ปัจจัยที่ส่งผลต่อการแยกเพอร์ออกซิเดสจากการสกัดด้วยสารละลายน้ำสองวัฏภาค

Factors Affecting the Partitioning of Peroxidase from Aqueous Two-Phase Extraction

เบญจมาศ นนทวงษ์[1], ปาจรีย์ บุญเชิญ[1] และ กรรณิกา รัตนพงศ์เลขา[1,*]

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี, คณะวิศวกรรมศาสตร์, มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี เมืองศรีไค วารินชำราบ อุบลราชธานี 34190

Benjamas Nontawong[1], Pajaree Bunchoen[1] and Karnika Ratanapongleka[1,*]

Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Ubon Ratchathani University, Mueang Si Khai, Warin Chamrap, Ubonratchathani, 34190, Thailand

***Corresponding Author E-mail:** karnika.r@ubu.ac.th

Received: Feb 13, 2023; **Revised:** Jun 11, 2023; **Accepted:** Jul 11, 2023

บทคัดย่อ

เพอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่เร่งการออกซิเดชันของสารต่าง ๆ ด้วยการใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เป็นตัวรับอิเล็กตรอน มีบทบาทสำคัญในหลายด้าน รวมถึงใช้ในการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการและการตรวจวัดภูมิคุ้มกัน พบมากในพืช ดังนั้นในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการแยกของเพอร์ออกซิเดสในการสกัดด้วยสารละลายน้ำสองวัฏภาค (ATPE) ซึ่งประกอบด้วยโพลีเอทิลีนไกลคอล (PEG) กับสารประกอบเกลืออนินทรีย์ โดยใช้กะหล่ำปลีเป็นแหล่งของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส ผลการศึกษาพบว่าการเปลี่ยนชนิดของเกลือที่ใช้สร้างระบบ (แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)) น้ำหนักโมเลกุลของโพลีเอทิลีนไกลคอล (PEG 1500 และ 6000) ความเข้มข้นของโพลีเอทิลีนไกลคอล (ร้อยละ 19–31 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ความเข้มข้นของเกลือ (ร้อยละ 10–22 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ค่าพีเอชของระบบ (4-8) และผลของโซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละ 0–5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ส่งผลต่อสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์ (K_E) สัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีน (K_p) สัดส่วนปริมาตรของวัฏภาค (V_r) ค่าร้อยละของผลได้ (%Yield) และค่าการทำบริสุทธิ์ (PF) สำหรับสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเพอร์ออกซิเดสที่ได้จากการศึกษานี้คือใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 16 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โพลีเอทิลีนไกลคอลน้ำหนักโมเลกุล 1500 ความเข้มข้นร้อยละ 25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ค่าพีเอชของระบบเท่ากับ 6 และไม่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์เท่ากับ 15.75 ± 4.07 ค่าร้อยละของผลได้ 97.06 ± 0.71 และค่าการทำบริสุทธิ์ 4.86 ± 0.70 เท่า

คำสำคัญ: เพอร์ออกซิเดส, การสกัดด้วยสารละลายน้ำสองวัฏภาค, การแยก, กะหล่ำปลี

Abstract

Peroxidase is an enzyme that catalyzes the oxidation of various substances by utilizing hydrogen peroxide as an electron acceptor. It plays a significant role in multiple aspects, including laboratory analysis and immunoassays. Peroxidase is found abundantly in plant. Therefore, the purpose of this research is to study the factors affecting the partitioning of peroxidase using aqueous two-phase extraction (ATPE) consisting of polyethylene glycol (PEG) and inorganic salts. Cabbage was chosen as a source of peroxidase enzyme. The results showed that changes in the type of salt used to build the system (ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$), sodium sulfate (Na_2SO_4), dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) and disodium hydrogen phosphate

(Na_2HPO_4)), molecular weight of polyethylene glycol (PEG 1500 and 6000), polyethylene glycol concentration (19–31 %w/v), salt concentration (10–22 %w/v), system pH (4–8), and the effect of sodium chloride (0–5%w/v) affected the partition coefficient of the enzyme (K_E), the partition coefficient of the protein (K_P), volume fraction of phase (V_r), the percent yield (%Yield) and the purification factor (PF). The optimum condition for peroxidase extraction obtained in this study was using ammonium sulfate salt at a concentration of 16%w/v, polyethylene glycol molecular weight 1500 at a concentration of 25%w/v, the pH of the system was 6 and no sodium chloride was added. The partition coefficient of the enzyme was 15.75 ± 4.07, the percent yield was 97.06 ± 0.71, and the purification factor was 4.86 ± 0.70 times.

Keywords: Peroxidase, Aqueous Two-Phase Extraction, Partitioning, Cabbage

1. บทนำ

เพอร์ออกซิเดส (Peroxidase) ถูกจัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน เพอร์ออกซิเดสสามารถออกซิไดซ์สับสเตรทที่ให้อิเล็กตรอนได้หลายชนิดทั้งในกลุ่มของสารประกอบอินทรีย์และกลุ่มสารประกอบอนินทรีย์ [1] จากคุณสมบัติดังกล่าวเพอร์ออกซิเดสจึงถูกนำไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในด้านต่าง ๆ ได้แก่ ทางการแพทย์ การวิเคราะห์สารทางชีวเคมี เกษตรกรรม อุตสาหกรรมอาหาร และในการฟื้นฟูสภาวะแวดล้อม [2],[3] เพอร์ออกซิเดสถูกพบในสิ่งมีชีวิตหลากชนิดทั้งในพืช จุลินทรีย์ และในสัตว์ [2] ปัจจุบันเพอร์ออกซิเดสที่สกัดได้จากฮอร์สแรดิช (Horseradish) ถูกนิยมนำมาใช้อย่างมากเนื่องจากลักษณะสมบัติและการทำงานที่ดี แต่หากต้องนำเพอร์ออกซิเดสจากแหล่งดังกล่าวมาใช้งานในปริมาณที่มากอาจไม่เหมาะสมเนื่องจากราคาค่อนข้างสูงและต้องสั่งนำเข้าจากต่างประเทศ เพอร์ออกซิเดสยังถูกพบในพืชชนิดอื่น ๆ เช่น ถั่วเหลือง [4] มะเขือเทศ [5] มะระ [6] และหัวไชเท้า [7] โดยปริมาณที่พบในแต่ละแหล่งมีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามสำหรับงานวิจัยนี้ได้เลือกสกัดเอนไซม์นี้จากกะหล่ำปลี เนื่องจากเป็นพืชที่หาได้ง่าย ราคาไม่แพง มีปริมาณมาก และนิยมปลูกในประเทศไทย นอกจากการเลือกแหล่งที่ใช้สกัดเอนไซม์ที่เหมาะสมแล้ว วิธีที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์จัดเป็นหนึ่งในตัวแปรสำคัญที่ส่งผลต่อค่าผลได้ของการสกัดและราคาของเอนไซม์

การสกัดและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธีโครมาโทรกราฟฟี วิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส และวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียม วิธีการเหล่านี้อาจมีข้อจำกัดทางด้านค่าใช้จ่ายที่สูง ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะ ขั้นตอนการทำที่ซับซ้อน และอาจไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ผลิตเอนไซม์บริสุทธิ์ในปริมาณมาก [8],[9] สำหรับวิธีการสกัดเอนไซม์ด้วยสารละลายน้ำสองวัฏภาค (Aqueous Two-Phase Extraction; ATPE) [10] นอกจากจะช่วยลดข้อจำกัดที่กล่าวมาแล้ว วิธีนี้จะง่ายต่อการนำไปเพิ่มขนาดการผลิตและสะดวกในการจัดการ [11] และจากคุณสมบัติของเอนไซม์ที่เสมือนกับคุณสมบัติของโปรตีนคือหากใช้ความร้อนและสภาวะแวดล้อมที่รุนแรงในการสกัดจะส่งผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์ได้ แต่ด้วยวิธีการนี้มีน้ำเป็นองค์ประกอบหลักในการแยกจึงส่งผลกระทบต่อเสถียรภาพและการทำงานของเอนไซม์ไม่มาก นอกจากนี้สารที่นำมาใช้สร้างวัฏภาคของระบบสามารถถูกนำกลับมาใช้ซ้ำได้อีกด้วย [12] สำหรับการสร้างระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคทำได้โดยใช้สารละลายพอลิเมอร์สองชนิดที่ต่างกัน เช่น การใช้สารโพลีเอทิลีนไกลคอล (Polyethylene glycon; PEG) ร่วมกับสารแด็กซ์แตรน (Dextran) หรืออาจใช้พอลิเมอร์เพียงชนิดเดียวร่วมกับสารประกอบเกลืออนินทรีย์ เช่น เกลือในกลุ่มฟอสเฟต ซัลเฟต และซิเตรท เป็นต้น โดยความเข้มข้นของสารละลายทั้งสองที่ใช้ต้องเป็นความเข้มข้นเหนือจุดวิกฤตจึงทำให้เกิดการแบ่งวัฏภาค การสร้างวัฏภาคร่วมกับสารประกอบเกลืออนินทรีย์พบว่ามีค่าใช้จ่ายต่ำ ความหนืดที่เกิดขึ้นในระบบไม่มาก ส่งผลให้เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ

สกัดสามารถนำเอนไซม์ออกจากวัฏภาคได้ง่าย ดังนั้นการสร้างวัฏภาคด้วยสารดังกล่าวจึงได้รับความนิยมมากกว่าการสร้างวัฏภาคด้วยพอลิเมอร์สองชนิดที่ต่างกัน [13]

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาวิธีการสกัดด้วยสารละลายน้ำสองวัฏภาค พบว่าการแยกชั้นของโมเลกุลของสารที่ต้องการสกัดโดยเฉพาะเอนไซม์ในแต่ละวัฏภาคมีกลไกที่ซับซ้อนและการอธิบายถึงปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นมีความไม่ชัดเจนเท่าที่ควรเนื่องจากมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการแยกชั้นอยู่หลายปัจจัย เช่น ลักษณะสมบัติและโครงสร้างของเอนไซม์ แรงกระทำระหว่างโมเลกุลของสาร ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน แรงระหว่างประจุ แรงวันเดอวาล์ แรงระหว่างไฮโดรโฟบิก รวมถึงผลเสตียริก [10] นอกจากลักษณะสมบัติของเอนไซม์ที่ส่งผลต่อการแยกชั้นในแต่ละวัฏภาคแล้ว ปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการสร้างวัฏภาค เช่น ชนิดของเกลือ ความเข้มข้นของเกลือ น้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นของ PEG และค่าพีเอชของระบบ สามารถส่งผลต่อการแยกชั้นของเอนไซม์ไปยังวัฏภาคบนหรือล่างได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงผลของปัจจัยดังกล่าวข้างต้นต่อการสกัดเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากกะหล่ำปลีโดยมุ่งเน้นให้เอนไซม์ที่ต้องการสกัดแยกชั้นไปยังวัฏภาคหนึ่ง ในขณะที่สารปนเปื้อนรวมถึงโปรตีนชนิดอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องแยกไปอยู่ในวัฏภาคตรงข้ามกัน ซึ่งจะทำให้ค่าผลได้และความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ได้มีค่าสูง

2. ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ ได้แก่ โพลีเอทิลีนไกลคอล น้ำหนักโมเลกุล 1500 และ 6000 (Polyethylene glycol, PEG MW. 1500 and 6000) แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate, $(NH_4)_2SO_4$) โซเดียมซัลเฟต (Sodium sulfate, Na_2SO_4) ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Dipotassium hydrogen phosphate, K_2HPO_4) และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Disodium hydrogen phosphate, Na_2HPO_4) ของบริษัท Ajax finechem ประเทศนิวซีแลนด์ สารวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเพอร์ออกซิเดส ได้แก่ กัวไอเอคอล (Guaiacol, $C_7H_8O_2$) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, H_2O_2) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา และสารสำหรับวิเคราะห์โปรตีน ได้แก่ สารที่ใช้สำหรับเตรียมสารละลายแบรดฟอร์ด (Bradford reagent) สารโปรตีนมาตรฐาน ของบริษัท Fluka สหราชอาณาจักร สารเคมีอื่นที่ใช้นอกจากนี้เป็นสารที่ใช้ในเกรดระดับห้องปฏิบัติการสำหรับการวิเคราะห์ที่มีความบริสุทธิ์สูงกว่าร้อยละ 99

2.2 การเตรียมเพอร์ออกซิเดสหยาบ

กะหล่ำปลีพันธุ์ธรรมดา (common cabbage) เป็นสายพันธุ์ที่นิยมปลูกและบริโภคในประเทศไทยถูกเลือกนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยนำกะหล่ำปลี 1000 กรัม มาล้างด้วยน้ำสะอาด ตัดเป็นชิ้นเล็กนำไปผ่านเครื่องสกัดน้ำผลไม้แบบแยกกากและกรองเศษตะกอนแขวนลอยออกด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนที่เป็นของเหลวไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเศษตะกอนอีกครั้ง ส่วนใสที่ได้คือเพอร์ออกซิเดสหยาบ เอนไซม์หยาบที่สกัดได้จะถูกนำไปแช่แข็งเพื่อรักษาเสถียรภาพการทำงานของเอนไซม์ให้มีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุดที่อุณหภูมิ -20 ± 3 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป และก่อนทำการทดลองจะมีการตรวจสอบค่ากิจกรรมการทำงานของเพอร์ออกซิเดสเริ่มต้นทุกครั้ง

2.3 การเตรียมระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคถูกเตรียมขึ้นที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 3 องศาเซลเซียส) โดยนำสารละลาย PEG เข้มข้นมาผสมกับสารละลายเกลืออนินทรีย์เข้มข้นจนกระทั่งได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ จากนั้นเติมเพอร์ออกซิเดสหยาบร้อยละ 10 ลงไปในระบบ โดยปริมาตรรวมสุดท้ายของระบบเท่ากับ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อเกิดการแยกชั้นของสารละลายในระบบออกเป็น 2 ส่วน คือส่วนของวัฏภาคบนและส่วนของวัฏภาคล่าง ทำการแยกเก็บตัวอย่างของแต่ละวัฏภาคโดยใช้เข็มฉีดยาตรวจวัดปริมาตรที่เกิดขึ้นของแต่ละวัฏภาค วิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ปรากฏในแต่ละวัฏภาค

