บทที่ 3
ตรวจเอกสาร

3.1 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของการสกัดในหอสกัด

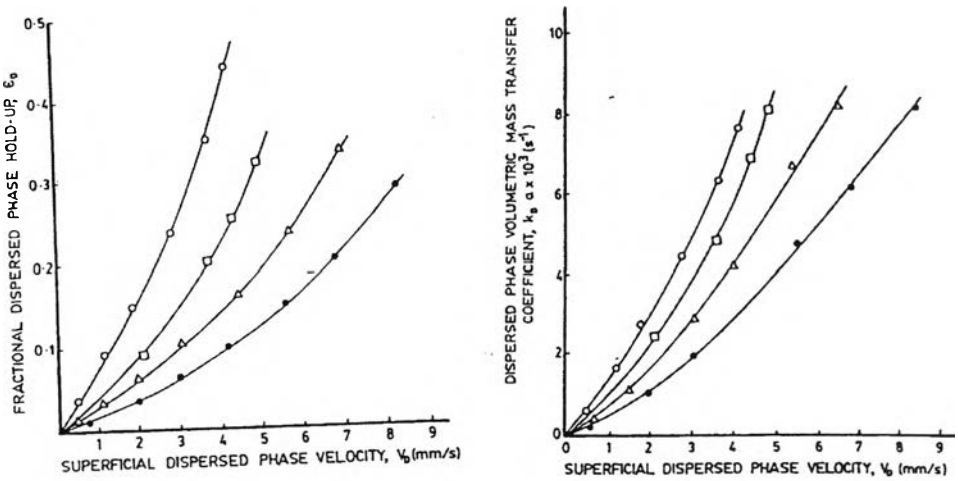
งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดแยกแอลคาไลน์โพรทีเอสในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ PEG 1000 และโพแทสเซียมฟอสเฟต ในหอสกัดโอลชูรัชตันขนาด 5.7 ลิตร ซึ่งสามารถหาประสิทธิภาพของหอสกัดได้จากอิทธิพลต่างๆที่มีผลต่อ จำนวนเท่าความบริสุทธิ์ เปอร์เซ็นต์ผลได้ และสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลรวม ดังนี้

3.1.1 อิทธิพลของ Superficial velocity ของวัฏภาคกระจายตัว (Superficial velocity of dispersed phase)

จากงานวิจัยของ Jafarabad และคณะ, (1992) งานวิจัยของ Pawar และคณะ, (1997) งานวิจัยของ Srinivas และคณะ, (2002) รวมถึงงานวิจัยของ Vahid และคณะ, (2005) ทั้งสี่งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาถึงอิทธิพลของ Superficial velocity ของวัฏภาคกระจายตัว (Superficial velocity of dispersed phase) ที่มีผลต่อ dispersed phase hold up และสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลสาร งานวิจัยทั้งสี่ให้ผลสอดคล้องกันโดยพบว่า เมื่อเพิ่ม Superficial velocity ของวัฏภาคกระจายตัว (Superficial velocity of dispersed phase) จะทำให้ค่า dispersed phase hold up และค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลสารมีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากเมื่อเพิ่ม Superficial velocity จะทำให้ขนาดของหยดของวัฏภาคกระจายตัวมีขนาดลดลง ส่งผลให้พื้นที่ผิวในการถ่ายเทมวลสารเพิ่มขึ้น ทำให้ค่า dispersed phase hold upเพิ่มขึ้นจึงทำให้สัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลสารมีค่าเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 3.1

