บทสรุปผู้บริหาร

ชื่อเรื่อง	การแยกสกัดเอนไซม์แลคเคสจาก *Lentinus polychrous* Lev.โดยระบบสารละลายสองวัฏภาค The Extraction of Laccase from *Lentinus polychrous* Lev. using Aqueous Two-Phase System
ผู้วิจัย	ดร. กรรณิกา รัตนพงศ์เลขา
หน่วยงาน	คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

สีสังเคราะห์ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมสิ่งทอ กระดาษ เครื่องสำอางค์ และอุตสาหกรรมยา สีสังเคราะห์ส่วนใหญ่เป็นสารเคมีที่เป็นผลิตภัณฑ์มาจากน้ำมันปิโตรเลี่ยม ซึ่งเป็นสารไฮโดรคาร์บอนพวก aliphatic และ aromatic การจำแนกสีสามารถจัดตามลักษณะการนำไปใช้งาน เช่น สีไดเร็ค (direct dyes) สีเบสิค (basic dyes) สีซัลเฟอร์ (sulfur dyes) สีอะโซอิค (azoic dyes) สีแว้ท (vat dyes) สีรีแอ็คทีฟ (reactive dyes) และสีดิสเพริส์ (disperse dyes) เมื่อนำมาใช้ในกระบวนการฟอกย้อมพบว่า 10-15% ของสีที่ใช้จะปนเปื้อนออกมากับน้ำทิ้งของกระบวนการ (Kunamneni et al., 2008) การบำบัดสีสังเคราะห์ที่ปนเปื้อนมาทำได้ยาก เนื่องจากสีมีความเสถียรต่อแสง ความร้อนและสารออกซิไดส์ต่างๆ และโครงสร้างซับซ้อนยากต่อการย่อยสลายและทำให้แสงส่องผ่านได้น้อย ส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสงและการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตในน้ำและทำให้ปริมาณของก๊าซที่ละลายในน้ำน้อยลง ทำให้ระบบนิเวศ์วิทยาเสียสมดุล นอกจากนี้ยังเชื่อว่าสีสังเคราะห์หลายชนิดที่เตรียมจากกลุ่ม benzidine หรือกลุ่มสารประกอบ aromatic เป็นสารพิษก่อมะเร็ง (toxic carcinogenic) และก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (Enayatzamir et al., 2009; Kariminiaae-Hamedaani et al., 2007) ดังนั้นการกำจัดสีย้อมที่ปนเปื้อนออกมากับน้ำทิ้งของกระบวนการฟอกย้อมจึงจำเป็นอย่างยิ่ง

วิธีการบำบัดการปนเปื้อนของสีย้อมโดยทางกายภาพและทางเคมีถูกนำมาศึกษาหลายวิธีการด้วยกัน เช่น การใช้กระบวนการดูดซับ (Adsorption) การสร้างและรวมตะกอน (Coagulation and Flocculation) การแลกเปลี่ยนอิออน (Ion-exchange) การใช้โอโซน (Ozonation) และวิธีการทางอิเล็คโตเคมิคัล (Electrochemical method)) (Lin and Peng, 1996; Rodrguez Couto) พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดสีโดยวิธีการเหล่านี้ไม่ดีเท่าที่ควรเมื่อเทียบกับค่าใช้จ่ายในการลงทุนและดำเนินการที่สูง ปริมาณตะกอนที่เกิดขึ้นมากและยากต่อการจัดการ (Katuri et al., 2009) กระบวนการบำบัดสีย้อมทางชีวภาพโดยอาศัยตัวเร่งทางชีวภาพ เช่น จุลินทรีย์ หรือเอนไซม์เป็นอีกวิธีที่น่าสนใจ กลไกการกำจัดสีย้อมโดยจุลินทรีย์ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือการดูดซับสีไว้ที่ผิวเซลล์และเซลล์จะผลิตเอนไซม์มาย่อยสลาย (Tatarko and Bumpus, 1998) อย่างไรก็ตามนอกจากจะพบสีย้อมในน้ำทิ้งแล้วยังพบการเจือปนของสาร organochlorine-base pesticides,

heavy metals และ pigments โดยสารเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ และเมื่อจุลินทรีย์ทำการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนพบว่าสารประกอบไนโตรเจนที่อยู่ในสีย้อมจะถูกเปลี่ยนรูปไปเป็น aromatic amines ที่มีความเป็นพิษมากขึ้น ส่งผลให้การทำงานของจุลินทรีย์ลดลง (Zouari-Mechichi et al., 2006) การนำเอนไซม์มาประยุกต์ใช้ในการกำจัดสีย้อมแทนจุลินทรีย์สามารถช่วยลดปัญหาดังกล่าว นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นและสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง (เช่น อุณหภูมิ ค่าพีเอช ค่าความเค็ม การเจือปนของสารปนเปื้อน) ได้ดีกว่าการใช้จุลินทรีย์ (Katuri et al., 2009) เอนไซม์ในกลุ่มลิกนิโนไลติก เช่น lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) และ laccase (Lac) สามารถย่อยสลายลิกนินและสารประกอบอะโรมาติกที่ก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมได้ จึงนิยมนำมาใช้ในการฟอกจางสีเคมีสังเคราะห์ในน้ำทิ้ง และพบว่าแลคเคสเป็นเอนไซม์ที่ได้รับความสนใจอย่างมากเนื่องจากความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสับสเตรทได้หลากหลาย เช่น สารประกอบโพลีฟีนอล ไดเอมีน อะโรมาติกเอไมด์ และสารอนินทรีย์บางชนิด เอนไซม์ชนิดนี้พบทั่วไปในพืชชั้นสูง แมลงบางชนิด แบคทีเรียและเชื้อรา โดยเฉพาะเชื้อราจำพวกไวท์รอท (white-rot fungi) การสกัดเอนไซม์จากสิ่งมีชีวิตเหล่านี้และการทำให้บริสุทธิ์เป็นขั้นตอนที่สำคัญ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ ก่อนจะนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับระบบบำบัด

มีการศึกษาการทำแลคเคสให้บริสุทธิ์โดยวิธีต่างๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ เช่น การสกัดและทำแลคเคสให้บริสุทธิ์โดยแช่แข็งละลายจากนั้นนำมาแยกเอนไซม์โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ตามด้วยไดอะไลซิสและไอออนโครมาโตรกราฟฟี ค่าความบริสุทธิ์ที่ได้เป็น 246 เท่า (Litthauer et al., 2007) การทำให้บริสุทธิ์ด้วยอัลตร้าฟิวเตชั่น ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ไดอะไลซิสและเทคนิคโครมาโตรกราฟฟี ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 8.27 เท่าเมื่อเทียบกับเอนไซม์หยาบ (Katuri et al., 2009) การแยกเอนไซม์โดยใช้ไมโครฟิวเตชั่น อัลตร้าฟิวเตชั่นและเทคนิคไดอะฟิวเตชั่น ตามด้วยการตกตะกอน ได้ค่าความบริสุทธิ์ 6.3 เท่า (Rekuc et al., 2009) จากงานวิจัยหลายๆชิ้น (Hublik and Schinner, 2000; Katuri et al., 2009; Liers et al., 2007; Saito et al., 2003) พบว่าการแยกโดยเทคนิคโครมาโตรกราฟฟีทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นมาก แต่ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการสูง ได้ผลผลิตในปริมาณน้อย และยังต้องอาศัยกระบวนการแยกพื้นฐานร่วมเช่น การใช้เมมเบรน การตกตะกอน เพื่อทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ในระดับหนึ่งก่อนจะใช้เทคนิคดังกล่าว การทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (Aqueous Two Phase Systems; ATPS) เป็นอีกวิธีที่น่าสนใจในการแยกตัวเร่งทางชีวภาพเช่น เซลล์จุลินทรีย์ โปรตีนและเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้น โดยสารชีวภาพจะกระจายตัวในสองเฟสที่ต่างกันขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุล รูปร่างประจุบนพื้นผิวของอนุภาค ความจำเพาะเจาะจงบริเวณที่จับกัน (Albertsson, 1986 and Brooks *et al.*, 1985) ในการเตรียมระบบสองวัฏภาคโดยใช้ความเข้มข้นของสารที่เตรียมเหนือจุดวิกฤตและเติมตัวอย่างที่ต้องการแยกลงไป เมื่อระบบเข้าสู่สมดุล ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการจะแยกอยู่ในวัฏภาคหนึ่ง ส่วนสารปนเปื้อนเช่น เซลล์ ซากเซลล์ RNA คาร์โบไฮเดรต ไขมัน จะถูกแยกมาอีกวัฏภาค ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์ขึ้น ข้อดีของการสกัดเอนไซม์ด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค คือสภาวะที่ใช้ของระบบดังกล่าวไม่รุนแรง มีน้ำ

เป็นส่วนประกอบในการแยก 70-90% ไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ ง่ายต่อการดำเนินการ ต้นทุนการดำเนินการไม่สูง เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และสามารถขยายขนาดสู่ระดับการผลิตเพื่อนำไปใช้งานจริงได้ง่าย เนื่องจากสภาวะที่ใช้ในการแยกระดับห้องปฏิบัติการไม่แตกต่างกัน

ดังนั้นในการศึกษานี้จะทำการสกัดเอนไซม์แลคเคสจากเชื้อเห็ดบดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค เอนไซม์จะถูกทำให้บริสุทธิ์และแยกจากโปรตีนปนเปื้อนในวัฏภาคต่างกัน และดูถึงลักษณะการแยกชั้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยที่เกี่ยวข้อง

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคในการทำเอนไซม์แลคเคสให้บริสุทธิ์
2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลและสภาวะที่เหมาะสมของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคสำหรับสกัดเอนไซม์แลคเคส
3. เพื่อศึกษาความบริสุทธิ์ของเอนไซม์แลคเคส ที่ได้จากการสกัดโดยใช้เทคนิคระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (Aqueous Two-Phase System; ATPS)

วิธีดำเนินการวิจัย

<u>การเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดบด และการสกัดเอนไซม์แลคเคสหยาบ</u>

เตรียมอาหารแข็งสำหรับการเพาะเลี้ยงโดยผสมแกลบกับรำในอัตราส่วน 1:2 โดยน้ำหนัก บรรจุลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรปิดฝาด้วยสำลีและใช้กระดาษฟอยปิดทับอีกชั้น หลังผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ อุณหภูมิ 121^{0}C เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ถ่ายเชื้อเห็ดบดที่เจริญบน PDA ขนาด 0.5x0.5 ซม. ลงบนอาหารแข็งด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 14 วัน จะได้อาหารแข็งที่มีเชื้อเห็ดเจริญ

นำเชื้อเห็ดบดที่เจริญบนอาหารแข็ง 14 วัน มาเติมน้ำกลั่น ด้วยอัตราส่วน น้ำกลั่น 3 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 กรัม นำมากวนบนเครื่องกวนแบบแม่เหล็กเป็นเวลา 45 นาที กรองกากอาหารเลี้ยงเชื้อออกโดยใช้ผ้าขาวบาง นำสารละลายที่ผ่านการกรองมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนตะกอนทิ้งไป และส่วนที่เป็นสารละลายจะเรียกว่าเอนไซม์หยาบ (Sarnthima et al., 2009) บันทึกปริมาตรที่ได้ นำเอนไซม์หยาบที่สกัดได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

<u>การเตรียมระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคเพื่อทำเอนไซม์แลคเคสให้บริสุทธิ์</u>

