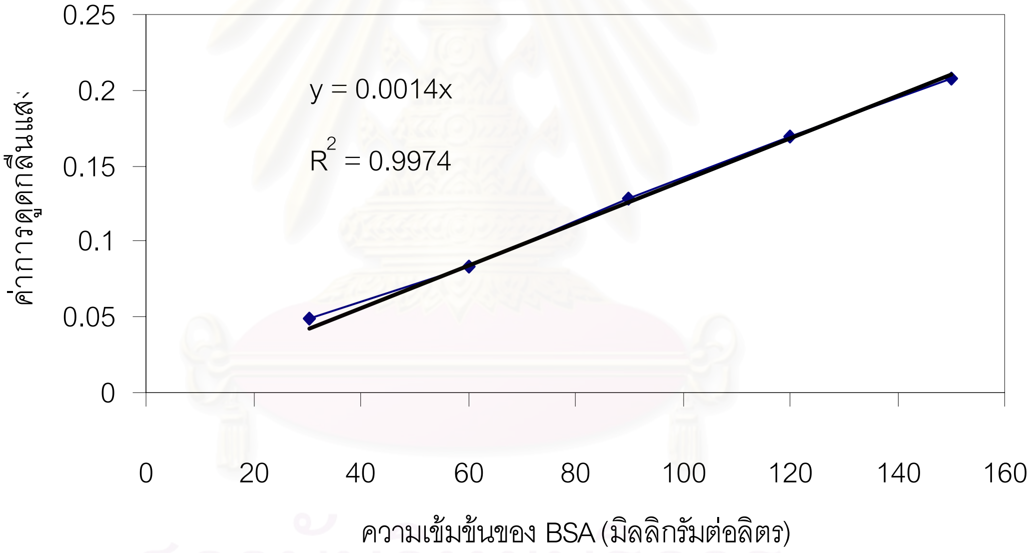
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก ก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ก ค่ามาตรฐานของการดูดกลืนแสงของโบวีนซีรัมอัลบูมิน (BSA) ในน้ำเปล่า

| ความเข้มข้นของ BSA (มิลลิกรัม/ลิตร) | ค่าการดูดกลืนแสงของ BSA ที่ 620 นาโนเมตร |
|---|---|
| 30.6 | 0.049 |
| 60.2 | 0.083 |
| 90.0 | 0.128 |
| 120.0 | 0.169 |
| 150.0 | 0.208 |




รูปที่ ก. ค่ามาตรฐานการดูดกลืนแสงของโปรตีน (BSA)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก ข

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการคำนวณหาปริมาณเอนไซม์

นิยามของกิจกรรมของเอนไซม์  คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร เปลี่ยนไป 0.1 หน่วย คือ1 ยูนิตของแอลคาไลน์โพรทีเอส

ค่าการดูดกลืนแสง เปลี่ยนไป 0.1 หน่วย ได้กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอส 1 ยูนิต
ค่าการดูดกลืนแสงเปลี่ยนไป 1 หน่วย ได้กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอส 10 ยูนิต

ในการวิเคราะห์ดูดตัวอย่างมา 100 ไมโครลิตร ได้กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอส 10 ยูนิต ถ้าเทียบกิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสต่อ 1 มิลลิลิตร (1000 ไมโครลิตร)จะได้ กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอส เท่ากับ 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบเวลา 20 นาทีที่ใช้ในการบ่มให้แอลคาไลน์โพรทีเอสทำงาน จะได้ว่า มีกิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสเท่ากับ 5 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งสามารถเขียน เป็นการคำนวณดังนี้

เอนไซม์ 100 ไมโครลิตร ได้ กิจกรรมของเอนไซม์ 10 ยูนิต

เอนไซม์ 1000 ไมโครลิตร  จะได้กิจกรรมของเอนไซม์ $= \frac{10*1000}{100}$

= 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

เมื่อคิดเทียบต่อเวลาจะได้ กิจกรรมของเอนไซม์ $= \frac{100}{20}$

= 5 ยูนิตต่อมิลลิลตรต่อนาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก ค