3.1.2 อิทธิพลของความเร็วในการปั่นกวนของใบพัด

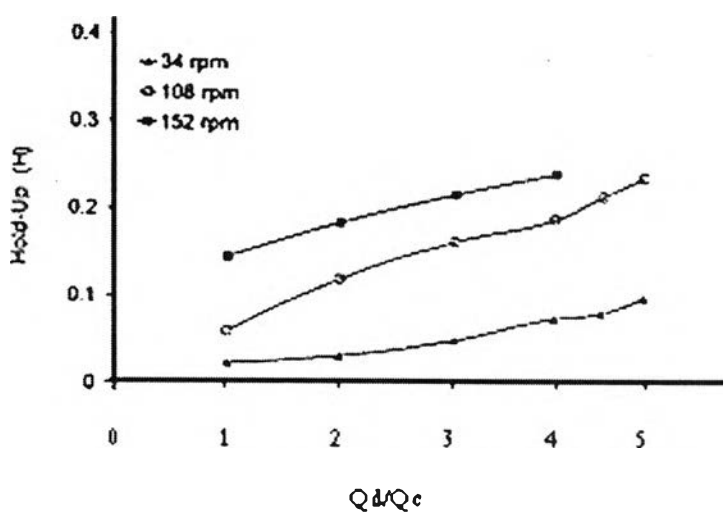
งานวิจัยของ Coimbra และคณะ, (1998) งานวิจัยของ Sarubbo และคณะ, (2003) รวมถึงงานวิจัยของ Giraldo-Zuniga และคณะ, (2004) ทำการศึกษา Axial mixing ในหอสกัดชนิด Graesser liquid-liquid จากสองงานวิจัยแรกได้ทำการศึกษาถึงอิทธิพลของความเร็วรอบของใบพัดที่มีผลต่อค่า hold up โดยพบว่าเมื่อเพิ่มความเร็วในการปั่นกวนส่งผลให้ค่า hold up สูงขึ้นเนื่องจากสามารถลดขนาดของหยดของวัฏภาคกระจายตัวและสามารถเพิ่มปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว ส่วนงานวิจัยของ Giraldo-Zuniga และคณะ, (2004) ทำการศึกษาความเร็วในการปั่นกวนของใบพัดที่มีผลต่อ Axial mixing ซึ่งจากการศึกษาพบว่า เมื่อเพิ่มความเร็วในการปั่นกวนนั้นจะส่งผลให้ขนาดของหยดของวัฏภาคกระจายตัวมีค่าลดลง และเมื่อเพิ่มความเร็วในการปั่นกวนจะเพิ่ม Axial mixingในวัฏภาคกระจายตัวได้ ดังแสดงในรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.1 (1). แสดงถึงอิทธิพลของ Superficial velocity ของวัฏภาคกระจายตัวต่อค่า dispersed phase hold up ;

(2). แสดงถึงอิทธิพลของ Superficial velocity ของวัฏภาคกระจายตัวต่อค่าค่าสัมประสิทธิการถ่ายเทมวลสาร;

○ระบบที่ 1,□ระบบที่ 2 , △ ระบบที่ 3, ● ระบบที่ 4 (Pawar และคณะ, 1997)



รูปที่ 3.2 แสดงอิทธิพลของความเร็วในการปั่นกวนของใบพัดที่มีผลต่อ hold up (Coimbra และคณะ, 1977)

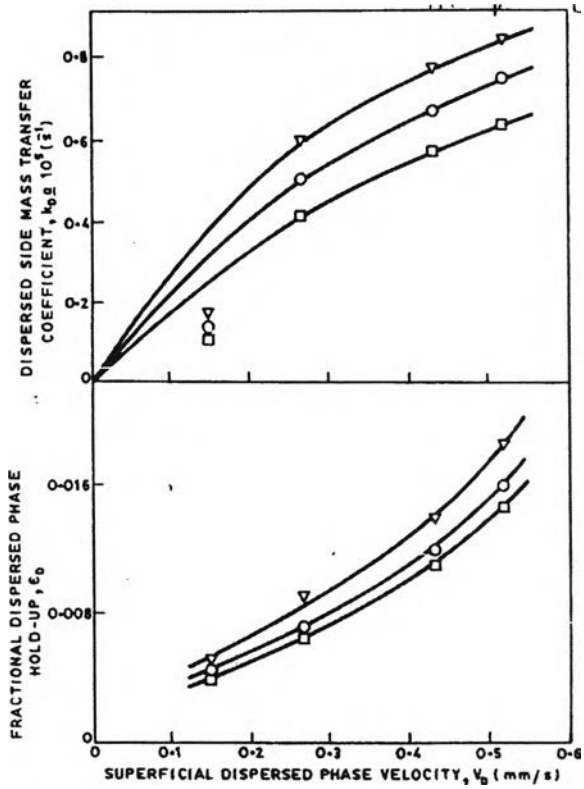
3.1.3 อิทธิพลของ Sparger ในการสกัดของหอสกัดแบบ Spray (Spray column)