เลือกความเข้มข้นของสาร PEG และเกลือฟอสเฟตที่ทำให้เกิดสองวัฏภาค เตรียมลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายเอนไซม์หยาบปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงไปในระบบ เติมน้ำกลั่นให้มีน้ำหนักรวม 10 กรัม จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที หลังเกิดการแยกวัฏภาคขึ้น บันทึกค่าปริมาตรของสารละลายในวัฏภาคบนและล่าง นำตัวอย่างในแต่ละวัฏภาคไปวัดกิจกรรมการทำงานของ

เอนไซม์และปริมาณโปรตีน เพื่อนำไปคำนวณหาสัมประสิทธิ์การแยก และค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่เกิดขึ้น

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส

ทดสอบโดยวัดการออกซิไดซ์ของ ABTS ตามวิธีวิเคราะห์ที่อธิบายโดย Khammuang and Sarnthima (Khammuang and Sarnthima, 2007) โดยเติมเอนไซม์ตัวอย่าง (50µ L) ลงใน 0.1 M โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ (940µ L) pH 4.5 และสารละลาย 10 mM ABTS (10µ L) เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 32 ^{0}C เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 80% w/v TCA (50µ L) นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm กำหนดให้หนึ่งหน่วยเอนไซม์เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ออกซิไดซ์ ABTS ได้ 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด (Molar extinction of ABTS at 420 nm = 3.6×10^{4} $M^{-1}cm^{-1}$)

การวัดปริมาณโปรตีน

ปริมาณโปรตีนถูกวิเคราะห์ตามวิธีของ Bradford (Bradford, 1976) เริ่มจากการเตรียม Bradford reagents โดยละลาย 50 มิลลิกรัม Coomassie brilliant blue G250 ใน 25 มิลลิลิตร 95% ethanol เติม 85% (w/v) phosphoric acid ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้มีปริมาตรรวม 500 มิลลิลิตร นำสารตัวอย่างมา 40 ไมโครลิตร เติม Bradford reagents 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm และเตรียมสารละลาย Bovine Serum Albumin เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน โดยเตรียมในช่วงความเข้มข้น 0-1000 µg/ml

ลักษณะการแยกของเอนไซม์แลคเคสในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ภายใต้สภาวะต่างๆ

ปัจจัยในการศึกษาครั้งนี้เพื่อดูการแยกชั้น ได้แก่ ขนาดโมเลกุลและความเข้มข้นของPEG ความเข้มข้นของเกลือฟอสเฟต ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบ และการเติมโซเดียมคลอไรด์ต่อการแยก โดยวัดจากกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดที่ปรากฏอยู่ในแต่ละวัฏภาค เทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมด เพื่อใช้ในการคำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์และค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นเทียบกับเอนไซม์หยาบ

การคำนวณค่าพารามิเตอร์การแยกอธิบายดังต่อไปนี้

ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์ (Partition coefficient of enzyme, K_E) คำนวณจากค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในวัฏภาคบน (A_T) ต่อ วัฏภาคล่าง (A_B)

$$K_E = \frac{A_T}{A_B}$$

ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีน (Partition coefficient of protein, K_P) คำนวณจากความเข้มข้นของโปรตีนในวัฏภาคบน (P_T) ต่อ วัฏภาคล่าง (P_B)

$$K_P = \frac{P_T}{P_B}$$

สัดส่วนของปริมาตรเกิดจากความสัมพันธ์ของปริมาตรสารละลายที่อยู่ในวัฏภาคบน (V_T) ต่อ วัฏภาคล่าง (V_B)

$$V_R = \frac{V_T}{V_B}$$

ค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์คำนวณได้จากค่าจำเพาะเจาะจงของกิจกรรมเอนไซม์ (specific enzyme activity) ในวัฏภาคบน (SA_T) กับค่าจำเพาะเจาะจงของกิจกรรมเอนไซม์ตั้งต้น (SA_i)

$$PF = \frac{SA_T}{SA_i}$$

ค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้คำนวณได้ดังสมการข้างล่าง

$$\%\ Yield_T = \frac{100}{1 + \frac{1}{V_R K_L}}$$

ผลการวิจัย

<u>อิทธิพลของน้ำหนักโมเลกุลโพลีเอทิลีนไกลคอลต่อการสกัดแลคเคส</u>

โพลีเอทิลีนไกลคอลน้ำหนักโมเลกุล 1000 4000 และ 6000 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ถูกนำมาเตรียมระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ร่วมกับเกลือฟอสเฟตที่ความเข้มข้นคงที่ 14 %w/w ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 และใช้เอนไซม์หยาบ 1 มิลลิลิตร ปริมาตรรวมของระบบเป็น 10 มิลลิลิตร เมื่อระบบเข้าสู่สมดุล ผลการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของแลคเคส โปรตีน สัดส่วนของปริมาตร ค่าความบริสุทธิ์ และค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ของเอนไซม์แสดงในตารางที่ 1 การกระจายตัวของโปรตีนและเอนไซม์ในวัฏภาคทั้งสองของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของ PEG น้ำหนักโมเลกุลของโพลิเมอร์นี้จะส่งผลต่อการจับกันระหว่างโพลิเมอร์และโปรตีน พบว่าสายของ PEG มีความเป็นไฮโดรโฟบิกสามารถจับกับบริเวณไฮโดรโฟบิกของโปรตีน ดังนั้นระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ใช้ PEG และเกลือฟอสเฟตจะมีความเป็นไฮโดรโฟบิกของวัฏภาคบน (มี PEG อยู่มาก) มากกว่าในวัฏภาคล่าง (มีเกลืออยู่มาก) ทำให้โปรตีนที่พื้นผิวมีความเป็นไฮโดรโฟบิกสูงแยกไปวัฏภาคบนมากขึ้น ดังนั้นการเลือกน้ำหนักโมเลกุลโพลิเมอร์ที่เหมาะสมเป็นสิ่งจำเป็นและเป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญในการทดลองของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ลักษณะไฮโดรโฟบิกจะขึ้นกับชนิดและน้ำหนักโมเลกุลของโพลิเมอร์