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง ค.1 ความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสและโปรตีนที่ทำการทดลองในบีกเกอร์เมื่อปรับเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่าง

| PH | กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอส (ยูนิตต่อลิตร) | | ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อลิตร) | |
|---|---|---|---|---|
| | วัฏภาคบน | วัฏภาคล่าง | วัฏภาคบน | วัฏภาคล่าง |
| 7.5 | 194.68 | 227.50 | 15.95 | 53.33 |
| 8.5 | 76.67 | 112.50 | 18.09 | 53.09 |
| 9.5 | 90.00 | 100.00 | 15.71 | 49.04 |
| 10.5 | 59.17 | 68.33 | 21.19 | 40.95 |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค.2 ความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ทำการทดลองในบีกเกอร์ เมื่อปรับเปลี่ยนสัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างและปริมาณน้ำหนัก

| สัดส่วนเชิงปริมาตร/ปริมาณน้ำหนัก | กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคบน (ยูนิตต่อลิตร) | | | | | กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคล่าง (ยูนิตต่อลิตร) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 22:1 | 3:1 | 1:1 | 1:3 | 1:25 | 22:1 | 3:1 | 1:1 | 1:3 | 1:25 |
| 10 | 35.00 | 50.00 | 138.33 | 232.50 | 1515 | 10.00 | 7.50 | 5.00 | 0.00 | 24.17 |
| 20 | 63.33 | 140.00 | 198.333 | 375.00 | 2625 | 11.67 | 15.00 | 7.50 | 11.25 | 65.00 |
| 30 | 150.00 | 181.67 | 304.167 | 503.33 | 4025 | 10.00 | 5.00 | 4.17 | 15.00 | 67.50 |
| 40 | 205.00 | 276.67 | 420.83 | 644.17 | 5545 | 7.50 | 10.00 | 9.17 | 110.00 | 110.00 |
| 50 | 298.33 | 392.5 | 526.67 | 865.47 | 6900 | 32.50 | 37.50 | 73.33 | 167.50 | 167.5 |

ตารางที่ ค.3 ความเข้มข้นของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ทำการทดลองในบีกเกอร์ เมื่อปรับเปลี่ยนสัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างและปริมาณน้ำหนัก

| สัดส่วนเชิงปริมาตร/ปริมาณน้ำหนัก | ความเข้มข้นของโปรตีนในวัฏภาคบน (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | | | ความเข้มข้นของโปรตีนในวัฏภาคล่าง (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 22:1 | 3:1 | 1:1 | 1:3 | 1:25 | 22:1 | 3:1 | 1:1 | 1:3 | 1:25 |
| 10 | 2.87 | 8.57 | 31.42 | 51.07 | 130.71 | 62.50 | 51.071 | 12.85 | 7.50 | 1.07 |
| 20 | 9.64 | 18.92 | 42.14 | 64.28 | 215.71 | 84.28 | 60.714 | 36.07 | 18.57 | 13.21 |
| 30 | 23.21 | 47.85 | 56.07 | 90.71 | 249.28 | 100.71 | 82.14 | 65.35 | 34.64 | 23.92 |
| 40 | 30.71 | 57.85 | 68.21 | 120.71 | 277.85 | 120.71 | 104.28 | 70.71 | 68.21 | 49.28 |
| 50 | 42.14 | 72.85 | 74.28 | 143.92 | 322.14 | 154.64 | 119.28 | 93.21 | 72.85 | 68.21 |

ตารางที่ ค.4 กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ถูกสกัดในหอสกัดที่ความเร็วรอบต่างๆ ตามเวลา ที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวและต่อเนื่อง เท่ากับ 3.4 และ 17.9 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

| กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคกระจายตัว (ยูนิตต่อลิตร) | | | | | | กิจกรรมแอลคาไลน์โพรทีเอสวัฏภาคต่อเนื่อง (ยูนิตต่อลิตร) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| เวลา | 0rpm | 50 rpm | 100 rpm | 150 rpm | 200 rpm | 0 rpm | 50 rpm | 100 rpm | 150 rpm | 200 rpm |
| 0 | 789.17 | 775.00 | 937.50 | 1090.00 | 1238.33 | 582.50 | 488.33 | 336.67 | 298.33 | 276.67 |
| 5 | 759.17 | 785.00 | 944.17 | 1069.17 | 1279.17 | 553.33 | 372.22 | 299.167 | 257.50 | 247.50 |
| 10 | 765.00 | 798.33 | 948.33 | 1051.67 | 1251.67 | 500.83 | 355.56 | 300.83 | 235.83 | 197.50 |
| 20 | 720.83 | 826.67 | 942.50 | 1071.67 | 1291.67 | 491.67 | 383.33 | 285.00 | 249.17 | 181.67 |