3.1.3.1 อิทธิพลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Sparger

จากงานวิจัย Jafarabad และคณะ, (1991) และงานวิจัยของ Srinivas และคณะ, (2002) ได้ทำการวิจัยถึงอิทธิพลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ sparger ที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลสารและค่า dispersed phase hold up โดยทำการวิจัยที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 1-2 มิลลิเมตรและ 0.5-1.33 มิลลิเมตร พบว่าทั้งสองงานวิจัยนี้ให้ผลแตกต่างกันเนื่องจาก รูปแบบของ sparger แตกต่างกัน โดยที่ Jafarabad และคณะ,(1991) ไม่ได้กำหนดรูปแบบของตัว sparger และเมื่อเพิ่มขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของ Sparger จะทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลสารและค่า dispersed phase hold up มีค่าลดลงเนื่องจากจะทำให้ขนาดของหยดที่ผ่านรูของ Sparger มีขนาดใหญ่การถ่ายเทมวลสารเกิดขึ้นได้น้อย จึงไปลดค่าทั้งสอง แต่งานวิจัยของ Srinivas และคณะ, (2002) ลักษณะของ sparger เป็นหลอดเล็กๆ และให้เหตุผลว่าเมื่อขนาดของ Sparger เพิ่มขึ้นเท่ากับเป็นการเพิ่ม super facial velocity ทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลสารและค่า dispersed phase hold up มีค่าเพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 3.3 และ 3.4

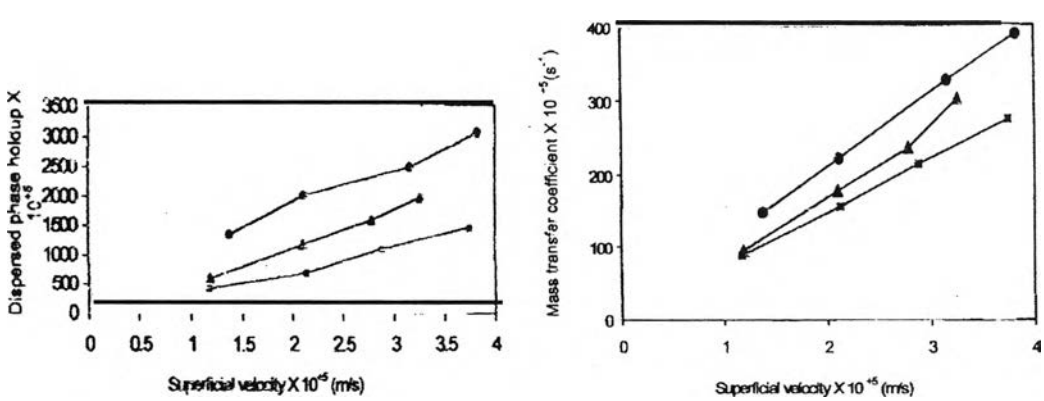
3.1.3.2 อิทธิพลของจำนวนรูของ sparger

งานวิจัยของ Jafarabad และคณะ, (1992) ทำการศึกษาถึงอิทธิพลของจำนวนรูของ sparger ที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลสารและค่า dispersed phase hold up โดยจำนวนรูอยู่ในช่วง 1-9 รู จากงานวิจัยพบว่าเมื่อเพิ่มจำนวนรู ทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลสารและค่า dispersed phase hold up มีค่ามากขึ้น



Symbol	Distributor number (Table 3)	Diameter of holes (mm)
▽	5	1.0
○	6	1.5
□	7	2.0

รูปที่ 3.3 แสดงอิทธิพลของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ sparger ที่มีผลต่อค่า dispersed phase hold upและค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลสารของวัฏภาคกระจายตัว (Jafarabad และคณะ, 1991)



รูปที่ 3.4 แสดงอิทธิพลของขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของ sparger ที่มีผลต่อ dispersed phase hold upและค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทมวลสารของวัฏภาคกระจายตัว ■ , 0.50 mm. ; ▲ , 0.92 mm. ; ● , 1.32 mm. (Srinivas และคณะ, 2002)