ตารางที่ 1 อิทธิพลของน้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นของ PEG 1000 4000 และ6000 ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคต่อการสกัดเอนไซม์แลคเคส เมื่อใช้เกลือฟอสเฟต 14%w/w ระบบมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 27± 2 ^{0}C

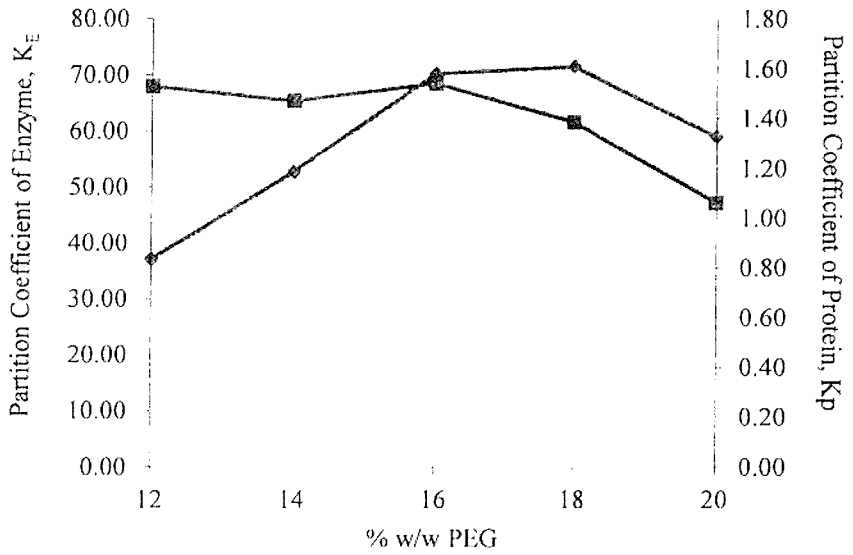
ความเข้มข้น (%w/w)		Molecular weight of PEG	K_E	K_P	Volume ratio	Purification factor	% Yield
PEG	phosphate salt						
12	14	1000	25.11	0.73	1.86	1.74	97.90
		4000	37.14	1.53	1.56	1.16	98.31
		6000	45.50	1.39	1.50	1.67	98.56
14	14	1000	27.88	0.83	1.50	1.80	97.66
		4000	52.80	1.47	1.56	1.46	98.80
		6000	43.17	1.60	1.50	1.24	98.48
16	14	1000	32.38	1.28	1.50	1.43	97.98
		4000	70.25	1.54	1.50	1.55	99.06
		6000	42.14	1.29	1.50	1.28	98.44
18	14	1000	16.83	1.91	1.00	0.69	94.39
		4000	71.50	1.39	1.50	1.61	99.08
		6000	27.00	1.09	1.50	1.43	97.59
20	14	1000	24.57	0.84	1.50	1.19	97.36
		4000	59.00	1.06	1.56	1.98	98.93
		6000	26.88	0.71	1.50	1.41	97.58

จากตารางที่ 1 ค่าสัดส่วนปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างหลังการแยกวัฏภาค (Vr) มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย อยู่ในช่วง 1.00-1.86 ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์แลคเคสมีค่ามากกว่า 1 มาก (K_E >>1) แสดงให้เห็นว่าแลคเคสเป็นไฮโดรโฟบิกโปรตีน จึงกระจายตัวอยู่มากในวัฏภาคบน ประสิทธิภาพการแยกของระบบสองวัฏภาคนอกจากจะพิจารณาจากค่า K_E แล้ว ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีนควรมีค่าน้อยกว่า 1 (K_P<1) เป็นการทำให้โปรตีนปนเปื้อนกระจายตัวในวัฏภาคล่างมากกว่าบน แต่จากการทดลองค่า K_P ส่วนมากสูงกว่า 1 ทำให้โปรตีนปนเปื้อนกระจายตัวในวัฏภาคเดียวกับเอนไซม์ ค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ในวัฏภาคบนจึงเพิ่มขึ้นไม่มาก เมื่อเปรียบเทียบค่า K_E ของ PEG ที่น้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ประกอบกับค่าความบริสุทธิ์และเปอร์เซ็นต์ผลได้ (%yield) พบว่า PEG 4000 แสดงประสิทธิภาพการแยกได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ PEG 1000 และ 6000 ผลการทดลองสอดคล้องกับ

การศึกษาของ Mohamadi et al. (Mohamadi et al., 2007) ในการสกัด phenylalanine dehydrogenase ด้วย PEG ที่น้ำหนักโมเลกุลต่างๆดังนี้ 2000 4000 6000 8000 10000 และ 20000 พบว่า PEG 6000 ให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์ เปอร์เซ็นต์ผลผลิตและผลได้ในวัฏภาคบนดีที่สุดและได้อธิบายกลไกที่เกิดขึ้นว่า การเพิ่มน้ำหนักโมเลกุลของ PEG จะทำให้การแยกของเอนไซม์ออกจากโปรตีนปนเปื้อนได้ลดลง เนื่องจากเมื่อใช้ PEG ที่น้ำหนักโมเลกุลสูงในระบบ ความต่างระหว่างวัฏภาคจะเพิ่มขึ้น รูปร่างของ PEG จับกันแน่นขึ้น ทำให้เกิดพันธะไฮโดรโฟบิก ระหว่างโมเลกุลของ PEG มากขึ้น ส่งผลให้แรงกระทำระหว่าง PEG กับโปรตีนลดลง เอนไซม์ที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิกเคลื่อนมาสู่วัฏภาคบนได้น้อยลง ทำให้ค่า K_P ลดลง ส่วนการใช้ PEG ที่น้ำหนักโมเลกุลน้อยเกินไปอาจทำให้ PEG สามารถจับกับโปรตีนปนเปื้อนและเอนไซม์ที่ต้องการเคลื่อนไปในวัฏภาคบนด้วยกัน ดังนั้นการเลือกน้ำหนักโมเลกุลของ PEG ที่เหมาะสมสำหรับการแยกด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคขึ้นกับชนิดของเอนไซม์

<u>อิทธิพลของความเข้มข้นโพลีเอทิลีนไกลคอลต่อการสกัดแลคเคส</u>

จากผลการวิเคราะห์ข้างต้น PEG 4000 ถูกเลือกนำมาศึกษาค่าความเข้มข้นที่มีต่อการแยกของเอนไซม์ โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นในช่วง 12-20 %w/w และควบคุมความเข้มข้นของเกลือฟอสเฟตที่ 14% w/w ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 การเพิ่มความเข้มข้นของ PEG ส่งผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์แลคเคส (K_E) และค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีน (K_P) (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ผลของความเข้มข้น PEG 4000 ที่ 12-20% w/w ต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์แลคเคส (K_E) (♦) และ ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีน (K_P) (■) เมื่อใช้เกลือฟอสเฟตความเข้มข้น 14% w/w ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเท่ากับ 7.0

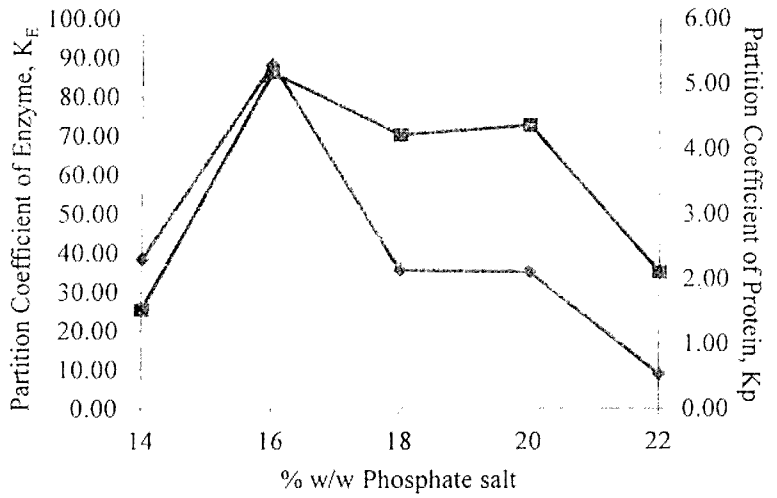
ค่า K_E เพิ่มขึ้นจาก 37.14 เป็น 71.50 เมื่อความเข้มข้นของ PEG เปลี่ยนจาก 12 %w/w เป็น 18 %w/w ตามลำดับ และลดลงเป็น 59.00 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นไปถึง 20 %w/w ในขณะที่ค่า K_p มีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของ PEG เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าโปรตีนปนเปื้อนเคลื่อนสู่วัฏภาคล่างมากขึ้น ทำให้ค่าความบริสุทธิ์ของแลคเคสเปลี่ยนแปลงในช่วง 1.16-1.98 เท่า การเพิ่มความเข้มข้นของ PEG ทำให้แรงกระทำระหว่าง PEG กับพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของโปรตีนเพิ่มขึ้น เอนไซม์จึงเคลื่อนไปยังวัฏภาคบนมากขึ้น อย่างไรก็ตาม การใช้ความเข้มข้นของ PEG สูงๆ ทำให้ค่าความหนืดและแรงตึงผิวระหว่างวัฏภาคสูงขึ้น การเคลื่อนของแลคเคสสู่วัฏภาคบนจึงอาจลดลง (Yücekan and Önal, 2011) ค่าความหนืดที่เพิ่มขึ้นนี้อาจส่งผลกระทบต่อกระบวนการแยกเอนไซม์ออกจากสารละลาย PEG ในภายหลังได้ และจากผลการทดลองนี้การเพิ่มความเข้มข้นของ PEG ทำให้แนวโน้มค่าพารามิเตอร์การแยกของเอนไซม์สูงขึ้น แต่ค่าเหล่านี้ไม่ได้แสดงความแตกต่างอย่างชัดเจน ดังนั้นการเลือกใช้ PEG ที่ความเข้มข้นสูงควรพิจารณาถึงค่าใช้จ่ายในการเตรียมระบบที่เพิ่มขึ้นด้วย

อิทธิพลของความเข้มข้นเกลือฟอสเฟตต่อการสกัดแลคเคส

ความเข้มข้นของเกลือฟอสเฟตที่ 14-22 %w/w ถูกนำมาใช้ร่วมกับ PEG 4000 ที่ 12 %w/w ในการสร้างระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบถูกควบคุมที่ 7.0 เพื่อศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของเกลือฟอสเฟตที่มีต่อการแยกเอนไซม์แลคเคส ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์แลคเคส (K_E) และ ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีน (K_p) เพิ่มขึ้นสูงสุดเป็น 87.33 และ 5.17 ตามลำดับ เมื่อความเข้มข้นของเกลือฟอสเฟต เป็น 16 %w/w และมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นที่ 18-22 %w/w (รูปที่ 2) ตามหลักทฤษฎีพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือฟอสเฟตจะทำให้เกิดปรากฏการณ์ salting-out ซึ่งจะทำให้เอนไซม์และโปรตีนปนเปื้อนเคลื่อนสู่วัฏภาคบนมากขึ้น ค่า K_E และ K_p ก็จะสูงขึ้นด้วย และเนื่องจากโปรตีนปนเปื้อนเคลื่อนสู่วัฏภาคบนมากขึ้น จะทำให้ค่าความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์และค่าความบริสุทธิ์ที่เกิดในวัฏภาคบนลดลง อย่างไรก็ตาม การเพิ่มความเข้มข้นของเกลือในระบบสองวัฏภาคไม่จำเป็นที่จะทำให้ค่า K_E และ K_p สูงขึ้นทุกครั้ง เช่น การเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตจาก 10%w/w เป็น 16%w/w ในการสกัด invertase พบว่าค่า K_p เพิ่มขึ้นจาก 0.48 เป็น 1.12 ตามลำดับ แต่ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในวัฏภาคบนลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมซัลเฟตมากกว่า 13%w/w เนื่องจากเกิดการตกตะกอนของเอนไซม์ขึ้นระหว่างวัฏภาค (Yücekan and Önal, 2011) เช่นเดียวกับการสกัด bromelain ในระบบสองวัฏภาคด้วย PEG และเกลือฟอสเฟต เกิดการตกตะกอนของเอนไซม์ขึ้นระหว่างวัฏภาคเมื่อความเข้มข้นเกลือฟอสเฟตเพิ่มขึ้น (Babu et al., 2008)

เกลือฟอสเฟตยังส่งผลต่อโมเลกุลของน้ำที่อยู่ล้อมรอบโมเลกุลของ PEG โมเลกุลของน้ำจะล้อมรอบประจุบวกส่งผลให้โครงสร้างอัดแน่นขึ้น ปริมาตรโมเลกุลของ PEG ก็น้อยลง และการเพิ่มเกลือฟอสเฟตจะทำให้สัดส่วนวัฏภาคล่างมากขึ้น ทำให้ค่าสัดส่วนปริมาตร (Vr) ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองเมื่อค่า Vr ลดลงจาก 1.56 เหลือ 0.54 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเกลือฟอสเฟตจาก 14 %w/w เป็น 22 %w/w และเมื่อนำ

ค่า Vr ไปใช้ในการคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ซึ่งเกิดจากค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์และสัดส่วนปริมาตรของระบบ จะทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้มีแนวโน้มลดลงเช่นกัน ส่วนค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์มีค่าสูงสุดเท่ากับ 3.01 เท่า เมื่อใช้เกลือฟอสเฟตเข้มข้น 16 %w/w



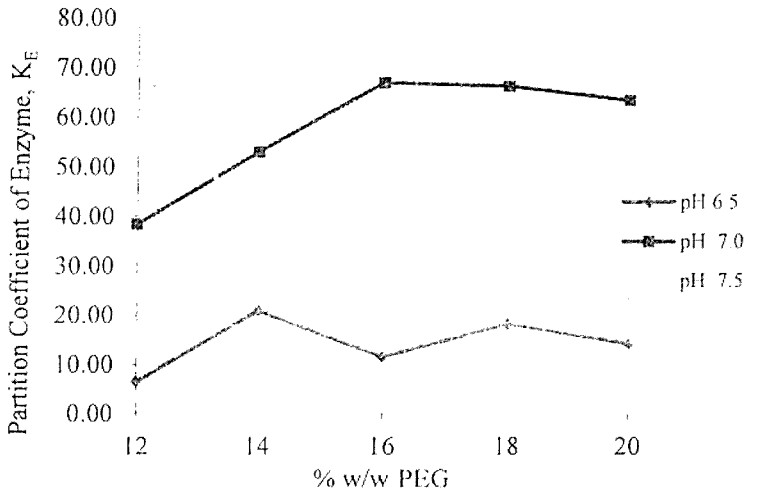
รูปที่ 2 ผลของความเข้มข้นฟอสเฟต ที่ 14-22% w/w ต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์แลคเคส (K_E) (♦) และ ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของโปรตีน (K_p) (■) เมื่อใช้ PEG 4000 ความเข้มข้น 12% w/w ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเท่ากับ 7.0

<u>อิทธิพลของค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่อการสกัดแลคเคส</u>

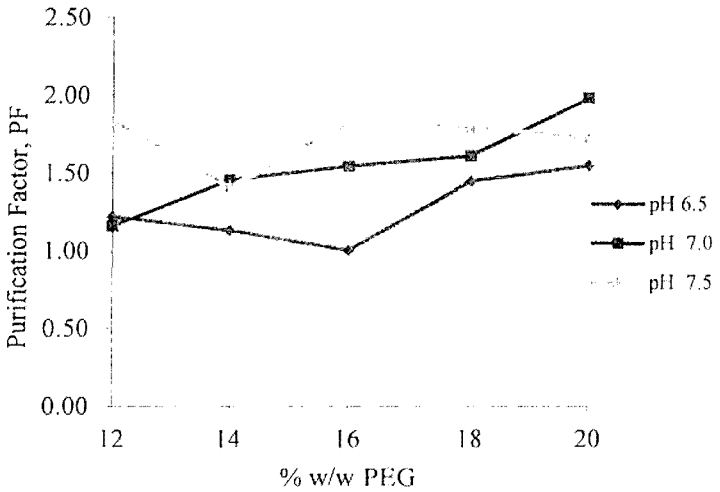
ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการแยกของโปรตีน การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างจะมีอิทธิพลต่อประจุของโปรตีน ทำให้พฤติกรรมการแยกของโปรตีนในวัฏภาคบนและล่างเปลี่ยนไป พฤติกรรมการแยกของแลคเคสเมื่อระบบสองวัฏภาคมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.5 7.0 และ7.5 ถูกศึกษาในระบบที่ประกอบด้วย PEG 4000 ความเข้มข้น 12-20 %w/w และเกลือฟอสเฟตควบคุมความเข้มข้นที่ 14% w/w

ปกติในระบบสองวัฏภาคของ PEG-เกลือฟอสเฟต เมื่อเกิดการแบ่งวัฏภาค ฟอสเฟตจะกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคทั้งสองของระบบ แต่จะสะสมมากในวัฏภาคล่าง การกระจายของฟอสเฟตที่ไม่เท่ากันนี้ทำให้ความแตกต่างของศักย์ไฟฟ้าระหว่างวัฏภาคเพิ่มขึ้น และวัฏภาคที่มีการสะสมของฟอสเฟตมากจะมีศักย์ไฟฟ้าเป็นลบ จึงทำให้โมเลกุลของโปรตีนที่มีประจุลบถูกผลักไปวัฏภาคบนเพิ่มขึ้น ดังนั้นถ้าค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเพิ่มสูงกว่าจุดไอโซอิเล็กตริกของโปรตีน จะทำให้พื้นผิวโปรตีนมีประจุลบและถูกแยกไปอยู่ในวัฏภาคบนมากขึ้น ค่าสัมประสิทธิ์การแยกจึงสูงขึ้น สำหรับเอนไซม์แลคเคสจัดเป็นเอนไซม์ใน

กลุ่ม acidic มีจุดไอโซอิเล็กตริกประมาณ 4.0 (Baldrian, 2006) การเพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่าง จะทำให้โปรตีนเคลื่อนไปวัฏภาคบนมากขึ้น



รูปที่ 3 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ 6.5 (♦) 7.0 (■) และ 7.5 (▲) ที่มีต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์แลคเคสในวัฏภาคบนเมื่อใช้ PEG 4000 ที่ความเข้มข้น 12-20 %w/w และเกลือฟอสเฟตความเข้มข้น 14% w/w



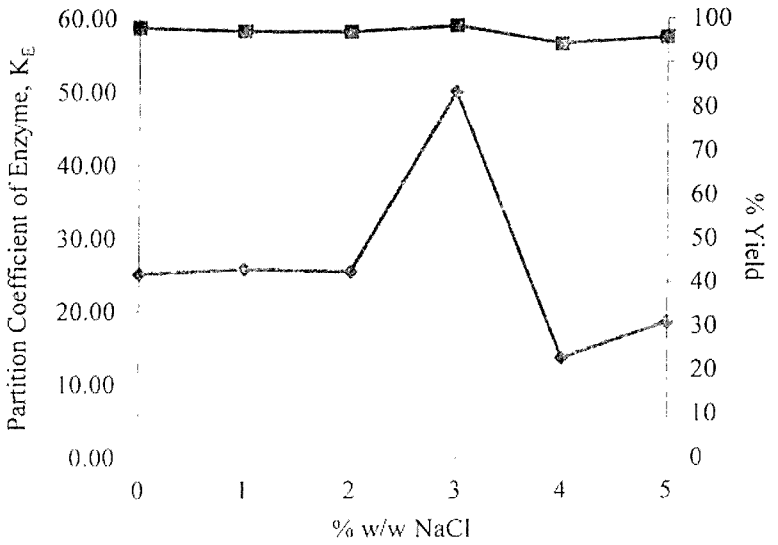
รูปที่ 4 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ 6.5 (♦) 7.0 (■) และ 7.5 (▲)ที่มีต่อค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์แลคเคสในวัฏภาคบนเมื่อใช้ PEG 4000 ที่ความเข้มข้น 12-20 %w/w และเกลือฟอสเฟตความเข้มข้น 14% w/w

จากรูปที่ 3 ค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์แลคเคสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ที่ความเป็นกรด-ด่างสูง พบว่าสัมประสิทธิ์การแยกแลคเคสมีค่าสูงที่ระบบมีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 เมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นของ PEG เดียวกัน และเมื่อพิจารณาค่าความบริสุทธิ์ของแลคเคส (รูปที่ 4) ของระบบที่ความเป็นกรด-ด่าง 6.5 7.0 และ 7.5 มีค่าในช่วง 1.00-1.55 1.16-1.98 และ1.41-1.84 ตามลำดับ ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5 ความเข้มข้นของ PEG บางจุดให้ค่าความบริสุทธิ์สูงกว่าที่ความเป็นกรด-ด่าง 7.0 อาจเนื่องจากโปรตีนปนเปื้อนที่มีประจุลบแยกไปยังวัฏภาคบนพร้อมๆกับเอนไซม์แลคเคสได้มากขึ้น จึงทำให้ค่าความบริสุทธิ์ที่ 7.0 ต่ำลง ส่วนค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ของแลคเคสในวัฏภาคบน จะใช้ความสัมพันธ์ของค่าสัดส่วนปริมาตรระหว่างวัฏภาคบนและวัฏภาคล่างและค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์มาคำนวณ การเปลี่ยนแปลงปริมาตรของวัฏภาคบนต่อวัฏภาคล่างเกิดขึ้นน้อยมากเมื่อเพิ่มความเป็นกรด-ด่างของระบบ สัดส่วนปริมาตรอยู่ในช่วง 1.22-1.63 ดังนั้นค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ที่เกิดขึ้นจะมีทิศทางสัมพันธ์กับสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์

อิทธิพลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการสกัดแลคเคส

ผลของการเติมโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0% ถึง 5% ต่อการสกัดแลคเคสในระบบสองวัฏภาคของ 12% w/w PEG และ 14% w/w เกลือฟอสเฟต ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 แสดงในรูปที่ 5 พบว่าการเติมโซเดียมคลอไรด์มีผลต่อการแยกเอนไซม์ไม่ชัดเจน โดยค่าสัมประสิทธิ์การแยกเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 50.00 เมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ 3% w/w เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 4% w/w สัมประสิทธิ์การแยกลดลงเหลือ 13.58 และเพิ่มขึ้นเป็น 18.50 เมื่อความเข้มข้นเป็น 5% w/w ส่วนค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้เปลี่ยนแปลงไม่มากอยู่ในช่วง 94.32-98.39%