ตารางที่ ค.5 ความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกสกัดในหอสกัดที่ความเร็วรอบต่างๆ ตามเวลาที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวและต่อเนื่อง เท่ากับ 3.4 และ 17.9 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

| ความเข้มข้นของโปรตีนวัฏภาคกระจายตัว (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | | | | ความเข้มข้นของโปรตีนวัฏภาคต่อเนื่อง (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| เวลา | 0rpm | 50 rpm | 100 rpm | 150 rpm | 200 rpm | 0 rpm | 50 rpm | 100 rpm | 150 rpm | 200 rpm |
| 0 | 16.07 | 22.14 | 21.90 | 37.85 | 38.57 | 80.35 | 69.05 | 53.21 | 41.43 | 41.78 |
| 5 | 12.14 | 18.81 | 31.19 | 38.21 | 42.62 | 73.92 | 61.07 | 45.71 | 42.85 | 32.14 |
| 10 | 13.214 | 18.33 | 29.04 | 36.43 | 44.76 | 68.57 | 55.36 | 45.47 | 41.07 | 32.14 |
| 20 | 10.35 | 17.14 | 28.93 | 40.95 | 46.19 | 69.28 | 58.57 | 42.14 | 39.64 | 33.93 |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค.6 กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ถูกสกัดในหอสกัดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว ต่างๆ ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 0 รอบต่อนาที และอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง 17.9 มิลลิลิตรต่อนาที

| กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคกระจายตัว ที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ (ยูนิตต่อลิตร) | | | | | กิจกรรมแอลคาไลน์โพรทีเอสวัฏภาคต่อเนื่องที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ (ยูนิตต่อลิตร) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| เวลา | 1 ml/min | 2.1 ml/min | 3.4 ml/min | 5.3 ml/min | 1 ml/min | 2.1 ml/min | 3.4 ml/min | 5.3 ml/min |
| 0 | 908.33 | 632.22 | 625.83 | 402.50 | 545.00 | 455.00 | 335.53 | 362.5 |
| 10 | 791.67 | 589.17 | 518.33 | 409.17 | 500.00 | 454.00 | 418.33 | 352.5 |
| 20 | 724.167 | 554.167 | 483.33 | 392.5 | 556.00 | 471.67 | 431.67 | 352.5 |

ตารางที่ ค.7 ความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกสกัดในหอสกัดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว ต่างๆ ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 0 รอบต่อนาที และอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง17.9 มิลลิลิตรต่อนาที

| ความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกสกัดในหอสกัดในวัฏภาคกระจายตัว ที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | | | ความเข้มข้นของโปรตีนวัฏภาคต่อเนื่องที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| เวลา | 1 ml/min | 2.1 ml/min | 3.4 ml/min | 5.3 ml/min | 1 ml/min | 2.1 ml/min | 3.4 ml/min | 5.3 ml/min |
| 0 | 4.52 | 5.00 | 5.95 | 5.95 | 71.67 | 71.92 | 69.76 | 67.86 |
| 10 | 3.57 | 6.79 | 6.79 | 4.52 | 69.05 | 69.76 | 62.87 | 61.43 |
| 20 | 4.29 | 5.71 | 5.00 | 4.76 | 71.18 | 67.62 | 66.9 | 67.86 |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค.8 กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ถูกสกัดในหอสกัดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว ต่างๆ ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 50 รอบต่อนาที และอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง 17.9 มิลลิลิตรต่อนาที

| | กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคกระจายตัว ที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ (ยูนิตต่อลิตร) | | | | กิจกรรมแอลคาไลน์โพรทีเอสวัฏภาคต่อเนื่องที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ (ยูนิตต่อลิตร) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| เวลา | 1 ml/min | 2.1 ml/min | 3.4 ml/min | 5.3 ml/min | 1 ml/min | 2.1 ml/min | 3.4 ml/min | 5.3 ml/min |
| 0 | 1030.00 | 869.17 | 641.67 | 397.5 | 401.67 | 315.00 | 356.67 | 491.67 |
| 10 | 1035.00 | 847.5 | 650.83 | 388.33 | 420.00 | 373.33 | 370.83 | 489.17 |
| 20 | 973.00 | 861.67 | 641.67 | 400.00 | 401.67 | 345.83 | 377.50 | 497.50 |

