บทที่ 1
บทนำ

โพรทีเอส หรือ โพรทีโอไลติกเอนไซม์ (Proteolytic enzyme) เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายโปรตีน เกิดจากการหมักเชื้อจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา หรือแบคทีเรีย แบคทีเรียที่นิยมใช้ในการผลิตโพรทีเอสคือแบคทีเรียสกุล *Bacillus* เนื่องจากแบคทีเรียสกุลนี้สามารถผลิตเอนไซม์โพรทีเอสออกมาภายนอกเซลล์ได้ในปริมาณที่มาก

เอนไซม์โพรทีเอส เป็นเอนไซม์ที่มีความต้องการมากที่สุดในอุตสาหกรรมโดยมีปริมาณการใช้สูงถึง 60 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมทั้งหมด(Ng และ Kenealy, 1989) เอนไซม์โพรทีเอสเข้าไปมีบทบาทในอุตสาหกรรมหลายชนิดได้แก่ อุตสาหกรรมผงซักฟอก การซักแห้ง ฟอกหนัง อาหาร และยา เป็นต้น ดังนั้นการสกัดแยกเอนไซม์โพรทีเอสออกจากน้ำหมักให้มีความเข้มข้นสูง มีความบริสุทธิ์สูง และสามารถเก็บรักษาเอาไว้ได้นาน ก่อนการนำไปใช้งานจึงมีความสำคัญและเป็นประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมเป็นอย่างมาก

ระบบการสกัดโปรตีนหรือเอนไซม์มีอยู่ด้วยกันหลายระบบ แต่ระบบที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางในการใช้เพิ่มความเข้มข้นและเพิ่มความบริสุทธิ์คือ การสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค(Aqueous two-phase systems, ATPSs)(Sanjiv V.และคณะ, 1993) โดยระบบนี้ใช้หลักการของการสกัดของเหลวด้วยของเหลว (liquid-liquid extraction) เป็นระบบที่ทำได้ง่าย มีประสิทธิภาพสูง สะดวกในการดำเนินงาน และมีสภาวะแวดล้อมของระบบที่เหมาะสมกับเอมไซม์ เนื่องจากระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค มีน้ำเป็นตัวทำละลายหลักของระบบ ซึ่งน้ำเป็นตัวทำละลายตามธรรมชาติของเอนไซม์ด้วย ระบบการสกัดด้วยสารละลายน้ำสองวัฏภาคนั้นมีด้วยกันสองระบบ คือ ระบบที่ประกอบด้วย พอลิเมอร์ 2 ชนิดและระบบที่ประกอบด้วย พอลิเมอร์และเกลือ โดยในงานวิจัยนี้จะเลือกระบบที่เป็นพอลิเมอร์(พอลีเอทิลีนไกลคอล 1000; PEG 1000)และเกลือ(โพแทสเซียมฟอสเฟต)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินงานตลอดการวิจัยนี้ คือ หอสกัดชนิดโอลชูรัชตัน (Oldshue-Rushton extraction column) ลักษณะของหอสกัดจะประกอบด้วยวงแหวนซึ่งเป็นตัวแบ่งหอสกัดออกเป็นส่วนๆตามความยาวของหอสกัด ในแต่ละส่วนจะประกอบด้วยใบกวน แบบ 4 bladed disc turbines ที่ติดอยู่ที่แกนหมุน นอกจากนี้ยังประกอบด้วย baffle อีก 4 อันที่ติดอยู่ที่ผนังตามแนวตั้ง หอสกัดชนิดนี้เป็นอีกชนิดหนึ่งที่สามารถแก้ปัญหาการกลับมาผสมกันของวัฏภาคในแนวแกน ในการดำเนินการสกัดจะเริ่มต้นด้วยวัฏภาคต่อเนื่อง(ประกอบด้วยน้ำหมักและโพแทสเซียมฟอสเฟตเป็นหลัก)จะถูกป้อนทางด้านบนและจะออกจากหอทางด้านล่าง ส่วนวัฏภาคกระจายตัว(ประกอบด้วย PEG 1000 เป็นหลัก)จะถูกป้อนจากทางด้านล่างของหอผ่านรูขนาด 1-2 มิลลิเมตร โดยลักษณะ

การกระจายตัวของวัฏภาคกระจายตัวจะเป็นหยดๆขึ้นสู่ทางด้านบนและมีแรงกล คือใบพัดเพื่อช่วยเพิ่มการกระจายตัวของหยดและช่วยในการผสมผสาน

ในอดีตที่ผ่านมาได้มีงานวิจัยที่สกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอส(alkaline protease) โดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคภายในหอสกัดโอลชูรัชตันขนาดเล็ก(ขนาด 0.715 ลิตร) (วิไลวรรณ, 2544) ในการสกัดเอนไซม์ภายในหอสกัดขนาดเล็กจะศึกษาปัจจัยของ ความเร็วรอบในการปั่นกวนของใบพัด อัตราไหลของวัฏภาคกระจายตัว อัตราไหลของวัฏภาคต่อเนื่อง และความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่อง ที่มีผลต่อจำนวนเท่าความบริสุทธิ์ เปอร์เซ็นต์ผลได้และประสิทธิภาพการสกัด(วิไลวรรณ, 2544) แต่ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นเพื่อจะศึกษาถึงประสิทธิภาพของการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสโดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในหอสกัดโอลชูรัชตันที่มีขนาดใหญ่ขึ้น(ขนาด 5.7 ลิตร) เพื่อเป็นแนวทางที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.1 วัตถุประสงค์

เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสจากน้ำหมักของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในหอสกัดโอลชูรัชตันขนาด 5.7 ลิตร

1.2 ขอบเขตของโครงงาน

1.2.1 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอส จากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยปัจจัยที่ทำการศึกษามีดังนี้

1.2.1.1 ความเข้มข้นของน้ำหมักในวัฏภาคต่อเนื่อง (วัฏภาคที่มีโพแทสเซียมฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบหลัก) โดยค่าที่ศึกษาอยู่ในช่วง20-72 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

1.2.1.2 อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง/วัฏภาคกระจายตัว ที่สัดส่วนเชิงปริมาตรของทั้งสองวัฏภาคคงที่ ที่ 3:1 โดยค่าที่ทำการศึกษาคือ 42/12, 69/20 และ 97/28 มิลลิลิตรต่อนาที

1.2.1.3 การปั่นกวนของใบพัดโดยค่าที่ศึกษาอยู่ในช่วง 0-200 รอบต่อนาที

1.2.2 ทำการทดลองเพื่อหาประสิทธิภาพของหอสกัด โดยปัจจัยที่นำมาพิจารณาคือ

1.2.2.1 ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวมของเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอส (Overall mass transfer coefficient; $K_{OD}a$) ระหว่างวัฏภาค

1.2.2.2 เปอร์เซ็นต์ผลได้(% Yield)

1.2.2.3 จำนวนเท่าของความบริสุทธิ์เมื่อเทียบกับน้ำหมักเริ่มต้น(Purification factor; PF)

1.2.2.4 โพรไฟล์ความเข้มข้นของเอนไซม์ในวัฏภาคต่อเนื่องตามความสูงของหอสกัด

1.2.3 ทำการทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ที่สามารถสกัดได้

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสโดยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในหอสกัดชนิดโอลชูรัสตันขนาด 5.7 ลิตร