โดยทั่วไปโซเดียมคลอไรด์ จะกระจายตัวอยู่ในวัฏภาคทั้งสองเท่าๆกันและทำให้ค่าความต่างศักย์ของทั้งสองวัฏภาคลดลง เนื่องจากโซเดียมคลอไรด์มีผลทำให้การกระจายตัวของฟอสเฟตที่อยู่ในวัฏภาคทั้งสองไม่เท่ากันลดลง ซึ่งส่งผลต่อแรงที่กระทำระหว่างโมเลกุลที่มีขั้วในวัฏภาคทั้งสอง และทำให้ความแตกต่างของลักษณะไฮโดรโฟบิกระหว่างวัฏภาคทั้งสองลดลงด้วย โซเดียมคลอไรด์ยังส่งผลต่อลักษณะของตัวทำละลายในวัฏภาคและสมบัติของโปรตีน โซเดียมคลอไรด์จะมีความจำเพาะเจาะจงต่อโปรตีนและเกิดแรงกระทำขึ้นระหว่างโมเลกุลทั้งสอง ทำให้การแยกโปรตีนในระบบดีขึ้นหรืออาจจะต่ำลงเมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ อย่างไรก็ตามอิทธิพลของโซเดียมคลอไรด์ต่อระบบสองวัฏภาคยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน Naganagouda และ Mulimani (Naganagouda and Mulimani, 2008) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 2.5-10% ในระบบสองวัฏภาคของ PEG 4000 และเกลือฟอสเฟต ไม่ได้ส่งผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกเอนไซม์ α-galactosidase นอกจากนี้ในการแยกทริปซินในระบบสองวัฏภาคของ PEG 4000 และ cashew nut tree gum ที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ 0.1 และ1 M ก็ไม่สามารถแสดงทิศทางการแยกของเอนไซม์ได้ชัดเจน (Oliveira et al., 2002)



รูปที่ 5 ผลของความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 0-5% w/w ต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์แลคเคส (K_E) (♦) และ ค่าเปอร์เซ็นต์ผลได้ (% Yield) (■) เมื่อระบบประกอบด้วย PEG 1000 ความเข้มข้น 12% w/w และเกลือฟอสเฟต 14%w/w ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบเท่ากับ 7.0

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

<u>สรุปผลการวิจัย</u>

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

2) การเพิ่มความเข้มข้นของ PEG ส่งผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแยกของเอนไซม์แลคเคส (K_E) และโปรตีน (K_P) การเพิ่มความเข้มข้นของ PEG ทำให้แรงกระทำระหว่าง PEG กับพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของเอนไซม์แลคเคสเพิ่มขึ้น เอนไซม์จึงแยกไปยังวัฏภาคบนมากขึ้น ค่า K_E เพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่า K_P มีแนวโน้มลดลง แสดงให้เห็นว่าโปรตีนปนเปื้อนเคลื่อนสู่วัฏภาคล่างเมื่อความเข้มข้นของ PEG เพิ่มขึ้น

3) ความเข้มข้นของเกลือฟอสเฟตที่ 14-22 %w/w ถูกนำมาใช้ร่วมกับ PEG 4000 ที่ 12 %w/w ในการสร้างระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบถูกควบคุมที่ 7.0 การเพิ่มเกลือ

ฟอสเฟตทำให้สัดส่วนวัฏภาคล่างมากขึ้น ค่าสัดส่วนปริมาตร (Vr) จึงลดลง ความเข้มข้นของเกลือฟอสเฟตที่ 16 %w/w ให้ค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์แลคเคสในวัฏภาคบนสูงสุด คือ 3.01 เท่า

4) ค่าสัมประสิทธิ์การแยกแลคเคสมีค่าสูงที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 และ 7.5 ที่ความเข้มข้นของ PEG เดียวกัน แต่เมื่อพิจารณาค่าความบริสุทธิ์ของแลคเคสของระบบที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5 ให้ค่าความบริสุทธิ์สูงที่สุด อย่างไรก็ตามการเลือกค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ควรคำนึงถึงเสถียรภาพและค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่สภาวะความเป็นกรด-ด่างนั้นด้วย

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

ข้อเสนอแนะ

1) ควรเพิ่มน้ำหนักโมเลกุลของ PEG ในการพิจารณามากขึ้นเพื่อความหลากหลายของข้อมูลและสามารถนำมาใช้อธิบายผลของน้ำหนักโมเลกุลของ PEG ที่มีต่อการแยกเอนไซม์แลคเคสได้ชัดเจนมากขึ้น

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

3) การเลือกค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่เหมาะสมสำหรับแยกเอนไซม์แลคเคส ควรคำนึงถึงเสถียรภาพการทำงานของเอนไซม์ที่มีต่อค่าความเป็นกรด-ด่างนั้นด้วย และอาจจะศึกษาลักษณะการแยกของเอนไซม์แลคเคสเพิ่มเติมที่ค่าความเป็นกรด-ด่างครอบคลุมจุดไอโซอิเล็กตริกของแลคเคส เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการแยกที่เกิดขึ้น

4) เกลือโซเดียมคลอไรด์นอกจากจะมีอิทธิพลต่อการแยกวัฏภาค ยังช่วยเร่งการแยกวัฏภาคให้เกิดเร็วขึ้นและลดไฮโดรโฟบิกของโปรตีน ควรศึกษาลักษณะการแยกของเอนไซม์แลคเคสหลังเติมเกลือชนิดอื่นที่ไม่มีประจุเพิ่มเติม เช่น โพแทสเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ หรือแมงกานีสคลอไรด์ และควรตรวจสอบผลของเกลือเหล่านี้ที่มีต่อค่ากิจกรรมการทำงานและเสถียรภาพของเอนไซม์