ตารางที่ ค.9 ความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกสกัดในหอสกัดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว ต่างๆ ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 50 รอบต่อนาที และอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง17.9 มิลลิลิตรต่อนาที

| | ความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกสกัดในหอสกัดในวัฏภาคกระจายตัว ที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | | ความเข้มข้นของโปรตีนวัฏภาคต่อเนื่องที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| เวลา | 1 ml/min | 2.1 ml/min | 3.4 ml/min | 5.3 ml/min | 1 ml/min | 2.1 ml/min | 3.4 ml/min | 5.3 ml/min |
| 0 | 13.10 | 13.57 | 8.57 | 10.95 | 78.21 | 68.10 | 78.22 | 63.21 |
| 10 | 13.81 | 13.21 | 11.19 | 10.35 | 75.24 | 67.86 | 75.24 | 59.76 |
| 20 | 11.42 | 11.79 | 9.76 | 9.76 | 77.62 | 67.86 | 77.62 | 60.00 |

ตารางที่ ค.10 กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ถูกสกัดในหอสกัดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว ต่างๆ ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 100 รอบต่อนาที และอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง 17.9 มิลลิลิตรต่อนาที

| | กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคกระจายตัว ที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ (ยูนิตต่อลิตร) | | | | กิจกรรมแอลคาไลน์โพรทีเอสวัฏภาคต่อเนื่องที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ (ยูนิตต่อลิตร) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| เวลา | 1 ml/min | 2.1 ml/min | 3.4 ml/min | 5.3 ml/min | 1 ml/min | 2.1 ml/min | 3.4 ml/min | 5.3 ml/min |
| 0 | 1035.83 | 908.33 | 826.67 | 660.00 | 205.00 | 200.83 | 200.83 | 191.67 |
| 10 | 1043.33 | 940.83 | 798.33 | 650.00 | 195.83 | 203.33 | 196.00 | 170.00 |
| 20 | 1060.83 | 945.00 | 812.50 | 677.50 | 195.00 | 176.67 | 176.67 | 163.33 |

ตารางที่ ค.11 ความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกสกัดในหอสกัดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว ต่างๆ ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 100 รอบต่อนาที และอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง17.9 มิลลิลิตรต่อนาที

| | ความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกสกัดในหอสกัดในวัฏภาคกระจายตัว ที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | | ความเข้มข้นของโปรตีนวัฏภาคต่อเนื่องที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| เวลา | 1 ml/min | 2.1 ml/min | 3.4 ml/min | 5.3 ml/min | 1 ml/min | 2.1 ml/min | 3.4 ml/min | 5.3 ml/min |
| 0 | 28.57 | 16.19 | 14.05 | 26.79 | 77.62 | 74.05 | 82.62 | 67.13 |
| 10 | 25.71 | 15.48 | 10.1 | 21.43 | 77.38 | 75.71 | 65.00 | 59.29 |
| 20 | 26.79 | 16.19 | 10.48 | 24.30 | 77.62 | 73.81 | 68.21 | 65.72 |

ตารางที่ ค.12 กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ถูกสกัดในหอสกัดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว ต่างๆ ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 0 รอบต่อนาที และอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง 11.84 มิลลิลิตรต่อนาที

| | กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคกระจายตัว ที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ (ยูนิตต่อลิตร) | | | | กิจกรรมแอลคาไลน์โพรทีเอสวัฏภาคต่อเนื่องที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ (ยูนิตต่อลิตร) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| เวลา | 1 ml/min | 2.1 ml/min | 3.4 ml/min | 5.3 ml/min | 1 ml/min | 2.1 ml/min | 3.4 ml/min | 5.3 ml/min |
| 0 | 694.17 | 460.00 | 282.50 | 235.00 | 374.17 | 345.83 | 295.00 | 360.83 |
| 10 | 787.50 | 427.50 | 314.67 | 269.00 | 376.67 | 335.00 | 252.50 | 265.83 |
| 20 | 775.83 | 441.67 | 335.00 | 306.00 | 350.83 | 316.67 | 247.50 | 262.50 |