การศึกษาชนิดของเกลือที่ใช้ในการสกัด เกลือ 4 ชนิดที่ถูกเลือกมาทดสอบในงานวิจัยนี้ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) เกลือทุกชนิดถูกควบคุมความเข้มข้นที่ร้อยละ 12 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเลือกความเข้มข้นของ PEG 1500 ที่ร้อยละ 25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หลังจากได้ชนิดเกลือที่เหมาะสมแล้ว เกลือชนิดนั้นจะถูกนำไปใช้ในการศึกษาร่วมกับขั้นตอนถัดไปคือการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นของ PEG ที่มีต่อการสกัดเพอร์ออกซิเดส โดยใช้ความเข้มข้นในช่วงร้อยละ 19–31 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และความเข้มข้นเกลือที่ร้อยละ 16 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สำหรับการศึกษาความเข้มข้นของเกลือจะเลือกใช้ในช่วงร้อยละ10–22 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และควบคุมความเข้มข้น PEG ที่ร้อยละ 25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช (4–8) ของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค และการเติมโซเดียมคลอไรด์ในช่วงร้อยละ 0–5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่มีต่อการสกัดเพอร์ออกซิเดส ผลการทดลองที่นำเสนอจะเป็นค่าเฉลี่ยที่เกิดจากการทำ 3 ซ้ำของแต่ละชุดการทดลอง

2.4 การวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเพอร์ออกซิเดสและการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

กิจกรรมการทำงานของเพอร์ออกซิเดสจะถูกวิเคราะห์ในรูปของอัตราการสลายตัวของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ด้วยเพอร์ออกซิเดสโดยมีกัวไอเอคอลเป็นตัวให้ไฮโดรเจน ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นวัดจากการเกิดสีที่ค่าความยาวคลื่น 436 นาโนเมตร ด้วยเครื่องยูวี-วิส สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-VIS spectrophotometer) (UV 1204, Shimadzu, Japan) โดยวิธีการวิเคราะห์อ้างอิงจากในงานของ Lakshmi [14] เริ่มจากนำเอนไซม์สกัด 50 ไมโครลิตร เติมลงในสารละลาย ปริมาตร 2.95 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 18 มิลลิโมลาร์ของกัวไอเอคอล และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ร้อยละ 0.05 ใน 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นและคำนวณค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ดังแสดงในสมการที่ (1) โดยกำหนดให้ค่ากิจกรรมการทำงานของเพอร์ออกซิเดส 1 หน่วย หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้เร่งการเปลี่ยน 1 ไมโครโมลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ

$$Peroxidase\ activity\ (\mathrm{U/ml}) = \frac{\Delta A_{436/min} \times 4 \times V_t \times df}{\varepsilon \times V_s} \quad (1)$$

เมื่อ V_t คือปริมาตรรวมที่ใช้ในปฏิกิริยา V_s คือปริมาตรของสารที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ df คือค่าการเจือจาง และ ε คือค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใช้วิธีของ Bradford [15] โดยเตรียมสารทดสอบจากการละลายโคแมสซี่บิลเลี่ยนบูล (Coomassie brilliant blue G250) 10 มิลลิกรัม ลงใน 25 มิลลิลิตร เอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตรต่อปริมาตร จากนั้นเติมกรดฟอสโฟลิก (ความเข้มข้นร้อยละ 85 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปรับปริมาตรรวมเป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น กรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1 ในการทดสอบจะนำสารละลายตัวอย่าง 40 ไมโครลิตร ผสมกับสารทดสอบ 2 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เทียบผลกับกราฟโปรตีนมาตรฐานที่เตรียมจากโบวินซีรั่มอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin, BSA)

2.5 การคำนวณค่าพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้อง

ค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ในการพิจารณาเกี่ยวกับการสกัดด้วยสารละลายน้ำสองวัฏภาคถูกนิยามดังนี้

สัดส่วนปริมาตรของวัฏภาค (V_r) คือสัดส่วนปริมาตรของสารละลายที่อยู่วัฏภาคบน (V_T) ต่อปริมาตรของสารละลายที่อยู่ในวัฏภาคล่าง (V_B) แสดงในสมการที่ (2)

$$V_r = \frac{V_T}{V_B} \quad (2)$$

ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์ (K_E) คือสัดส่วนของค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่มีอยู่ในวัฏภาคบน (E_T) ต่อค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่มีอยู่ในวัฏภาคล่าง (E_B) แสดงในสมการที่ (3)

$$K_E = \frac{E_T}{E_B} \quad (3)$$

ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีน (K_p) คือสัดส่วนความเข้มข้นของโปรตีนที่มีอยู่ในวัฏภาคบน (P_T) ต่อความเข้มข้นของโปรตีนที่มีอยู่ในวัฏภาคล่าง (P_B) แสดงในสมการที่ (4)

$$K_p = \frac{P_T}{P_B} \tag{4}$$

ค่าการทำบริสุทธิ์ (PF) คำนวณได้จากสัดส่วนของค่ากิจกรรมการทำงานจำเพาะของเอนไซม์ที่มีอยู่ในวัฏภาคบน (E_T / P_T) ต่อค่ากิจกรรมการทำงานจำเพาะของเอนไซม์หยาบ ซึ่งหาได้จากค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ (E_i) หารด้วยความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้จากส่วนใสสกัดจากกะหล่ำปลี (P_i) แสดงในสมการที่ (5)

$$PF = \frac{\frac{E_T}{P_T}}{\frac{E_i}{P_i}} \tag{5}$$

ค่าร้อยละของผลได้ (%Yield) คำนวณจากความสัมพันธ์ของสัดส่วนปริมาตรของวัฏภาคและค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์ แสดงในสมการที่ (6)

$$Yield(\%) = \frac{100}{1+\frac{1}{V_r K_E}} \tag{6}$$

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

3.1 ผลของชนิดของสารประกอบเกลือต่อการสกัดเพอร์ออกซิเดส

สารประกอบเกลือที่ใช้ในการสร้างระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคสามารถส่งผลต่อเสถียรภาพของระบบและการแบ่งชั้นของแต่ละวัฏภาคที่เกิดจากสารประกอบเกลือต่างชนิดกัน และเมื่อนำมาใช้ในการแยกเพอร์ออกซิเดสจะส่งผลต่อการกระจายตัวไปในวัฏภาคใดวัฏภาคหนึ่งได้ต่างกัน ทำให้ผลการสกัดที่เกิดขึ้นมีค่าแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่าสารประกอบเกลือต่างชนิดสามารถส่งผลต่อความสามารถในการละลายและเสถียรภาพของเอนไซม์ เช่น สารประกอบเกลือบางชนิดสามารถจับกับเอนไซม์กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ส่งผลให้ค่าการละลายและเสถียรภาพที่เกิดในวัฏภาคนั้นสูงขึ้น ในขณะที่เอนไซม์บางชนิดอาจให้ผลที่แตกต่างกันซึ่งขึ้นกับโครงสร้างของเอนไซม์นั้นด้วย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องพิจารณาถึงชนิดของสารประกอบเกลือที่เหมาะสมต่อการสร้างระบบและสกัดเพอร์ออกซิเดส เกลือกลุ่มฟอสเฟตและเกลือกลุ่มซัลเฟตถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการสร้างระบบสองวัฏภาค โดยไอออนลบ (SO_4^{-2} >HPO_4^{-2} > acetate) ที่อยู่ในเกลือจะส่งผลต่อการแบ่งวัฏภาคได้ดีกว่าไอออนบวก ($NH^{4+} > K^+ > Na^+ > Mg^{2+} > Ca^{2+}$) [9] สำหรับสารประกอบเกลือที่เลือกมาใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ $(NH_4)_2SO_4$, Na_2SO_4, K_2HPO_4 และ Na_2HPO_4 ความเข้มข้นที่ใช้ร้อยละ 12 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ร่วมกับสารละลาย PEG 1500 ความเข้มข้นที่ร้อยละ 25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ค่าพีเอชของระบบเท่ากับ 5

ผลของชนิดของสารประกอบเกลือที่มีต่อสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์ (K_E) สัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีน (K_p) สัดส่วนปริมาตรของวัฏภาค (V_r) ค่าร้อยละของผลได้ (%Yield) และค่าการทำบริสุทธิ์ (PF) ที่เกิดขึ้นในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคแสดงดัง**ตารางที่ 1** พบว่าสารประกอบเกลือต่างชนิดส่งผลต่อการเกิดวัฏภาคและการแยกของเอนไซม์ที่ต่างกัน เมื่อพิจารณาค่า V_r พบว่าสัดส่วนของปริมาตรที่เกิดขึ้นในวัฏภาคบนและล่างแตกต่างกัน โดยวัฏภาคล่างมีปริมาตรที่มากกว่าวัฏภาคบน ส่งผลให้ค่า V_r ต่ำกว่า 1 ยกเว้นสารประกอบเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ให้ค่า V_r สูงกว่า 1 สำหรับค่า K_E ที่คำนวณได้จากการใช้สารประกอบเกลือทุกชนิดมีค่ามากกว่า 1 สามารถกล่าวได้ว่าเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสส่วนใหญ่จะกระจายตัวไปยังวัฏภาคบนของระบบ และสารประกอบเกลือที่ใช้ทุกชนิดมีแนวโน้มที่ส่งผลให้เอนไซม์เคลื่อนที่ไปในทิศทางเดียวกัน ปรากฏการณ์ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเพอร์ออกซิเดสมีความเป็นไฮโดรโฟบิกสูงและจับกับ PEG ที่กระจายตัวอยู่มากในวัฏภาคบนได้ดีกว่าสารประกอบเกลือที่กระจายตัวอยู่มากในวัฏภาคล่าง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาลักษณะโครงสร้างเพอร์ออกซิเดสของ [16] และ [17] โดยเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจะประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่ากรดอะมิโน กรดอะมิโนมีทั้งในส่วนที่เป็นไฮโดรโฟบิก และไฮโดรฟิลิกทั้งแบบที่มีประจุและไม่มีประจุ การกระจายตัวของกรดอะมิโน

เหล่านี้จะส่งผลต่อโครงสร้างโดยรวมของเอนไซม์ นอกจากกรดอะมิโนแล้วเพอร์ออกซิเดสยังประกอบด้วยกลุ่มฮีม (Heme group) ซึ่งจัดว่าเป็นไฮโดรโฟบิก โดยกลุ่มฮีมเป็นโมเลกุลอินทรีย์มีโครงสร้างรูปวงแหวนที่เรียกว่าพอร์ไฟริน (Porphyrin) จับกับอะตอมของเหล็ก ทำให้บริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เกิดการถ่ายโอนอิเล็กตรอนได้ จะเห็นได้ว่าถึงแม้โครงสร้างของเพอร์ออกซิเดสจะไม่ใช่ไฮโดรโฟบิกทั้งหมด แต่บริเวณที่เป็นไฮโดรโฟบิกจะเป็นบริเวณที่มีพื้นที่มากกว่าและมีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ จึงส่งผลให้เพอร์ออกซิเดสแสดงความเป็นไฮโดรโฟบิกสูง และเมื่อพิจารณาค่า K_P จะพบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ที่ไม่ใช่เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคล่างมากกว่าวัฏภาคบน ทำให้ค่า K_P ที่คำนวณได้มีค่าน้อยกว่า 1 (ยกเว้นการใช้สารประกอบเกลือ Na_2HPO_4 ซึ่งแสดงผลการแยกของเอนไซม์ออกจากโปรตีนชนิดอื่นที่เกิดในวัฏภาคบนและวัฏภาคล่างใกล้เคียงกัน จึงส่งผลให้ K_P ที่ได้เท่ากับ 1.02 ± 0.82) ดังนั้นเมื่อพิจารณาค่า K_E ร่วมกับค่า K_P ที่เกิดขึ้นของสารประกอบเกลือแต่ละชนิดเทียบกันแล้ว พบว่าสารประกอบเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ ให้ค่า K_E สูงกว่าเกลือชนิดอื่น (4.08 ± 0.93) แต่ให้ค่า K_P ต่ำกว่าเกลือชนิดอื่น (0.54 ± 0.09) ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ ทำให้ความเป็นไฮโดรโฟบิกระหว่างวัฏภาคเพิ่มขึ้น [18] ส่งผลให้เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสกระจายตัวไปยังวัฏภาคบนและจับกับ PEG ได้ดี ในขณะที่โปรตีนชนิดอื่นซึ่งมีความเป็นไฮโดรฟิลิกจะชอบกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคล่าง จึงส่งผลให้ค่าร้อยละของผลได้ (%Yield) และค่าการทำบริสุทธิ์ (PF) ที่เกิดขึ้นมีค่ามากที่สุดคือร้อยละ 82.80 ± 0.92 และ 3.61 ± 0.35 เท่า ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ชนิดของสารประกอบเกลือต่อการสกัดเพอร์ออกซิเดสในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

Salt type	K_E	K_p	V_r	%Yield	PF (folds)
$(NH_4)_2SO_4$	4.08±0.93	0.54±0.09	1.18±0.01	82.80±0.92	3.61±0.35
Na_2SO_4	3.19±0.35	0.67±0.04	0.36±0.05	53.45±1.72	2.88±0.74
K_2HPO_4	3.33±0.05	0.90±0.68	0.60±0.04	66.64±0.20	2.89±0.38
Na_2HPO_4	1.81±0.26	1.02±0.82	0.40±0.01	41.99±0.26	2.86±0.44

อย่างไรก็ตามการเลือกใช้สารประกอบเกลือที่ต่างชนิดอาจมีความเหมาะสมกับเอนไซม์ที่ต่างกัน เช่น ระบบที่ประกอบด้วย PEG/$(NH_4)_2SO_4$ สามารถนำไปใช้สกัดเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสและเบต้ากลูโคซิเดสได้ดี [19] ในขณะที่การใช้เกลือโพแทสเซียมในการสกัดเอนไลเปสให้ประสิทธิภาพที่ดีกว่าการใช้เกลือโซเดียมและเกลือแอมโมเนียม [20] และจากงานวิจัยหลายชิ้น [21–23] ที่ใช้ ATPE ในการสกัดเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่มาจากจุลินทรีย์และพืชต่างชนิดกัน พบว่าสารประกอบเกลือที่ให้ผลการสกัดที่ดีและนิยมใช้คือเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษานี้ ดังนั้นสารประกอบเกลือดังกล่าวจึงถูกนำไปใช้ทดลองสำหรับขั้นตอนต่อไป

3.2 ผลของน้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นของ PEG ต่อการสกัดเพอร์ออกซิเดส

น้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นของ PEG จัดเป็นปัจจัยสำคัญที่สามารถส่งผลกระทบต่อพฤติกรรมการแบ่งวัฏภาคของ ATPE โดยทั่วไป PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงหรือมีความเข้มข้นสูง จะมีแนวโน้มที่จะสร้างระบบ ATPE ที่เสถียรกว่าและเพิ่มระดับการแบ่งวัฏภาคมากกว่าการใช้ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าหรือที่ความเข้มข้นต่ำกว่า ซึ่งสามารถนำไปสู่การสกัดเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นได้เนื่องจากเอนไซม์จะกระจายตัวไปยังวัฏภาคใดวัฏภาคหนึ่งจากสองวัฏภาคได้ดีขึ้น โดยขึ้นอยู่กับค่าแอฟฟินิตี้ของเอนไซม์ที่มีต่อวัฏภาคนั้น ปัจจัยดังกล่าวนี้ยังส่งผลต่อความสามารถในการละลายและเสถียรภาพของเอนไซม์เช่นเดียวกับชนิดของสารประกอบเกลือที่ใช้ในระบบ ATPE อย่างไรก็ตามผลของ PEG ต่อ

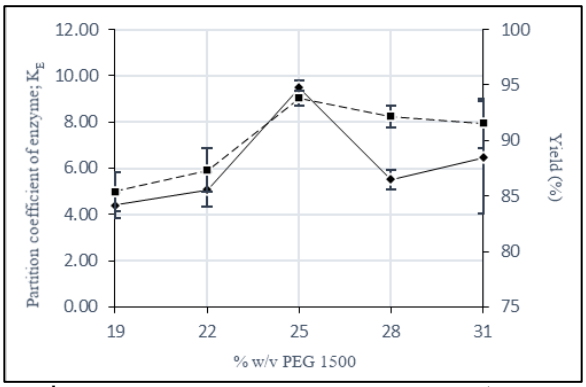
พฤติกรรมการแยกชั้นของเอนไซม์อาจมีความซับซ้อนและขึ้นกับโครงสร้างของเอนไซม์และ PEG ที่ใช้ ตลอดจนสภาวะแวดล้อมของระบบ สำหรับการศึกษานี้เลือกน้ำหนักโมเลกุลของ PEG ที่ 1500 และ PEG ที่ 6000 ความเข้มข้นถูกควบคุมเท่ากันที่ร้อยละ 25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ร้อยละ 16 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (การเลือกความเข้มข้นอ้างอิงจากกราฟเส้นแบ่งวัฏภาคที่ทำให้เกิด 2 วัฏภาคเมื่อใช้ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลดังกล่าว) และค่าพีเอชของระบบเท่ากับ 5

จาก**ตารางที่ 2** พบว่าการสกัดเอนไซม์ด้วย PEG 1500 ให้ ค่า K_E ค่า %Yield และค่า PF สูงกว่าการใช้ PEG 6000 ซึ่งโดยทั่วไปการเพิ่มน้ำหนักโมเลกุลของ PEG ส่งผลต่อความเป็นไฮโดรโฟบิกที่มากขึ้น แรงกระทำไฮโดรโฟบิกระหว่าง PEG กับบริเวณไฮโดรโฟบิกของเอนไซม์สูงขึ้น เอนไซม์กระจายตัวไปยังวัฏภาคบนได้มากขึ้น ทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์สูงขึ้น แต่เมื่อน้ำหนักโมเลกุลของ PEG เพิ่มขึ้นจนถึงจุดหนึ่ง ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์จะเริ่มลดลง เนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลของ PEG สูงเกินไป อาจทำให้ PEG เกิดการรวมตัวมากขึ้น (Large aggregates) ใน วัฏภาคบน ส่งผลต่อบริเวณพื้นที่ผิว (Surface area) ที่เอนไซม์จะสามารถเคลื่อนผ่านไปยังวัฏภาคบนลดลง ประกอบกับความหนืดที่เพิ่มขึ้นเมื่อน้ำหนักโมเลกุล PEG สูงขึ้น อาจส่งผลให้เอนไซม์ถูกสกัดและกระจายตัวได้ยากขึ้น โดยในการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใช้ PEG 1500 ให้ประสิทธิภาพการสกัดเอนไซม์ดีกว่าการใช้ PEG 6000

ตารางที่ 2 น้ำหนักโมเลกุลของ PEG ต่อการสกัดเพอร์ออกซิเดสในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

PEG MW.	K_E	K_p	V_r	%Yield	PF (folds)
PEG 1500	9.49 $\pm$ 0.30	0.70 $\pm$ 0.24	1.59 $\pm$ 0.03	93.78 $\pm$ 0.89	4.07 $\pm$ 0.95
PEG 6000	1.89 $\pm$ 0.44	1.53 $\pm$ 0.05	0.92 $\pm$ 0.04	63.49 $\pm$ 1.73	2.17 $\pm$ 1.08

เมื่อนำ PEG 1500 มาใช้ในการศึกษาความเข้มข้นที่ส่งผลต่อการสกัดเพอร์ออกซิเดส โดยกำหนดให้ $(NH_4)_2SO_4$ มีความเข้มข้นที่ร้อยละ 16 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และค่าพีเอชของระบบเท่ากับ 5 จากช่วงความเข้มข้นของ PEG 1500 ที่ศึกษาร้อยละ 19–31 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (**รูปที่ 1**) พบว่าค่า K_E และค่า %Yield มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 19–25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าความเข้มข้นของ PEG 1500 ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้วัฏภาคบนมีความเป็นไฮโดรโฟบิกสูง เพอร์ออกซิเดสจึงกระจายตัวไปยัง วัฏภาคบนมากขึ้น ส่วนโปรตีนชนิดอื่นซึ่งมีความเป็นไฮโดรฟิลิกจะชอบกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคล่าง ส่งผลให้ค่า %Yield สูงขึ้น แต่เมื่อใช้ PEG 1500 ที่มีความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ค่า K_E และค่า %Yield มีแนวโน้มลดลง ปรากฏการณ์ดังกล่าวสามารถอธิบายได้เหมือนกับกรณีการเพิ่มน้ำหนักโมเลกุลของ PEG เมื่อความเข้มข้นของ PEG เพิ่มขึ้นจนถึงจุดหนึ่ง ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์จะเริ่มลดลง เนื่องจากความเข้มข้นที่สูงขึ้นส่งผลต่อค่าความหนืดของสารละลายในวัฏภาคบนและทำให้แรงตึงผิวระหว่างวัฏภาคเพิ่มขึ้น [20] โอกาสที่เพอร์ออกซิเดสจะเคลื่อนและกระจายตัวไปยังวัฏภาคบนเกิดได้ยากขึ้น ค่า K_E จึงลดลง การกระจายตัวของเพอร์ออกซิเดสและโปรตีนชนิดอื่นอยู่ในวัฏภาคล่างมากขึ้นทำให้ ค่า %Yield ลดลง

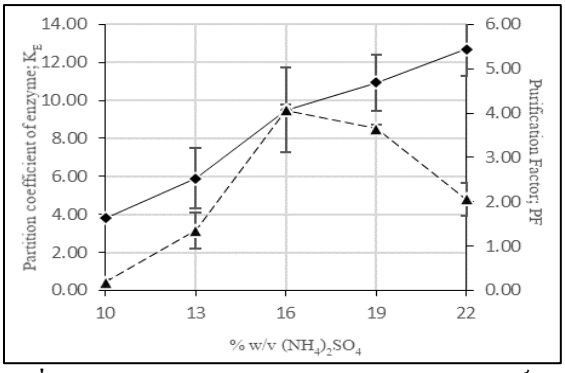


รูปที่ 1 ความเข้มข้นของ PEG 1500 ต่อสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์ (K_E, ♦) และค่าร้อยละของผลได้ (% Yield, ▪)

3.3 ผลของความเข้มข้นเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการสกัดเพอร์ออกซิเดส

ความเข้มข้นของเกลือที่ใช้ในการสร้างวัฏภาคในระบบ ATPE ส่งผลต่อการสกัดเช่นเดียวกับความเข้มข้นของ PEG ดังที่กล่าวมาแล้ว ในการทดลองนี้เลือกใช้เกลือ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10–22 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ควบคุมความเข้มข้นของ PEG 1500 ที่ร้อยละ 25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และค่าพีเอชของระบบเท่ากับ 5

จาก**รูปที่ 2** การเพิ่มความเข้มข้นของเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า K_E และค่า PF โดยพบว่าจากค่า K_E ที่มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้นเป็นผลมาจากความเป็นไฮโดรฟิลิกที่สูงขึ้นในวัฏภาคล่างเนื่องจากมีเกลืออยู่มาก ช่วยส่งเสริมให้เพอร์ออกซิเดสเกิดกระจายตัวไปยังวัฏภาคบนซึ่งมีความเป็นไฮโดรโฟบิกได้มากขึ้น [18] เมื่อพิจารณาค่า PF พบว่าค่า PF เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้น $(NH_4)_2SO_4$ เพิ่มขึ้น จนกระทั่งความเข้มข้นเพิ่มมากกว่าร้อยละ 16 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จึงมีแนวโน้มลดลง เนื่องจากโดยทั่วไปแล้วโมเลกุลของน้ำจะล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีนส่วนที่ชอบน้ำและสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของน้ำและโปรตีน แต่เมื่อเติมเกลือเข้าไปในระบบ ATPE มากขึ้น เกลือสามารถแตกตัวเป็นประจุบวกและประจุลบ ประจุที่เพิ่มขึ้นนี้ก่อให้เกิดแรงดึงดูดกับโมเลกุลของน้ำเพิ่มตามไปด้วย ส่งผลให้โมเลกุลของน้ำเข้ามาล้อมรอบโมเลกุลของเกลือแทนโมเลกุลของโปรตีน จึงทำให้โปรตีนเกิดการแยกตัวออกจากน้ำ ปรากฏการณ์ดังกล่าวเรียกว่าเกิด Salting out จึงทำให้โปรตีนที่ชอบน้ำบางส่วนถูกผลักดันให้เคลื่อนไปยังวัฏภาคบนพร้อมกับเพอร์ออกซิเดส ส่งผลให้ค่าการทำบริสุทธิ์ที่ได้ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเกลือสามารถช่วยเพิ่มหรือลดแรงตึงผิวระหว่างวัฏภาค (Interfacial Tension) ได้ในระดับหนึ่งและส่งผลต่อการกระจายตัวของโปรตีนไปยังแต่ละวัฏภาคได้มากน้อยต่างกัน ดังนั้นการอภิปรายผลจะมีความชัดเจนมากขึ้นหากมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของแรงตึงผิวที่เกิดขึ้นระหว่างวัฏภาค



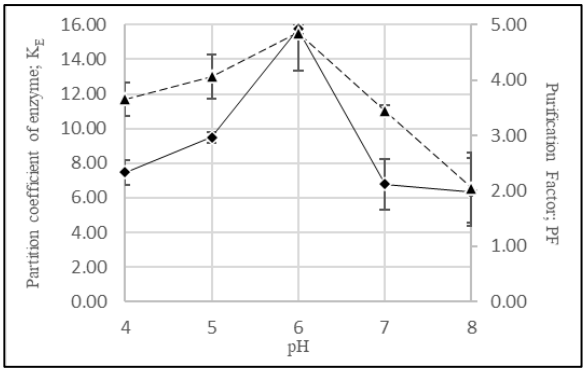
รูปที่ 2 ความเข้มข้นของเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ ต่อสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์ (K_E, ♦) และค่าการทำบริสุทธิ์ (PF, ▲)

3.4 ผลของค่าพีเอชต่อการสกัดเพอร์ออกซิเดส

การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของระบบ ATPE เป็นอีกปัจจัยที่ส่งผลต่อการสกัดและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ เนื่องจากเอนไซม์เกิดจากหน่วยย่อยที่เรียกว่ากรดอะมิโนหลาย ๆ ชนิดมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ ดังนั้นพื้นผิวของเอนไซม์จึงมีลักษณะเป็นไปตามชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ กรดอะมิโนสามารถจัดแบ่งได้เป็นกลุ่มที่มีขั้ว มีประจุบวกหรือประจุลบ และกลุ่มไฮโดรโฟบิก จากการศึกษางานวิจัยในอดีตพบว่าลักษณะสมบัติพื้นผิวของเอนไซม์เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการแยกของเอนไซม์ไปยังแต่ละวัฏภาคในระบบ ATPE เช่น งานวิจัยของ [24] ศึกษาการแยกกรดอะมิโน 4 ชนิดซึ่งมีลักษณะพื้นผิวที่ต่างกันด้วย ATPE พบว่าไลซีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีประจุบวกในช่วงพีเอช 6.5–8.0 จะกระจายตัวไปยังวัฏภาคล่าง ในขณะที่กรดอะมิโนที่เหลืออีก 3 ชนิด คือ ฟีนิลอะลานิน เมธไทโอนีน และซีสเทอีน เป็นกลุ่มกรดอะมิโนที่มีประจุลบจะกระจายตัวไปอยู่ที่วัฏภาคบน และโดยทั่วไปประจุที่พื้นผิวของเอนไซม์จะมีการเปลี่ยนแปลงในสภาวะแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนค่าพีเอช โดยผลรวมประจุสุทธิของเอนไซม์จะเท่ากับศูนย์เมื่อค่าพีเอชมีค่าเท่ากับที่จุดไอโซอิเลคตริก (Isoelectric point, pI) แต่หากค่าพีเอชมากกว่าที่จุดไอโซอิเลคตริกจะส่งผลให้พื้นผิวของเอนไซม์แสดงประจุลบมากขึ้น เอนไซม์เกิดการแยกชั้นกระจายตัวไปยังวัฏภาคบน ส่งผลให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์เพิ่มขึ้น [12] ในทางตรงข้ามที่ค่าพีเอชน้อยกว่าที่จุดไอโซอิเลคตริกพื้นผิวของเอนไซม์จะแสดง

ประจุบวกมากขึ้น ดังนั้นการแยกชั้นของเอนไซม์จะกระจายตัวไปยังวัฏภาคบนหรือล่างจึงขึ้นกับประจุสุทธิของเอนไซม์นั้น

สำหรับการศึกษาค่าพีเอชต่อการสกัดเพอร์ออกซิเดสจะทำในระบบที่ประกอบด้วยร้อยละ 25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ของสารละลาย PEG 1500 และร้อยละ 16 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ของเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ ผลการศึกษา (**รูปที่ 3**) พบว่าการเพิ่มค่าพีเอชจาก 4 เป็น 6 ส่งผลให้ค่า K_E จาก 7.47 ± 3.74 เพิ่มขึ้นเป็น 15.75 ± 4.07 และค่า PF เพิ่มจาก 3.66 ± 0.30 เป็น 4.86 ± 0.70 เท่า จากผลแสดงให้เห็นว่าเพอร์ออกซิเดสแยกชั้นและกระจายตัวไปยังวัฏภาคบนได้มากขึ้นและที่พีเอช 6 ให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์และค่าการทำบริสุทธิ์ดีที่สุด ผลการศึกษาสอดคล้องกับงานวิจัยของ [22] ซึ่งสกัดเพอร์ออกซิเดสจากผักบุ้ง แต่เมื่อค่าพีเอชสูงขึ้นค่า K_E และค่า PF มีแนวโน้มลดลง โดยที่ค่าพีเอช 8 ให้ค่า K_E และ PF ลดลงเท่ากับ 6.33 ± 8.85 และ 2.05 ± 0.63 เท่า ตามลำดับ ค่า K_E ที่เพิ่มขึ้นเมื่อค่าพีเอชสูงขึ้น (ช่วง 4–6) อาจจะเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงประจุของเอนไซม์เมื่อระบบมีค่าพีเอชสูงกว่าที่จุดไอโซอิเลคตริก จึงส่งผลให้เอนไซม์กระจายตัวไปยังวัฏภาคบนได้มากขึ้น สำหรับงานวิจัยนี้ยังมีข้อจำกัดในการศึกษาจุดไอโซอิเลคตริกของเพอร์ออกซิเดสที่สกัดได้จากกะหล่ำปลี การอภิปรายผลจึงอยู่บนพื้นฐานจากการรวบรวมข้อมูลที่มาจากงานวิจัยอื่นก่อนหน้านี้ที่รายงานเกี่ยวกับจุดไอโซอิเลคตริกของเพอร์ออกซิเดสที่สกัดจากพืชชนิดต่าง ๆ เช่น จากรากหัวผักกาด หัวมันฝรั่ง มะเขือเทศ พริกไทย โดยส่วนใหญ่จะมีจุดไอโซอิเลคตริก อยู่ในช่วง 3–5 [25–28] อย่างไรก็ตามที่ค่าพีเอชสูงกว่า 6 ไม่ได้ส่งผลให้การสกัดและทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น อาจเนื่องมาจากที่พีเอชสูงนี้ส่งผลต่อบริเวณเร่งของเอนไซม์ ทำให้ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยหลายชิ้น [22],[25],[27–29] ที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับค่าพีเอชที่ส่งผลต่อกิจกรรมการทำงานของเพอร์ออกซิเดสและพบว่าที่พีเอชมากกว่า 6 เอนไซม์จะเริ่มเกิดการเสื่อมสภาพการทำงานอย่างรวดเร็ว



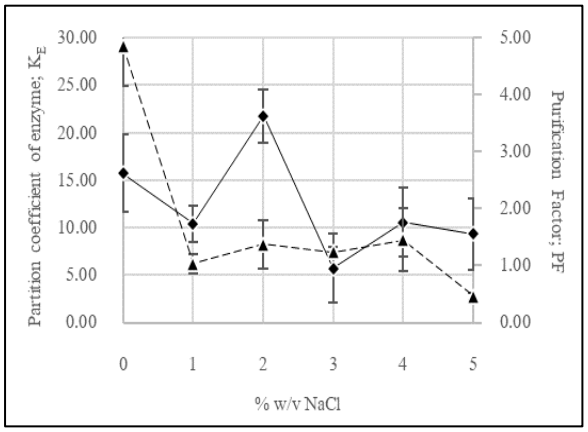
รูปที่ 3 ค่าพีเอชของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคต่อสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์ (K_E, ♦) และค่าการทำบริสุทธิ์ (PF, ▲)

3.5 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการสกัดเพอร์ออกซิเดส

โดยทั่วไปการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นกลาง (Neutral salt) ลงในระบบของ ATPE จะเป็นการเพิ่มความแตกต่างของไฮโดรโฟบิกเนื่องจากทำให้ความต่างศักย์ทางไฟฟ้า (Electrical potential) ระหว่างสองวัฏภาคมากขึ้น ความเป็นไฮโดรโฟบิกที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณน้ำที่เข้ามาจับลดลง ดังนั้นการเติมเกลือ NaCl จึงอาจส่งผลต่อการสกัดเอนไซม์ โดยในการศึกษานี้ทดสอบการเติม NaCl ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0–5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในระบบที่ประกอบด้วยเกลือ $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้นร้อยละ 16 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สารละลาย PEG 1500 ที่ร้อยละ 25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และค่าพีเอชของระบบเท่ากับ 6

ผลการศึกษา (**รูปที่ 4**) พบว่าแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของค่า K_E ต่อความเข้มข้นของ NaCl มีทิศทางที่ไม่ชัดเจน โดยที่ความเข้มข้น NaCl ที่ร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ให้ค่า K_E สูงสุด (21.77 ± 2.81) แต่เมื่อพิจารณาค่า PF พบว่าการไม่เติมเกลือ NaCl จะให้ค่า PF สูงสุด (4.86 ± 0.70 เท่า) และมีแนวโน้มที่ลดลงเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl ในระบบ โดยถึงแม้ว่า NaCl จะไปเพิ่มความแตกต่างของไฮโดรโฟบิกที่เกิดขึ้นของทั้งสอง วัฏภาคและส่งผลต่อการแยกวัฏภาคของเอนไซม์ที่ต่างกัน เกลือ NaCl ยังสามารถส่งผลต่อการเพิ่มความแรงประจุ (Ionic strength) ทำให้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำแยกชั้นกระจายตัวไปยังวัฏภาคบนมากขึ้น ค่าการทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่

สกัดได้จึงลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของเกลือที่นำมาใช้หากมีความเข้มข้นสูงเกินไปสามารถส่งผลต่อการเสื่อมสภาพการทำงานของเอนไซม์ได้ [9]



รูปที่ 4 ความเข้มข้นของ NaCl ต่อสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์ (K_E, ♦) และค่าการทำบริสุทธิ์ (PF, ▲)

4. สรุปผลการศึกษา

การสกัดด้วยสารละลายน้ำสองวัฏภาคเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการสกัดและทำสารชีวโมเลกุลโดยเฉพาะโปรตีนให้บริสุทธิ์ในขั้นต้น จากการศึกษาวิธีดังกล่าวพบว่าหลายปัจจัยสามารถส่งผลต่อการสกัดและทำเพอร์ออกซิเดสให้บริสุทธิ์ เช่น การเลือกองค์ประกอบที่ใช้ในการสร้างระบบ ได้แก่ ชนิดและความเข้มข้นของเกลือ น้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นของ PEG รวมถึงค่าพีเอชและความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ การปรับสภาวะปัจจัยให้เหมาะสมส่งผลให้ค่าการสกัดและทำให้บริสุทธิ์สูงขึ้น นอกจากการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคแล้ว การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับลักษณะสมบัติของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส ได้แก่ น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ จุดไอโซอิเลคตริกและลักษณะพื้นผิว (ประจุรวม สุทธิและความเป็นไฮโดรโฟบิก) จะช่วยอธิบายปรากฏการณ์การแยกชั้นของเอนไซม์ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคได้ดียิ่งขึ้น และการนำวิธีการทำให้บริสุทธิ์อื่นมาประยุกต์ใช้ร่วมกับการสกัดด้วยสารละลายน้ำสองวัฏภาค เช่น วิธีโครมาโทรกราฟฟี วิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและวิธีการใช้อัลตร้าฟิวเตรชั่นสามารถช่วยให้ค่าการทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้นได้

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

[1] Q. Chang, J. Huang, Y. Ding and H. Tang, “Catalytic oxidation of phenol and 2,4-Dichlorophenol by using horseradish peroxidase immobilized on graphene Oxide/Fe_3O_4,” *Molecules,* vol. 21, no. 8, 2016, Art. no. 1044, doi: 10.3390/molecules21081044.

[2] M. Hamid and R. Khalil ur, “Potential applications of peroxidases,” *Food Chemistry,* vol. 115, no. 4, pp. 1177–1186, 2009, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.02.035.

[3] K. Sellami, A. Couvert, N. Nasrallah, R. Maachi, M. Abouseoud and A. Amrane, “Peroxidase enzymes as green catalysts for bioremediation and biotechnological applications: A review,” *Science of The Total Environment,* vol. 806, 2022, Art. no. 150500, doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.150500.

[4] A. Steevensz, L. G. C. Villegas, W. Feng, K. E. Taylor, J. K. Bewtra and N. Biswas, “Soybean peroxidase for industrial wastewater treatment: a mini review,” *Journal of Environmental Engineering and Science,* vol. 9, no. 3, pp. 181–186, 2014, doi: 10.1680/jees.13.00013.

[5] M. Matto and Q. Husain, “Redox-mediated decolorization of Direct Red 23 and Direct Blue 80 catalyzed by bioaffinity-based immobilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) peroxidase,” *Biotechnology journal,* vol. 3, no. 9–10, pp. 1224–1231, 2008, doi: 10.1002/biot.200800049.

[6] R. Satar and Q. Husain, “Use of bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidase together with redox mediators to decolorize disperse dyes,” *Biotechnology and*

Bioprocess Engineering, vol. 14, pp. 213–219, 2009, doi: 10.1007/s12257-008-0175-4.

[7] S. Pudjiraharti and A. Karossi, "Purification and partial characterization of white radish (*Raphanus sativus* L. var. Long white) peroxidase from cell suspension culture extract," *Annals of Tropical Research,* pp. 1–16, 2010, doi: 10.32945/atr3211.2010.

[8] S. S. Nadar, R. G. Pawar and V. K. Rathod, "Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review," *International Journal of Biological Macromolecules,* vol. 101, pp. 931–957, 2017, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.03.055.

[9] A. Goja, "Aqueous Two-Phase Extraction Advances for Bioseparation," *Journal of Bioprocessing & Biotechniques,* vol. 04, no. 1, 2013, Art. no. 1000140, doi: 10.4172/2155-9821.1000140.

[10] P. A. Albertsson, G. Johansson and F. Tjerneld, "Separation processes in biotechnology. Aqueous two-phase separations," *Bioprocess Technology,* vol. 9, pp. 287-327, 2017.

[11] N. Bhardwaj and P. Verma, "Extraction of fungal xylanase using ATPS-PEG/sulphate and its application in hydrolysis of agricultural residues," in *Biotechnological Applications in Human Health*, P. C. Sadhukhan and S. Premi Eds. Singapore: Springer Singapore, 2020, ch. 11, pp. 95–105.

[12] M. Iqbal, Y. Tao, S. Xie, Y. Zhu, D. Chen, X. Wang, L. Huang, D. Peng, A. Sattar, M. A. B. Shabbir *et al.*, "Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications," *Biological Procedures Online*, vol. 18, no. 1, pp. 1–18, 2016, doi: 10.1186/s12575-016-0048-8.

[13] K. Ratanapongleka, "Recovery of biological products in aqueous two phase systems," *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, vol. 1, no. 2, pp. 191–198, 2010.

[14] M. C. Lakshmi and K. S. M. S. Raghavarao, "Downstream processing of soy hull peroxidase employing reverse micellar extraction," *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 15, pp. 937–945, 2010, doi: 10.1007/s12257-010-0071-6.

[15] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, 1976, doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

[16] F. J. Ruiz-Dueñas and A. T. Martínez, "Structural and functional features of peroxidases with a potential as industrial biocatalysts," in *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases: Peroxidases as Potential Industrial Biocatalysts*, E. Torres and M. Ayala Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010., ch. 3, pp. 37–59

[17] S. Hiraga, K. Sasaki, H. Ito, Y. Ohashi and H. Matsui, "A large family of Class III plant peroxidases," *Plant and Cell Physiology,* vol. 42, no. 5, pp. 462–468, 2001, doi: 10.1093/pcp/pce061.

[18] İ. Yücekan and S. Önal, "Partitioning of invertase from tomato in poly(ethylene glycol)/sodium sulfate aqueous two-phase systems," *Process Biochemistry,* vol. 46, no. 1, pp. 226–232, 2011, doi: 10.1016/j.procbio.2010.08.015.

[19] A. B. Hemavathi and K. S. M. S. Raghavarao, "Differential partitioning of β-galactosidase and β-glucosidase using aqueous two phase extraction," *Process Biochemistry,* vol. 46, no. 3, pp. 649–655, 2011, doi: 10.1016/j.procbio.2010.11.008.

[20] X. Li, J. Wan and X. Cao, "Preliminary application of light-pH sensitive recycling aqueous two-phase systems to purification of lipase," *Process Biochemistry,* vol. 45, no. 4, pp. 598–601, 2010, doi: 10.1016/j.procbio.2009.11.008.

[21] W. Ji, W. Ao, M. Sun, C. Feng and Y. Wang, "Separation and purification of horseradish peroxidase from horseradish roots using a novel integrated method," *New Journal of Chemistry,* vol. 45, no. 4, pp. 1959–1966, 2021, doi: 10.1039/D0NJ04614K.

[22] N. D. Srinivas, K. R. Rashmi and K. S. M. S. Raghavarao, "Extraction and purification of a plant peroxidase by aqueous two-phase extraction coupled with gel filtration," *Process Biochemistry,* vol. 35, no. 1–2, pp. 43–48, 1999, doi: 10.1016/S0032-9592(99)00030-8.

[23] S. Rathnamsamy, R. Singh, R. Auxilia and B. Vedhahari, "Extraction of peroxidase from various plant sources and its biodegradation studies on phenolic compounds," *BioTechnology: An Indian Journal*, vol. 9, no. 4, pp. 160–165, 2014.

[24] Q. K. Shang, W. Li, Q. Jia and D. Q. Li, "Partitioning behavior of amino acids in aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and phosphate buffer," *Fluid Phase Equilibria*, vol. 219, no. 2, pp. 195–203, 2004, doi: 10.1016/j.fluid.2004.01.032.

[25] T. Thongsook and D. M. Barrett, "Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* Var. Italica) peroxidases," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 8, pp. 3206–3214, 2005, doi: 10.1021/jf048162s.

[26] W. Dong, M. Kieliszewski, and M. A. Held, "Identification of the pI 4.6 extensin peroxidase from *Lycopersicon esculentum* using proteomics and reverse-genomics," *Phytochemistry*, vol. 112, pp. 151–159, 2015, doi: 10.1016/j.phytochem.2014.09.015.

[27] J. W. Gillikin and J. S. Graham, "Purification and developmental analysis of the major anionic peroxidase from the seed coat of glycine max," *Plant Physiology*, vol. 96, no. 1, pp. 214–220, 1991, doi: 10.1104/pp.96.1.214.

[28] S. J. Kim and M. Shoda, "Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* dec 1 involved in decolorization of dyes," *Applied and environmental microbiology,* vol. 65, no. 3, pp. 1029–1035, 1999, doi: 10.1128/AEM.65.3.1029-1035.1999.

[29] S. Khatun, M. Ashraduzzaman, M. R. Karim, F. Pervin, N. Absar and A. Rosma, "Purification and characterization of peroxidase from *Moringa oleifera* L. Leaves," *BioResources,* vol. 7, no. 3, pp. 3237–3251, 2012.