3.2 การสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัดต่างๆ

จากงานวิจัยของ Han-Seung Joo และคณะ, (2001) ได้ทำการศึกษาการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอส จากเชื้อแบคทีเรีย *Periserrula leucophryna* และงานวิจัยของ Anshu และคณะ ,(2005) ได้ทำการศึกษาการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอส จากเชื้อแบคทีเรีย haloalkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* โดยใช้หอสกัดแบบ hydrophobic chromatography ที่มีขนาด 2.5 × 5 เซนติเมตร และ 1× 6.5 เซนติเมตรตามลำดับ ที่มีผลต่อจำนวนเท่าความบริสุทธิ์ และเปอร์เซ็นต์ผลได้ จากงานวิจัยของ Han-Seung Joo และคณะ, (2001) พบว่าหอสกัดชนิดนี้สามารถเพิ่มจำนวนเท่าความบริสุทธิ์ได้เท่ากับ 49 เท่าและได้เปอร์เซ็นต์ผลได้เท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์ และงานวิจัยของ Anshu และคณะ,(2005) พบว่าสามรถเพิ่มจำนวนเท่าความบริสุทธิ์ได้เท่ากับ 10 เท่าและได้เปอร์เซ็นต์ผลได้เท่ากับ 82 เปอร์เซ็นต์ ส่วนงานวิจัยของ Pinar และคณะ,(2002) ทำการศึกษาการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอส โดยใช้หอสกัดแบบ cation และ anion-exchangers โดยจะทำการปรับเปลี่ยนเรซิ่นที่บรรจุภายในหอสกัดทั้งหมด 4 ชนิดได้แก่ low acidic Macro-prep CM, high acidic Macro-prep HighS, low basic Macro-prep DEAE และ high basic Macro-prep HighQ และค่าความเป็นกรดด่างของระบบ 2 ช่วงคือ 6.5–8.0 และ 9.5–11.0 ที่มีผลต่อการแลกเปลี่ยนไอออนที่สภาวะสมดุลและเปอร์เซ็นต์ผลได้ จากงานวิจัยพบว่า low acidic Macro-prep CM ที่ค่าความเป็นกรดด่างของระบบเท่ากับ 6.5 จะให้เปอร์เซ็นต์ผลได้เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือได้ว่าเป็นผลการทดลองที่ดีที่สุด

จากงานวิจัยข้างต้นจะพบว่าเป็นงานวิจัยที่ดำเนินการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอส ที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียต่างๆ ส่วนหอสกัดที่ใช้นั้นจะเป็นหอสกัดขนาดห้องปฏิบัติการเท่านั้น

3.3 การทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ที่สามารถสกัดได้

จากงานวิจัยของ วิไลวรรณ,(2544) ได้ทำการทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ที่สามารถสกัดได้และกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคกระจายตัว เพื่อหาระยะเวลาที่สามารถเก็บรักษาเอนไซม์ก่อนที่จะนำไปใช้งาน จากงานวิจัยพบว่าเอนไซม์มีค่ากิจกรรมลดลงจากเริ่มต้นเท่ากับ 12.9, 9.2 และ 6.2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 1 เดือนที่อุณหภูมิ 32±2, 4 และ -20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

3.4 การพัฒนางานวิจัยการสกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัดชนิดโอลชูรัชตัน

งานวิจัยนี้ได้มีการพัฒนามาอย่างต่อเนื่องโดย เริ่มต้นมาจากงานวิจัยของนันทิญา, (2543) ซึ่งนันทิญาได้ศึกษาการแยกแอลคาไลน์โพรทีเอสจาก *Bacillus subtilis* NS 99 ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคของ PEG 1000 กับโพแทสเซียมฟอสเฟต ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) และความดันบรรยากาศ โดยศึกษาอิทธิพลจากปัจจัยต่างๆ เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบ(pH) ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และความยาวของเส้นผูก ที่มีผลต่อลักษณะของแผนภาพวัฏภาค

และค่าสัมประสิทธิ์การแยก(m) จากการวิจัยพบว่า pH มีผลน้อยมากหรือไม่มีผลต่อการแยกวัฏภาค ในขณะที่การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์จะไปลดความเข้มข้นของ PEG 1000 และ/หรือ โพแทสเซียมฟอสเฟตที่ต้องการใช้ในการเกิดการแยกวัฏภาค ส่วนค่า m ของแอลคาไลน์โพรทีเอส พบว่าจะเพิ่มขึ้นเมื่อ pH เพิ่มขึ้น แต่จะลดลงเมื่อเพิ่มความยาวของเส้นผูกและความเข้มข้นของ โซเดียมคลอไรด์ จากนั้นได้มีการพัฒนางานวิจัยนี้ต่อโดยวิไลวรรณ, (2544) ซึ่งวิไลวรรณได้ ทำการศึกษาการแยกแอลคาไลน์โพรทีเอสโดยตรงจากน้ำหมักของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยใช้ระบบเดียวกับของนันทิญา งานวิจัยนี้จะแบ่งออกเป็นสามส่วนใหญ่ๆคือ ส่วนแรกจะศึกษา อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบ สัดส่วนเชิงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างและ ความเข้มข้นของน้ำหมักเริ่มต้น ที่มีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยก ค่ากิจกรรมจำเพาะของแอล คาไลน์โพรทีเอส และเปอร์เซ็นต์ผลได้ ส่วนที่สองคือการเลือกชนิดและออกแบบหอสกัด โดยใช้ ปริมาตรไหลผ่าน จำนวนขั้นตอนสมดุล คุณสมบัติทางกายภาพ สัดส่วนของอัตราไหลเชิงปริมาตร ของวัฏภาค ปริมาณของแข็งในระบบ ความง่ายในการทำความสะอาดและสามารถดูแลรักษาและ ซ่อมบำรุงได้ง่ายเป็นเกณฑ์ในการเลือกหอสกัด พบว่าหอสกัดชนิดโอลชูรัชตัน เป็นหอสกัดที่ เหมาะสมที่สุด ส่วนที่สามจะศึกษาถึงอิทธิพลของความเร็วรอบของการปั่นกวนของใบพัด อัตรา ไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัว อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคต่อเนื่อง และความเข้มข้น ของน้ำหมักที่เติมในวัฏภาคต่อเนื่อง ที่มีผลต่อจำนวนเท่าความบริสุทธิ์ เปอร์เซ็นต์ผลได้ และ ประสิทธิภาพของการสกัด โดยทำการสกัดแบบต่อเนื่องในหอสกัดขนาด 0.715 ลิตร โดยวัฏภาค กระจายตัวมีองค์ประกอบดังนี้ PEG 1000 42.5%(w/w) โพตัสเซียมฟอสเฟต 2.5%(w/w) น้ำ 55.0%(w/w) ไหลขึ้นสวนทางกับวัฏภาคต่อเนื่องที่ไหลลง ซึ่งมีองค์ประกอบของ โพแทสเซียม ฟอสเฟต 28%(w/w) น้ำหรือน้ำหมัก 72.0%(w/w) ซึ่งพบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดเอนไซม์ แอลคาไลน์โพรทีเอสในหอสกัดแบบโอลชูรัชตันคือ ความเร็วรอบในการปั่นกวนเท่ากับ 100 รอบ ต่อนาที อัตราไหลเชิงปริมาตรของวัฏภาคกระจายตัวและวัฏภาคต่อเนื่องเท่ากับ 3.1 และ 11.8 มิลลิลิตรต่อนาที ความเข้มข้นของน้ำหมักเริ่มต้นเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์จากนั้นได้มีการพัฒนาต่อ โดย ธนพงษ์ และคณะ, (2545) ซึ่ง ธนพงษ์ และคณะได้ศึกษาการออกแบบหอสกัดชนิดโอลชูรัช ตันที่มีขนาดใหญ่ขึ้น จากข้อมูลที่ได้จากหอสกัดต้นแบบขนาดห้อง ปฏิบัติการซึ่งมีขนาดเล็กกว่า รวมถึงผลของขนาดหอสกัดต่อประสิทธิภาพการสกัด นอกจากนั้นยังตรวจสอบการสลายตัวของ เอนไซม์ในวัฏภาคกระจายตัว ที่ถูกเก็บไว้ในระยะเวลาหนึ่งเพื่อพิสูจน์เสถียรภาพของผลิตภัณฑ์ที่ ได้จากการสกัด โดยหอสกัดนี้จะใช้สกัดเอนไซม์แอลคาไลน์โพรทีเอสที่ได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยใช้องค์ประกอบของแต่ละวัฏภาคเหมือนกันกับของวิไลวรรณ จากการ ทดลองพบว่าไม่สามารถหาค่าพื้นที่หน้าตัดและความสูงที่เหมาะสมได้เนื่องจากข้อ จำกัดของปั๊มป์ ดังนั้นการออกแบบจึงใช้อัตราส่วนขยายเป็น 2 เท่า เพื่อศึกษาผลของขนาดที่มีต่อประสิทธิภาพการ สกัด ซึ่งพบว่าเมื่อเปรียบเทียบลักษณะความเข้มข้นตามความสูงของวัฏภาคต่อ เนื่องมีลักษณะ

ใกล้เคียงกัน และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพสูงสุดในการสกัดพบว่าหอสกัดต้น แบบมีเปอร์เซ็นต์ผลได้ ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่สกัดได้ และความบริสุทธิ์น้อยกว่าหอสกัดที่มีการขยายขนาดแล้ว สำหรับการทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์พบว่า PEG มีผลช่วยรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์