ตารางที่ ค.13 ความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกสกัดในหอสกัดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว ต่างๆ ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 0 รอบต่อนาที และอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง 11.84 มิลลิลิตรต่อนาที

| | ความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกสกัดในหอสกัดในวัฏภาคกระจายตัว ที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | | ความเข้มข้นของโปรตีนวัฏภาคต่อเนื่องที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| เวลา | 1 ml/min | 2.1 ml/min | 3.4 ml/min | 5.3 ml/min | 1 ml/min | 2.1 ml/min | 3.4 ml/min | 5.3 ml/min |
| 0 | 21.52 | 3.8 | 3.80 | 2.85 | 80.357 | 78.21 | 77.62 | 78.33 |
| 10 | 21.67 | 5.71 | 3.09 | 2.85 | 80.00 | 82.14 | 80.00 | 77.86 |
| 20 | 19.28 | 5.95 | 3.09 | 2.85 | 81.92 | 60.00 | 78.21 | 73.09 |

ตารางที่ ค.14 กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ถูกสกัดในหอสกัดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว ต่างๆ ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 50 รอบต่อนาที และอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง 11.84 มิลลิลิตรต่อนาที

| | กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคกระจายตัว ที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ (ยูนิตต่อลิตร) | | | | กิจกรรมแอลคาไลน์โพรทีเอสวัฏภาคต่อเนื่องที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ (ยูนิตต่อลิตร) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| เวลา | 1 ml/min | 2.1 ml/min | 3.4 ml/min | 5.3 ml/min | 1 ml/min | 2.1 ml/min | 3.4 ml/min | 5.3 ml/min |
| 0 | 922.50 | 769.17 | 649.17 | 553.33 | 375.00 | 265.00 | 258.33 | 553.33 |
| 10 | 922.50 | 759.17 | 663.33 | 560.00 | 286.67 | 244.17 | 256.00 | 560.00 |
| 20 | 902.50 | 775.83 | 618.33 | 555.83 | 305.00 | 263.33 | 238.33 | 555.83 |

ตารางที่ ค.15 ความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกสกัดในหอสกัดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว ต่างๆ ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 50 รอบต่อนาที และอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง 11.84 มิลลิลิตรต่อนาที

| | ความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกสกัดในหอสกัดในวัฏภาคกระจายตัว ที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | | ความเข้มข้นของโปรตีนวัฏภาคต่อเนื่องที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| เวลา | 1 ml/min | 2.1 ml/min | 3.4 ml/min | 5.3 ml/min | 1 ml/min | 2.1 ml/min | 3.4 ml/min | 5.3 ml/min |
| 0 | 21.19 | 14.29 | 10.00 | 13.21 | 75.71 | 72.14 | 68.92 | 63.21 |
| 10 | 21.42 | 11.43 | 8.81 | 18.57 | 77.14 | 72.14 | 66.42 | 59.76 |
| 20 | 24.76 | 10.95 | 8.57 | 15.71 | 69.76 | 77.14 | 69.28 | 60.00 |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ค.16 กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ถูกสกัดในหอสกัดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว ต่างๆ ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 100 รอบต่อนาที และอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง 11.84 มิลลิลิตรต่อนาที

| | กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคกระจายตัว ที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ (ยูนิตต่อลิตร) | | | | กิจกรรมแอลคาไลน์โพรทีเอสวัฏภาคต่อเนื่องที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ (ยูนิตต่อลิตร) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| เวลา | 1 ml/min | 2.1 ml/min | 3.4 ml/min | 5.3 ml/min | 1 ml/min | 2.1 ml/min | 3.4 ml/min | 5.3 ml/min |
| 0 | 1303.33 | 937.50 | 820.83 | 643.33 | 387.25 | 336.67 | 463.33 | 306.67 |
| 10 | 1341.67 | 948.33 | 796.67 | 644.17 | 375.00 | 299.17 | 354.17 | 345.00 |
| 20 | 1320.83 | 942.33 | 813.33 | 659.17 | 396.67 | 300.83 | 332.50 | 316.67 |

ตารางที่ ค.17 ความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกสกัดในหอสกัดที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว ต่างๆ ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 100 รอบต่อนาที และอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง 11.84 มิลลิลิตรต่อนาที

| | ความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกสกัดในหอสกัดในวัฏภาคกระจายตัว ที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | | ความเข้มข้นของโปรตีนวัฏภาคต่อเนื่องที่อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวต่างๆ (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| เวลา | 1 ml/min | 2.1 ml/min | 3.4 ml/min | 5.3 ml/min | 1 ml/min | 2.1 ml/min | 3.4 ml/min | 5.3 ml/min |
| 0 | 24.52 | 21.90 | 18.57 | 17.14 | 284.76 | 60.36 | 63.21 | 41.78 |
| 10 | 26.43 | 21.90 | 18.09 | 21.43 | 56.42 | 50.23 | 58.21 | 32.14 |
| 20 | 26.01 | 21.78 | 18.33 | 20.71 | 56.67 | 49.28 | 60.00 | 32.14 |

ตารางที่ ค.18 กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสที่ถูกสกัดในหอสกัดที่ความเข้มข้นในน้ำหมักเริ่มต้นต่างๆในวัฏภาคต่อเนื่อง ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 100 รอบต่อนาที และอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว และวัฏภาคต่อเนื่อง 3.4 และ 11.84 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

| | กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคกระจายตัว ที่ความเข้มข้นน้ำหมักเริ่มต้นต่างๆในวัฏภาคต่อเนื่อง (ยูนิตต่อลิตร) | | | | กิจกรรมของแอลคาไลน์โพรทีเอสในวัฏภาคต่อเนื่องที่อัตราไหลเชิงที่ความเข้มข้นน้ำหมักเริ่มต้นต่างๆในวัฏภาคต่อเนื่อง (ยูนิตต่อลิตร) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| เวลา | 20% | 40% | 60% | 72% | 20% | 40% | 60% | 72% |
| 0 | 826.67 | 929.17 | 1215.00 | 1382.50 | 200.00 | 195.00 | 301.67 | 414.17 |
| 10 | 798.33 | 934.17 | 1227.50 | 1441.67 | 190.00 | 170.00 | 229.17 | 276.67 |
| 20 | 812.50 | 950.00 | 1286.67 | 1472.50 | 176.67 | 138.33 | 200.83 | 255.83 |

ตารางที่ ค.19 ความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกสกัดในหอสกัด ที่ความเข้มข้นในน้ำหมักเริ่มต้นต่างๆ ในวัฏภาคต่อเนื่อง ตามเวลา ความเร็วรอบในการปั่นกวน 100 รอบต่อนาที และอัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว และวัฏภาคต่อเนื่อง 3.4 และ 11.84 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

| | ความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกสกัดในหอสกัดในวัฏภาคกระจายตัว ที่ความเข้มข้นน้ำหมักเริ่มต้นต่างๆในวัฏภาคต่อเนื่อง (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | | ความเข้มข้นของโปรตีนที่ถูกสกัดในวัฏภาคต่อเนื่องที่ความเข้มข้นน้ำหมักเริ่มต้นต่างๆในวัฏภาคต่อเนื่อง (มิลลิกรัมต่อลิตร) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| เวลา | 20% | 40% | 60% | 72% | 20% | 40% | 60% | 72% |
| 0 | 10.05 | 17.14 | 42.38 | 51.64 | 82.62 | 113.80 | 131.19 | 144.05 |
| 10 | 10.72 | 19.28 | 43.57 | 62.62 | 65.00 | 59.28 | 132.14 | 146.67 |
| 20 | 10.48 | 20.71 | 45.23 | 64.28 | 68.20 | 65.72 | 132.86 | 141.67 |

# ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววิไลวรรณ ช่วยยก เกิดเมื่อวันที่ 15 พฤศจิกายน 2518 ที่ อ. กงหรา จังหวัดพัทลุง สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2540 หลังจากนั้นได้เข้าศึกษาในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2541

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย