



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การย่อยสลายสีย้อมสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์แลคเคสหยาบในถังปฏิกรณ์
ชีวภาพเยื่อกรอง

โดย

ผศ.ดร.กรรณิกา รัตนพงศ์เลขา และคณะ

กรกฎาคม 2559



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การย่อยสลายสีย้อมสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์แลคเคสหยาบในถังปฏิกรณ์
ชีวภาพเยื่อกรอง

Decolorization of Synthetic Dyes in Crude Laccase-membrane
Bioreactor

ผู้วิจัย

1. ผศ.ดร.กรรณิกา รัตนพงศ์เลขา
2. ดร.จิรภา เพชรสม

สังกัด

คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2555-2556

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ม.อบ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทสรุปผู้บริหาร

ชื่อเรื่อง	การย่อยสลายสีย้อมสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์แลคเคสหยาบในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง Decolorization of Synthetic Dyes in Crude Laccase-membrane Bioreactor
ผู้วิจัย	ผศ.ดร. กรรณิกา รัตนพงศ์เลขาและ ดร.จิรภา เพชรสม
หน่วยงาน	คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันสีย้อมถูกนำมาใช้เป็นจำนวนมากในอุตสาหกรรม เช่น สิ่งทอ พลาสติก การพิมพ์ เครื่องสำอาง และการผลิตยา เมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิตสีย้อมจำนวนหนึ่งจะถูกปล่อยออกมาปนเปื้อนน้ำทิ้ง โดยเฉพาะอุตสาหกรรมสิ่งทอเป็นอุตสาหกรรมที่มีการใช้น้ำและสารเคมีเป็นจำนวนมาก น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมนี้จะมีปริมาณสารเคมีตกค้างสูงและมีสีที่ค่อนข้างกำจัดได้ยาก พบว่าประมาณ 10-15% ของสีที่ใช้จะปนเปื้อนออกมากับน้ำทิ้งของกระบวนการ (Kunamneni et al., 2008) สีย้อมส่วนใหญ่เป็นสีสังเคราะห์ที่เป็นผลิตภัณฑ์มาจากน้ำมันปิโตรเลียม มีโครงสร้างเป็นสารไฮโดรคาร์บอนพวกอะลิฟาติกและวงแหวนอะโรมาติกหลายวงมาต่อกัน ซึ่งมีความเสถียรต่อแสง ความร้อน สารออกซิไดซ์ต่างๆ สีเหล่านี้ยังมีโครงสร้างซับซ้อน ความคงตัวสูง ยากต่อการย่อยสลาย และสามารถบดบังแสง ดังนั้นปริมาณแสงส่องผ่านลงไปในน้ำได้น้อยลงส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง การเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตในน้ำและปริมาณของก๊าซออกซิเจนที่ละลายในน้ำลดลง ทำให้ระบบนิเวศวิทยาเสียสมดุล นอกจากนี้ยังพบว่าสีสังเคราะห์หลายชนิดที่เตรียมจากกลุ่มเบนซีนหรือกลุ่มสารประกอบอะโรมาติก มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำและเป็นสารพิษก่อมะเร็ง (toxic carcinogenic) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในมนุษย์ (Enayatzamir et al., 2009; Kariminiaae-Hamedani et al., 2007) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องกำจัดสีย้อมที่ปนเปื้อนออกมากับน้ำทิ้งก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติต่อไป

วิธีการกำจัดสีย้อมทางกายภาพและทางเคมีถูกนำมาทดสอบหลายวิธีการด้วยกัน เช่น การใช้กระบวนการดูดซับ (Adsorption) ด้วยถ่านกัมมันต์ เบนโทไนท์ และแร่ดินธรรมชาติ (Robinson et al., 2001) การสร้างและรวมตะกอน (Coagulation and Flocculation) การแลกเปลี่ยนไอออน (Ion-exchange) การจัดการด้วยวิธีเหล่านี้ก่อให้เกิดปริมาณตะกอนมากและยากต่อการจัดการเนื่องจากความเป็นพิษของสารยังคงเหลืออยู่ (Katuri et al., 2009) นอกจากนี้ยังมีวิธีที่ใช้โอโซน (Ozonation) วิธีการออกซิเดชันและคลอรีนชัน (Oxidation and Chlorination) (Ciardelli and Ranieri, 2001; Konsowa, 2003) และวิธีการทางอิเล็กโตรเคมีคัล (Electrochemical method) (Lin and Peng, 1996; Rodríguez Couto, 2009) พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมด้วยวิธีการเหล่านี้ไม่ดีเท่าที่ควรเมื่อเทียบกับค่าใช้จ่ายในการลงทุนและดำเนินการที่สูง ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคเยื่อกรองมาใช้อย่างแพร่หลายในการบำบัดน้ำเสีย การเลือกใช้แผ่นเยื่อกรองที่เหมาะสมต่อคุณลักษณะน้ำเสียเป็นสิ่งสำคัญ การกรองแบบออสโมซิสผันกลับ (Reverse osmosis) และการกรองแบบนาโน (Nanofiltration) ถูกนำมาใช้กำจัดสีย้อมในอุตสาหกรรมสิ่งทอ (Kim et al., 2005; Tang and Chen, 2002) แต่การดำเนินระบบในเยื่อกรองทั้งสองเกิดการอุดตันได้ง่ายและยังต้องใช้พลังงานในการผลักดันสูง สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายอย่างมาก จึงได้มีการศึกษาการใช้เยื่อกรองแบบอัลตรา (Ultrafiltration)

membrane) ซึ่งมีคุณสมบัติที่ให้อัตราการไหลสูงภายใต้สภาวะความดันต่ำ ใช้พลังงานน้อยกว่า แต่พบว่าความสามารถในการกำจัดสีย้อมดำ (Tang and Chen, 2002) อย่างไรก็ตามได้มีการมีความพยายามในการนำการกรองแบบอัลตรามาใช้ร่วมกับวิธีการบำบัดอื่นๆ เช่นการใช้ร่วมกับการดูดซับด้วยเบนโทไนท์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัด (Al-Bastaki and Banat, 2004)

นอกจากกระบวนการบำบัดสีย้อมทางกายภาพและทางเคมี กระบวนการทางชีวภาพโดยอาศัยตัวเร่งทางชีวภาพ เช่น จุลินทรีย์ หรือเอนไซม์ เป็นอีกวิธีที่น่าสนใจ กลไกการกำจัดสีย้อมโดยจุลินทรีย์ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือการดูดซับสีไว้ที่ผิวเซลล์และเซลล์จะผลิตเอนไซม์มา่อยสลาย (Tatarko and Bumpus, 1998) อย่างไรก็ตามนอกจากจะพบสีย้อมในน้ำทิ้งแล้วยังอาจจะพบการเจือปนของสารฆ่าแมลงในกลุ่มออกแกโนคลอไรด์ โลหะหนัก และพิกเมนต์ โดยสารเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ และเมื่อจุลินทรีย์ทำการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนพบว่าสารประกอบไนโตรเจนที่อยู่ในสีย้อมจะถูกเปลี่ยนรูปไปเป็นอะโรมาติกเอไมด์ที่มีความเป็นพิษสูงขึ้น ส่งผลให้การทำงานของจุลินทรีย์ลดลง (Zouari-Mechichi et al., 2006) การนำเอนไซม์มาประยุกต์ใช้ในการกำจัดสีย้อมแทนจุลินทรีย์สามารถช่วยลดปัญหาดังกล่าว นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้น ทำงานได้ถึงแม้จะมีสารพิษเจือปนและสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง (Katuri et al., 2009) และเอนไซม์ยังช่วยเปลี่ยนรูปโครงสร้างของสีให้มีความเป็นพิษลดลง เมื่อปล่อยสู่สิ่งแวดล้อมสามารถถูกย่อยสลายได้สมบูรณ์ด้วยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ

เอนไซม์แลคเคสเป็นเอนไซม์ที่ได้รับความสนใจอย่างมากเนื่องจากความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสับสเตรตได้หลากหลาย เช่น สารประกอบโพลีฟีนอล ไโดเอมีน อะโรมาติกเอไมด์ และสารอนินทรีย์บางชนิด เอนไซม์นี้พบทั่วไปในพืชชั้นสูง แมลงบางชนิด แบคทีเรียและเชื้อรา โดยเฉพาะเชื้อราจำพวกไวท์รอต (white-rot fungi) อย่างไรก็ตามการนำเอนไซม์มาใช้มีข้อจำกัดคือ เอนไซม์มีราคาแพง ขั้นตอนการแยกและสกัดเอนไซม์ยุ่งยาก จึงมีความพยายามในการนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่โดยอาศัยวิธีการตรึงเอนไซม์ แต่เมื่อเอนไซม์ถูกตรึงกับสารเคมีอาจส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลงเนื่องจากบริเวณเร่งของเอนไซม์ไปจับกับสารเคมีที่ใช้ตรึง ส่งผลให้ความสามารถในการจับกันระหว่างเอนไซม์กับสีลดลง การแก้ปัญหาดังกล่าวอาจทำได้โดยนำเอนไซม์มาตรึงโดยใช้หลักการทางกายภาพ คือการกักเอนไซม์ไว้ในชุดเยื่อกรองแบบอัลตรา และผ่านน้ำทิ้งสีย้อมเข้าไปบำบัด ทำให้เอนไซม์มีคุณสมบัติเหมือนเอนไซม์ในรูปอิสระ ไม่กระทบต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ การดำเนินระบบสามารถทำได้อย่างต่อเนื่อง เอนไซม์ไม่สูญหายไปกับน้ำที่ผ่านระบบ และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมด้วยเอนไซม์แลคเคสที่สกัดจากเชื้อเห็ดตับเต่าและนำเอนไซม์มาใช้ร่วมกับชุดเยื่อกรองแบบอัลตรา รวมถึงศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการกำจัดสี

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมของเอนไซม์แลคเคส
- 2) เพื่อศึกษาผลสภาวะแวดล้อมที่ส่งผลต่อการฟอกจางสีย้อมในชุดการทดลองแบบเบทช์
- 3) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพและสภาวะการเดินระบบในการกำจัดสีย้อมด้วยเอนไซม์แลคเคสในระบบถึงปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการนำเอนไซม์แลคเคสหายาบสกัดจาก *Lentinus polychrous* Lev. มาใช้ในการฟอกจางสีย้อม โดยแบ่งการศึกษาเป็น 2 ส่วนใหญ่คือ 1) การฟอกจางสีย้อมด้วยแลคเคสในชุดทดลองแบบแบทช์เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นของสีย้อม การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิและผลของสารเติมที่มีต่อการฟอกจางสีย้อมด้วยแลคเคส และ 2) การฟอกจางสีย้อมด้วยแลคเคสในชุดทดลองถึงปฏิกิริยชีวภาพเยื่อกรอง โดยจะศึกษาถึงการกักกันเอนไซม์ในถึงปฏิกิริยชีวภาพเยื่อกรอง การกำจัดสีย้อมด้วยถึงปฏิกิริยเยื่อกรองและถึงปฏิกิริยชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคสเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นของสีย้อม การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่าง และอัตราการไหลของสารเข้าสู่ระบบ

การเตรียมเอนไซม์แลคเคสหายาบ (Preparation of crude enzyme)

เอนไซม์แลคเคสหายาบถูกเตรียมโดยนำเชื้อเห็ดบดที่เจริญบนอาหารแข็งผสมระหว่างแกลบและรำ 14 วัน มาเติมน้ำกลั่น ด้วยอัตราส่วน น้ำกลั่น 3 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 กรัม นำมาควนบนเครื่องควนแบบแม่เหล็กเป็นเวลา 45 นาที กรองกากอาหารเลี้ยงเชื้อออกโดยใช้ผ้าขาวบาง นำสารละลายที่ผ่านการกรองมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนตะกอนทิ้งไป และส่วนที่เป็นสารละลายจะเรียกว่าเอนไซม์หายาบ นำเอนไซม์หายาบที่สกัดได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

การเตรียมสีย้อม

ทำการละลายสีย้อม Acid blue 80, Reactive Green 19, Reactive Orange 16, Indigo carmine, Acid Green 27, Alizarin Red และ Direct Blue 71 โดยทำการชั่งน้ำหนักสีย้อม 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 ml ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสมร่วมกับการเจือจางสีย้อมในกรณีที่ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่า 1 โดยการวัด Acid blue 80 ที่ความยาวคลื่น 626 nm สี Reactive Green 19 ที่ความยาวคลื่น 630 nm สี Reactive Orange 16 ที่ความยาวคลื่น 420 nm สี Indigo carmine ที่ความยาวคลื่น 650 nm สี Acid Green 27 ที่ความยาวคลื่น 605 nm สี Alizarin Red ที่ความยาวคลื่น 423 nm และ สี Direct Blue 71 ที่ความยาวคลื่น 594 nm

1) การฟอกจางสีย้อมโดยเอนไซม์หายาบแลคเคสในชุดทดลองแบบแบทช์

นำเอนไซม์หายาบแลคเคสที่ได้มาทำการฟอกจางสีย้อม Acid blue 80, Reactive Green 19, Reactive Orange 16, Indigo carmine, Acid Green 27, Alizarin Red และ Direct Blue 71 โดยการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการฟอกจางสีย้อมดังนี้

1.1 การทดสอบสภาวะการฟอกจางสีของเอนไซม์หายาบแลคเคสโดยการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสีย้อม

เตรียมสารละลายเพื่อทำปฏิกิริยาการฟอกจางสีย้อมชนิดต่างๆ โดยการปรับเปลี่ยนปริมาณของสีย้อมคือ Acid blue 80 ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามีปริมาณ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 μg สีย้อม Reactive Green 19 มีปริมาณ 10, 20, 30, 40 และ 50 μg สีย้อม Reactive Orange 16 มีปริมาณ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 μg สีย้อม Indigo carmine มีปริมาณ 20, 40, 60 และ 80 μg สีย้อม Acid Green 27 มีปริมาณ 20, 30, 40, 50 และ 60 μg สีย้อม Direct Blue 71 มีปริมาณ 60, 70, 80, 90 และ 100 μg และ สีย้อม

Alizarin Red มีปริมาณ 30, 40, 50, 60 และ 70 μg ใช้เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 หน่วยต่อมิลลิลิตร ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ในปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร แล้วทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส แล้วทำการวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่นของสีย้อมชนิดต่างๆ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 10 นาที ในเวลา 1 ชั่วโมง ยกเว้นสีย้อม Acid Green 27, Alizarin Red, Reactive Orange 16 และ Direct Blue 71 จะทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 1 วัน เป็นเวลา 6 วัน

1.2 การทดสอบสภาวะการฟอกจางสีของเอนไซม์หยาบแลคเคสโดยการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์แลคเคส

เตรียมสารละลายเพื่อทำปฏิกิริยาการฟอกจางสีย้อมชนิดต่างๆ โดยการปรับเปลี่ยนปริมาณของสีย้อม Acid blue 80 ปริมาณ 30 μg , Reactive Green 19 ปริมาณ 40 μg , Reactive Orange 16 ปริมาณ 80 μg , Indigo carmine ปริมาณ 80 μg , และ Acid Green 27 ปริมาณ 30 μg , Alizarin Red ปริมาณ 50 μg และ Direct Blue 71 ปริมาณ 100 μg โดยใช้เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 หน่วยต่อมิลลิลิตร ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 10 นาที เป็นระยะเวลา 60 นาที ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ในปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร แล้วทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส แล้วทำการวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่นของสีย้อมชนิดต่างๆ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 10 นาที ในเวลา 1 ชั่วโมง ยกเว้นสีย้อม Acid Green 27, Alizarin Red, Reactive Orange 16 และ Direct Blue 71 จะทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 1 วัน เป็นเวลา 6 วัน

1.3 การทดสอบสภาวะการฟอกจางสีของเอนไซม์หยาบแลคเคสโดยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

เตรียมสารละลายเพื่อทำปฏิกิริยาการฟอกจางสีย้อมชนิดต่างๆ โดยการผสมสีย้อม Acid blue 80 ปริมาณ 30 μg , Reactive Green 19 ปริมาณ 40 μg , Reactive Orange 16 ปริมาณ 80 μg , Indigo carmine ปริมาณ 80 μg , และ Acid Green 27 ปริมาณ 30 μg , Alizarin Red ปริมาณ 50 μg และ Direct Blue 71 ปริมาณ 100 μg โดยการผสมสีย้อมชนิดต่างๆ ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 และเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร แล้วทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส แล้วทำการวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่นของสีย้อม Acid blue 80 ที่ความยาวคลื่น 626 nm สี Reactive Green 19 ที่ความยาวคลื่น 630 nm และสี Indigo carmine ที่ความยาวคลื่น 650 nm โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 10 นาที ในเวลา 1 ชั่วโมง สี Alizarin Red ที่ความยาวคลื่น 423 nm Acid Green 27 ที่ความยาวคลื่น 605 nm สี Reactive Orange 16 ที่ความยาวคลื่น 420 nm และ สี Direct Blue 71 ที่ความยาวคลื่น 594 nm โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 1 วัน ในระยะเวลา 6 วัน

1.4 การทดสอบสภาวะการฟอกจางสีของเอนไซม์หยาบแลคเคสโดยการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่าง

เตรียมสารละลายเพื่อทำปฏิกิริยาการฟอกจางสีย้อมชนิดต่างๆ โดยการเปลี่ยนชนิดของบัฟเฟอร์ คือ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 โดยการผสมสีย้อม Acid blue 80 ปริมาณ 30 μg , Reactive Green 19 ปริมาณ 40 μg , Reactive Orange 16 ปริมาณ 80 μg , Indigo carmine ปริมาณ 80 μg , และ Acid Green 27 ปริมาณ 30 μg , Alizarin Red ปริมาณ 50 μg และ

Direct Blue 71 ปริมาณ 100 μg และเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร แล้วทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส แล้วทำการวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่นของสีย้อมชนิดต่างๆ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 10 นาที ในเวลา 1 ชั่วโมง ยกเว้นสีย้อม Acid Green 27, Alizarin Red, Reactive Orange 16 และ Direct Blue 71 จะทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 1 วัน เป็นเวลา 6 วัน

1.5 การทดสอบสภาวะการฟอกจางสีของเอนไซม์หยาบแลคเคสโดยการเติมสารตัวกลาง

เตรียมสารละลายเพื่อทำปฏิกิริยาการฟอกจางสีย้อมชนิดต่างๆ Acid blue 80 ปริมาณ 30 μg , Reactive Green 19 ปริมาณ 40 μg , Reactive Orange 16 ปริมาณ 80 μg , Indigo carmine ปริมาณ 80 μg , และ Acid Green 27 ปริมาณ 30 μg , Alizarin Red ปริมาณ 50 μg และ Direct Blue 71 ปริมาณ 100 μg และเติมสารตัวกลาง NaN_3 , Na_2SO_4 , Na_2CO_3 และ NaCl ปริมาณ 5, 10, 15 และ 20 $\mu\text{mole/reaction}$ โดยการผสมสีย้อมชนิดต่างๆ ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 และเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร แล้วทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส แล้วทำการวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่นของสีย้อมโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 10 นาที ในเวลา 1 ชั่วโมง ยกเว้นสีย้อม Acid Green 27, Alizarin Red, Reactive Orange 16 และ Direct Blue 71 จะทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 1 วัน เป็นเวลา 6 วัน

2) การฟอกจางสีย้อมโดยเอนไซม์หยาบแลคเคสในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง

2.1 การติดตั้ง ทดสอบระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง และล้างทำความสะอาด

ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ประกอบไปด้วยถังป้อนสาร (Feed tank) ถังปฏิกิริยา (Reaction tank) ถังเก็บสารจากเพอมีเอท (Permeate tank) ปั๊ม และเยื่อกรองอัลตราฟิวเตรชั่นรุ่น MiniKros® Sampler Filter Modules (Part No. S02-S010-05-P) การทำงานของระบบดังกล่าวเริ่มจากสารละลายสีย้อมและเอนไซม์ถูกเติมลงในถังปฏิกิริยาในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นสารละลายจะถูกปั๊มส่งผ่านไปยังเยื่อกรองอัลตราฟิวเตรชั่นด้วยอัตราการไหล 300 มิลลิลิตรต่อนาที ในขณะที่เยื่อกรองจะปล่อยให้สารละลายสีย้อมใหม่ที่ยังอยู่ในถังป้อนสารจะไหลเข้าสู่ถังปฏิกิริยา สำหรับสารละลายที่ถูกส่งไปยังเยื่อกรองอัลตราฟิวเตรชั่นจะถูกแบ่งเป็นสารละลายที่สามารถผ่านเยื่อกรองได้ เรียกสารละลายส่วนนี้ว่าเพอมีเอท (Permeate) ส่วนสารละลายที่ไม่ผ่านเยื่อกรองเรียกว่า รีเทนเตท (Retentate) จะไหลกลับสู่ถังปฏิกิริยาและจะวนเข้าสู่ระบบอีกครั้ง ทำการเก็บตัวอย่างสารละลายที่เข้าและออกจากระบบ โดยในการศึกษานี้สารละลายสีย้อมจะถูกปั๊มเข้าสู่ถังปฏิกิริยาด้วยอัตราการไหลที่เท่ากับอัตราการไหลของเพอมีเอท ทำให้ปริมาตรของสารในถังปฏิกิริยาถูกควบคุมให้คงที่ สำหรับการทดสอบการทำงานของระบบหลังติดตั้งชุดอุปกรณ์ จะเดินระบบด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็นเวลา 30 นาที วัดอัตราการไหลเมื่อเปลี่ยนแปลงความดันในการดำเนินระบบ

หลังการใช้งานทุกครั้งเยื่อกรองจะถูกนำมาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.01 โมลต่อลิตร โดยสารเคมีดังกล่าวถูกนำมาล้างในระบบเป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นล้างด้วยกรดซิตริก 0.01 โมลต่อลิตร วนล้างในระบบเป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนอีกครั้ง ทดสอบค่าฟลักซ์ของน้ำหลังการล้างเปรียบเทียบกับฟลักซ์ก่อนใช้งาน

2.2 การกักเอนไซม์ในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง

เอนไซม์หยาบแลคเคสถูกเติมลงในถังปฏิกรณ์และถูกปั๊มผ่านเยื่อกรองอัลตราฟิวเตรชั่นด้วยอัตราการไหล 300 มิลลิลิตรต่อนาที สารละลายที่ไม่ผ่านเยื่อกรองจะถูกนำมวนกลับเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ดังเดิม ในขณะเดียวกันสารละลายบัฟเฟอร์จากถังป้อนสารจะไหลเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ด้วยอัตราการไหลที่เท่ากับอัตราการไหลของเพอมีเอททำให้ปริมาตรของสารในถังปฏิกรณ์ถูกควบคุมให้คงที่ ทำการเดินระบบเป็นเวลา 240 นาที เก็บตัวอย่างของสารละลายทั้งในส่วนของเพอมีเอทและที่อยู่ในถังปฏิกรณ์ที่เวลาต่างๆ มาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน

2.3 การทดสอบความเข้มข้นเอนไซม์แลคเคสต่อการกำจัดสี Acid blue 80 ในระบบถังปฏิกรณ์

ทำการศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อการกำจัดสีย้อมในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง โดยเตรียมสารละลายสีย้อมที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับสภาพความเป็นกรดต่างของสารละลายสีย้อมเท่ากับ 7 เติมเอนไซม์หยาบแลคเคสที่ความเข้มข้น 0.013, 0.025, 0.063 และ 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ลงในถังปฏิกรณ์ในอัตราส่วนเอนไซม์ต่อสีย้อมคงที่คือ 1:1 (ปริมาตร:ปริมาตร) และเติมสารสีย้อมลงในถังป้อนสารเข้าสู่ระบบ ซึ่งจะป้อนสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบอย่างต่อเนื่อง ปรับอัตราการไหลของระบบที่ 300 มิลลิลิตรต่อนาที ดำเนินการทดสอบเก็บสารละลายส่วนเพอมีเอทมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสีย้อมและปริมาณโปรตีน พร้อมบันทึกอัตราการไหลของเพอมีเอทเพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าเพอมีเอทฟลักซ์ทุก 30 นาที ตั้งแต่เวลาที่ 0-240 นาที

2.4 การทดสอบความเข้มข้นของสีย้อมต่อการกำจัดสีย้อม Acid blue 80 ในระบบถังปฏิกรณ์

ทำการศึกษาผลความเข้มข้นของสีย้อมต่อการกำจัดสีย้อมในระบบถังปฏิกรณ์เยื่อกรองโดยเตรียมสารละลายสีย้อมที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปรับสภาพความเป็นกรดต่างของสารละลายสีย้อมเท่ากับ 7 พร้อมเติมลงในถังปฏิกรณ์และถังป้อนสารเข้าสู่ระบบ ซึ่งจะป้อนสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบอย่างต่อเนื่อง ปรับอัตราการไหลของระบบ 300 มิลลิลิตรต่อนาที ดำเนินการทดสอบและเก็บสารละลายส่วนเพอมีเอทมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสีย้อม พร้อมบันทึกอัตราการไหลของเพอมีเอทเพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าเพอมีเอทฟลักซ์ ทุก 30 นาที ตั้งแต่เวลาที่ 0-240 นาที

สำหรับการศึกษาความเข้มข้นของสีย้อมต่อการกำจัดสีย้อมในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง ทำการทดลองโดยเตรียมสารละลายสีย้อมที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปรับสภาพความเป็นกรดต่างของสารละลายสีย้อมเท่ากับ 7 เติมเอนไซม์หยาบแลคเคสลงในถังปฏิกรณ์ในอัตราส่วนเอนไซม์ต่อสีย้อม 1:1 (ปริมาตร:ปริมาตร) และเติมสารสีย้อมลงในถังป้อนสารเข้าสู่ระบบ ซึ่งจะป้อนสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบอย่างต่อเนื่อง ปรับอัตราการไหลของระบบที่ 300 มิลลิลิตรต่อนาที ดำเนินการทดสอบเก็บสารละลายส่วนเพอมีเอทมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสีย้อมและปริมาณโปรตีน พร้อมบันทึกอัตราการไหลของเพอมีเอทเพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าเพอมีเอทฟลักซ์ทุก 30 นาที ตั้งแต่เวลาที่ 0-240 นาที

2.5 การทดสอบความเป็นกรดต่างของสีย้อมต่อการกำจัดสีย้อม Acid blue 80 ในระบบถังปฏิกรณ์

ทำการศึกษาผลความเป็นกรดต่างต่อการกำจัดสีย้อมในระบบถังปฏิกรณ์เยื่อกรองโดยเตรียมสารละลายสีย้อมความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนแปลงสภาพความเป็นกรดต่างที่ 4, 5, 6, 7, และ 8 ตามลำดับ พร้อมเติมลงในถังปฏิกรณ์และถังป้อนสารเข้าสู่ระบบ ซึ่งจะป้อนสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบอย่างต่อเนื่อง ปรับ

อัตราการไหลของระบบ 300 มิลลิลิตรต่อนาที ดำเนินการทดสอบและเก็บสารละลายส่วนเพอมีเอทมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสีย้อม พร้อมบันทึกอัตราการไหลของเพอมีเอทเพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าเพอมีเอทฟลักซ์ ทุก 30 นาที ตั้งแต่เวลาที่ 0-240 นาที

สำหรับการศึกษาความเป็นกรดต่างต่อการกำจัดสีย้อมในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง ทำการทดลองโดยเตรียมสารละลายสีย้อมความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนแปลงสภาพความเป็นกรดต่างที่ 4, 5, 6, 7 และ 8 ตามลำดับ เติมเอนไซม์หยาบแลคเคสลงในถังปฏิกรณ์ในอัตราส่วนเอนไซม์ต่อสีย้อม 1:1 (ปริมาตร:ปริมาตร) และเติมสารสีย้อมลงในถังป้อนสารเข้าสู่ระบบ ซึ่งจะป้อนสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบอย่างต่อเนื่อง ปรับอัตราการไหลของระบบที่ 300 มิลลิลิตรต่อนาที ดำเนินการทดสอบเก็บสารละลายส่วนเพอมีเอทมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสีย้อมและปริมาณโปรตีน พร้อมบันทึกอัตราการไหลของเพอมีเอทเพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าเพอมีเอทฟลักซ์ทุก 30 นาที ตั้งแต่เวลาที่ 0-240 นาที

2.6 การทดสอบอัตราการไหลของสารต่อการกำจัดสีย้อม Acid blue 80 ในระบบถังปฏิกรณ์

ทำการศึกษาผลของอัตราการไหลต่อการกำจัดสีย้อมในระบบถังปฏิกรณ์เยื่อกรองโดยเตรียมสารละลายสีย้อมความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับสภาพความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 เติมลงในถังปฏิกรณ์และถังป้อนสารเข้าสู่ระบบ ซึ่งจะป้อนสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบอย่างต่อเนื่อง เปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของระบบที่ 300, 400, 500, 600 และ 700 มิลลิลิตรต่อนาที ดำเนินการทดสอบและเก็บสารละลายส่วนเพอมีเอทมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสีย้อม พร้อมบันทึกอัตราการไหลของเพอมีเอทเพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าเพอมีเอทฟลักซ์ ทุก 30 นาที ตั้งแต่เวลาที่ 0-240 นาที

สำหรับการศึกษาผลของอัตราการไหลต่อการกำจัดสีย้อมในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง ทำการทดลองโดยเตรียมสารละลายสีย้อมความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับสภาพความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 เติมลงในถังปฏิกรณ์ เติมเอนไซม์หยาบแลคเคสลงในถังปฏิกรณ์ในอัตราส่วนเอนไซม์ต่อสีย้อม 1:1 (ปริมาตร:ปริมาตร) และเติมสารสีย้อมลงในถังป้อนสารเข้าสู่ระบบ ซึ่งจะป้อนสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบอย่างต่อเนื่อง เปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของระบบที่ 300, 400, 500, 600 และ 700 มิลลิลิตรต่อนาที ดำเนินการทดสอบเก็บสารละลายส่วนเพอมีเอทมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสีย้อมและปริมาณโปรตีน พร้อมบันทึกอัตราการไหลของเพอมีเอทเพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าเพอมีเอทฟลักซ์ทุก 30 นาที ตั้งแต่เวลาที่ 0-240 นาที

การวิเคราะห์ผลการศึกษา

1) การวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แลคเคส

ทดสอบโดยวัดการออกซิไดซ์ของ ABTS โดยเติมเอนไซม์ตัวอย่าง (50 μ l) ลงใน 0.1 M โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ (940 μ l) pH 4.5 และสารละลาย 10 mM ABTS (10 μ l) เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 32 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 10 นาที หยดปฏิกิริยาด้วย 80% w/v TCA (50 μ l) นำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm กำหนดให้หนึ่งหน่วยเอนไซม์เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ออกซิไดซ์ ABTS ได้ 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด (Molar extinction of ABTS at 420 nm = $3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

2) การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ปริมาณโปรตีนถูกวิเคราะห์ตามวิธีของ Bradford (Bradford, 1976) เริ่มจากนำสารตัวอย่างมา 40 ไมโครลิตร เติม Bradford reagents 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm นำผลค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในสารตัวอย่างมาเทียบกับเส้นกราฟโปรตีนมาตรฐาน

3) การวิเคราะห์การฟอกจางสีด้วยเอนไซม์หยาบแลคเคสในชุดทดลองแบบแบทช์

การฟอกจางสีด้วยเอนไซม์หยาบแลคเคสได้ทำการทดลองสามซ้ำ และนำค่าเฉลี่ย รวมทั้งค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน มาทำการวิเคราะห์เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีและวิเคราะห์กิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์หยาบแลคเคสในการฟอกจางสีของชนิดต่างๆ แล้วหาความสัมพันธ์กับระยะเวลาการฟอกจางสี โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นที่เหมาะสมของสีของชนิดต่างๆ ได้ดังนี้ Acid blue 80, Reactive Green 19, Reactive Orange 16, Indigo carmine, Acid Green 27, Alizarin Red และ Direct Blue 71

4) การวิเคราะห์การฟอกจางสีด้วยเอนไซม์หยาบแลคเคสในชุดทดลองถึงปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง

การศึกษาการฟอกจางสีด้วยเอนไซม์หยาบแลคเคสถึงปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองจะพิจารณาจากค่าการกำจัดสีที่เกิดจากเอนไซม์แลคเคสร่วมกับระบบถึงปฏิกรณ์เยื่อกรอง ค่าการรั่วไหลของเอนไซม์ออกจากถึงปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง และเพอมีเอทฟลักซ์

ผลการวิจัย

การฟอกจางสีด้วยเอนไซม์หยาบแลคเคสในชุดทดลองแบบแบทช์

การทดสอบการฟอกจางสีด้วย Acid blue 80, Reactive Green 19, Reactive Orange 16, Indigo carmine, Acid Green 27, Alizarin Red และ Direct Blue 71 โดยใช้เอนไซม์หยาบแลคเคส และวิเคราะห์ผลการฟอกจางสีในระยะเวลาและสภาวะต่างๆ ดังนี้

1) การทดสอบสภาวะการฟอกจางสี Acid blue 80 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส

การศึกษาการฟอกจางสี Acid blue 80 ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยการปรับเปลี่ยนปริมาณ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 μg ของสี Acid blue 80 โดยใช้เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เมื่อทำการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีทุก 10 นาที เป็นเวลา 60 นาที พบว่า Acid blue 80 มีเปอร์เซ็นต์การถูกฟอกจางสีได้สูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการบ่มปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น และมีค่าเปอร์เซ็นต์ต่ำลงในขณะที่เพิ่มปริมาณสี สำหรับการศึกษาการฟอกจางสี Acid blue 80 โดยปรับเปลี่ยนปริมาณของเอนไซม์หยาบแลคเคส ผลการศึกษาพบว่าปริมาณเอนไซม์มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี โดยการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ทำให้เกิดการฟอกจางสีได้ดีขึ้น และเมื่อปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในการฟอกจางสี จากผลการวิเคราะห์พบว่าอุณหภูมิ 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีต่ำกว่าในการฟอกจางสีที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส ส่วนค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการฟอกจางสีอยู่ในช่วงความเป็นกรดต่างที่ 4-7 ซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงกว่า 90%

2) การทดสอบสภาวะการฟอกจางสี Reactive Green 19 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส

การศึกษาการฟอกจางสี Reactive Green 19 ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยการปรับเปลี่ยนปริมาณ 10, 20, 30, 40 และ 50 μg ของสี Reactive Green 19 โดยใช้เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต ร่วมกับ

บัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงสุดเพียง 10.34% ในเวลา 20 นาที ที่ระดับความเข้มข้นของสีเท่ากับ 10 µg และเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีมีค่าลดลงต่ำกว่าศูนย์เมื่อเวลาเพิ่มมากกว่า 20 นาที ในทุกระดับปริมาณของสีย้อม ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ผลของการฟอกจางสีได้ สำหรับการศึกษาการฟอกจางสี Reactive Green 19 โดยปรับเปลี่ยนปริมาณของเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 4.33%, 4.65%, 2.66% และ 2.99% ตามลำดับ ในเวลา 60 นาที และเมื่อปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในการฟอกจางสี พบว่าอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีดีที่สุดเมื่อระยะเวลาในการฟอกจางสีมากขึ้น โดยมีค่าเท่ากับ 7.27% ที่เวลา 60 นาที ส่วนค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการฟอกจางสีอยู่คือความเป็นกรดต่างที่ 4 เท่ากับ 6.43% ที่เวลา 60 นาที

3) การทดสอบสภาวะการฟอกจางสี Indigo carmine โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส

การศึกษาการฟอกจางสี Indigo carmine ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยการปรับเปลี่ยนปริมาณ 20, 40, 60 และ 80 µg ของสี Indigo carmine โดยใช้เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงสุดที่ระดับ 8.55% เมื่อใช้ปริมาณสีย้อมเท่ากับ 20 µg ในเวลา 60 นาที ในขณะที่การเพิ่มปริมาณสีเป็น 40, 60 และ 80 µg จะพบเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีได้สูงสุดที่ระดับ 4.88%, 3.96% และ 2.02% ตามลำดับ ในเวลาการทำปฏิกิริยา 60 นาที สำหรับการศึกษาการฟอกจางสี Indigo carmine โดยปรับเปลี่ยนปริมาณของเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 1.12%, 1.89%, 2.78%, 2.44% และ 2.10% ตามลำดับ และเมื่อปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในการฟอกจางสี พบว่าอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ให้เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีดีที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 9.21% ที่เวลา 10 นาทีและมีแนวโน้มการฟอกจางลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ส่วนค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการฟอกจางสีอยู่คือความเป็นกรดต่างที่ 4 เท่ากับ 3.42% ที่เวลา 60 นาที

4) การทดสอบสภาวะการฟอกจางสี Reactive Orange 16 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส

การศึกษาการฟอกจางสี Reactive Orange 16 ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยการปรับเปลี่ยนปริมาณปริมาณ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 µg ของสี Reactive Orange 16 โดยใช้เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 1 วัน เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่าสีย้อมปริมาณ 30-80 µg ทำให้เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีมีค่าต่ำมาก น้อยกว่า 1% สำหรับการศึกษาการฟอกจางสี Reactive Orange 16 โดยปรับเปลี่ยนปริมาณของเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 0.13%, 0.13%, 0.23%, 0.26% และ 0.09% ตามลำดับ และเมื่อปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในการฟอกจางสี พบว่าอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ให้เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีดีที่สุดโดยมีแนวโน้มการฟอกจางเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น มีค่าเท่ากับ 0.26% ที่เวลา 6 วัน ส่วนค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการฟอกจางสีอยู่คือความเป็นกรดต่างที่ 4-5

5) การทดสอบสภาวะการฟอกจางสี Acid Green 27 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส

การศึกษาการฟอกจางสี Acid Green 27 ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยการปรับเปลี่ยนปริมาณ 20, 30, 40, 50 และ 60 μg ของสี Acid Green 27 โดยใช้เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 1 วัน เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่าเมื่อใช้สีย้อมปริมาณ 20, 30 และ 40 μg ให้เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 18.45%, 26.51% และ 17.25% ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มปริมาณสีย้อมเท่ากับ 50 และ 60 μg พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีลดลงเท่ากับ 11.94% และ 11.56% ตามลำดับ สำหรับการศึกษาการฟอกจางสี Acid Green 27 โดยปรับเปลี่ยนปริมาณของเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 8.12%, 24.12%, 24.98%, 12.41% และ 10.88% ตามลำดับ และเมื่อปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในการฟอกจางสี พบว่าอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีดีที่สุดโดยมีแนวโน้มการฟอกจางเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น มีค่าเท่ากับ 25.84% เมื่อใช้ระยะเวลาการฟอกจางสี 6 วัน ส่วนค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการฟอกจางสีอยู่คือความเป็นกรดต่างที่ 4-5

6) การทดสอบสภาวะการฟอกจางสี Alizarin Red ของเอนไซม์หยาบแลคเคส

การศึกษาการฟอกจางสี Alizarin Red ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยการปรับเปลี่ยนปริมาณ 30, 40, 50, 60 และ 70 μg ของสี Alizarin Red โดยใช้เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 1 วัน เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่าเมื่อใช้สีย้อม Alizarin Red ปริมาณ 30, 40 และ 50 μg มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 1.55%, 1.56% และ 1.36% ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มปริมาณสีย้อมเท่ากับ 60 และ 70 μg พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีลดลงเท่ากับ 1.14% และ 1.18% ตามลำดับ เมื่อใช้ระยะเวลาการฟอกจางสี 6 วัน สำหรับการศึกษาการฟอกจางสี Alizarin Red โดยปรับเปลี่ยนปริมาณของเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 0%, 1.44%, 2.58%, 3.51% และ 4.25%ตามลำดับ และเมื่อปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในการฟอกจางสี พบว่าอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ให้เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีดีที่สุดมีค่าเท่ากับ 1.55% เมื่อใช้ระยะเวลาการฟอกจางสี 6 วัน ส่วนค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการฟอกจางสีอยู่คือความเป็นกรดต่างที่ 4-5

7) การทดสอบสภาวะการฟอกจางสี Direct Blue 71 ของเอนไซม์หยาบแลคเคส

การศึกษาการฟอกจางสี Direct Blue 71 ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยการปรับเปลี่ยนปริมาณ 60, 70, 80, 90 และ 100 μg ของสี Direct Blue 71 โดยใช้เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 1 วัน เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่าปริมาณสีย้อม 70 และ 90 μg มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 0.14% และ 1.14% ตามลำดับ เมื่อทำการฟอกจางสีในเวลา 5 วัน เมื่อใช้สีย้อมปริมาณ 60 และ 80 μg พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 0.16% และ 0.15% ตามลำดับ เมื่อทำการฟอกจางสีในเวลา 6 วัน และเมื่อเพิ่มปริมาณสีย้อมเท่ากับ 100 μg พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีลดลงเท่ากับ 0.12% สำหรับการศึกษาการฟอกจางสี Direct Blue 71 โดยปรับเปลี่ยนปริมาณของเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 0.12%, 0.14%, 0.15%, 0.13% และ 0.18%ตามลำดับ และเมื่อปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในการฟอกจางสี พบว่าอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ให้

เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีดีที่สุดมีค่าเท่ากับ 0.39% เมื่อใช้ระยะเวลาการฟอกจางสี 4 วัน ส่วนค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการฟอกจางสีอยู่คือความเป็นกรดต่างที่ 4

การฟอกจางสีย้อมโดยเอนไซม์แลคเคสหายาบในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง

การทดสอบความสามารถของการกักเอนไซม์ในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองก่อนนำไปใช้กำจัดสีย้อม พบว่าเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์มีค่ากิจกรรมการทำงานเหลือมากกว่า 60% ที่เวลา 240 นาที ส่วนที่พบในเพอมีเอทที่เวลาเริ่มต้นมีค่าน้อยกว่า 5% และลดลงเรื่อยๆจนกระทั่งไม่ปรากฏ แสดงให้เห็นว่าเยื่อกรองสามารถกักเอนไซม์ได้และปริมาณเอนไซม์ที่หายไปจากถังปฏิกรณ์อาจเกิดจากเอนไซม์ถูกดูดซับที่ผิวหน้าของแผ่นเยื่อกรอง

เมื่อนำถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคสกำจัดสีย้อมชนิด Acid blue 80 โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นของสีย้อม ค่าความเป็นกรดต่างของสารละลาย และอัตราการไหลของสารเข้าระบบ สรุปได้ดังนี้ คือการกำจัดสีย้อมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคสเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์และความเข้มข้นของสีย้อมเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัด โดยทำการควบคุมค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายสีย้อมเท่ากับ 7 อัตราการไหลของสารที่ 300 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อมที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตรมีค่าเพิ่มขึ้นโดยที่เวลา 240 นาทีเท่ากับ 67.72%, 82.64%, 91.75% และ 94.00% ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.013, 0.025, 0.063 และ 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับการใส่สีย้อมที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นเมื่อควบคุมความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จะส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมมีแนวโน้มลดลง โดยเมื่อเวลาดำเนินระบบผ่านไป 240 นาที พบว่าสีย้อมถูกกำจัดไป 98.90%, 98.60%, 94.00%, 92.12% และ 96.69% ที่ความเข้มข้นของสีย้อมเท่ากับ 10 , 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการกำจัดสีย้อมจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น

การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่างของสารละลายส่งผลต่อการกำจัดสีย้อม โดยเมื่อเวลาดำเนินระบบผ่านไป 240 นาที พบว่าสีย้อมถูกกำจัดไป 89.22%, 90.97%, 92.51%, 94.00% และ 75.98% ที่ความเป็นกรดต่างของสารละลายสีย้อมเท่ากับ 4, 5, 6, 7 และ 8 ตามลำดับ ในขณะที่ผลการทดลองฟอกจางสี Acid blue 80 ในชุดทดลองแบบแบทช์ เอนไซม์แลคเคสทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรด 4-5 และเมื่อเอนไซม์อยู่ในสภาวะที่เป็นด่างจะส่งผลให้เสถียรภาพและความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ลดลง ทำปฏิกิริยากับสีย้อมได้น้อยลง และเมื่อดำเนินระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองนานขึ้นจะทำให้เกิดการสะสมของสีย้อมที่ผิวหน้าเยื่อกรองมากขึ้น สีย้อมที่สะสมบริเวณดังกล่าวสามารถแพร่ผ่านเยื่อกรองมากขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าสารละลายสีย้อมที่มีค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 6-7 เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดสีย้อมด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคส ส่วนการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของสารเข้าระบบส่งผลต่อการกำจัดสีย้อม โดยเมื่อเวลาดำเนินระบบผ่านไป 240 นาที พบว่าสีย้อมถูกกำจัดไป 94.00%, 91.04%, 91.20%, 88.57% และ 86.59% ที่อัตราการไหลของสารเข้าระบบเท่ากับ 300, 400, 500, 600 และ 700 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ การเพิ่มอัตราการไหลของสารเข้าระบบทำให้เปอร์เซ็นต์การ

กำจัดสีย้อมลดลงเป็นผลจากการเพิ่มอัตราการไหลทำให้ความดันในระบบเพิ่มขึ้นส่งผลให้แรงดันส่งผ่านเพอมีเอทเร็วขึ้น และการเพิ่มอัตราการไหลทำให้ระยะเวลาสัมผัสระหว่างสีย้อมและเอนไซม์ลดลง การเกิดปฏิกิริยาจึงลดลงเหลือสีย้อมสะสมในระบบและบริเวณผิวหน้าเยื่อกรองมากขึ้น ส่งผลให้บริเวณดังกล่าวมีความเข้มข้นสูง สีย้อมจึงหลุดออกจากระบบเพิ่มขึ้น

สำหรับการกำจัดสีย้อม Acid blue 80 ด้วยถังปฏิกรณ์เยื่อกรองที่ปราศจากเอนไซม์แลคเคส เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสีย้อม ค่าความเป็นกรดต่างของสารละลาย และอัตราการไหลของสารเข้าระบบ พบว่าการเปลี่ยนแปลงปัจจัยดังกล่าวส่งผลต่อการกำจัดสีย้อมของระบบ และแนวโน้มการกำจัดสีย้อมมีการลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อเวลาในการดำเนินระบบเพิ่มขึ้น เนื่องจากอนุภาคของสีย้อม Acid blue 80 มีขนาดเล็กกว่าขนาดรูพรุนของแผ่นเยื่อกรอง สีย้อมจึงผ่านเยื่อกรองได้อย่างต่อเนื่อง และเมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อมกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคสในสภาวะดำเนินระบบที่เหมาะสมสามารถที่จะกำจัดสีย้อมได้มากกว่า 90% แสดงให้เห็นว่าระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคสมีประสิทธิภาพช่วยกำจัดสีย้อม Acid blue 80 ได้เป็นอย่างดี

สรุปผลการวิจัย

การฟอกจางสีย้อมโดยเอนไซม์หยาบแลคเคสในชุดทดลองแบบแบตช์

เอนไซม์หยาบแลคเคสสามารถฟอกจางสี Acid blue 80 ได้ 100% ในเวลา 30 นาที เมื่อใช้ปริมาณสี 5-10 μg เมื่อทดสอบสี Acid Green 27 ปริมาณ 30 μg พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงสุดที่ระดับ 26.51% ในเวลา 6 วัน ในขณะที่การทดสอบสี Alizarin Red พบว่าเอนไซม์หยาบแลคเคสไม่สามารถฟอกจางสีได้ จากผลการศึกษาการฟอกจางสีกลุ่ม anthraquinone โดยใช้เอนไซม์หยาบแลคเคสพบว่าสามารถฟอกจางสี Acid blue 80 ได้ดีกว่าสี Acid Green 27 และ Alizarin Red เมื่อทดสอบการฟอกจางสี Indigo carmine ปริมาณ 20 μg พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงสุดที่ระดับ 8.55% ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ต่ำเช่นเดียวกับการฟอกจางสี Reactive Green 19 ปริมาณ 10 μg และ Reactive Orange 16 ปริมาณ 30 μg มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงสุดที่ระดับ 10.34% และ 0.12% ตามลำดับ ซึ่งสีกลุ่ม indigo และ azo ชนิด Indigo carmine, Reactive Green 19 และ Reactive Orange 16 ไม่สามารถฟอกจางสีด้วยเอนไซม์หยาบแลคเคสได้ดีในสภาวะที่ทำการทดสอบ เช่นเดียวกับผลการทดสอบฟอกจางสี diazo ชนิด Direct blue 71 มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงสุดที่ระดับ 0.16%

การทดสอบสภาวะการฟอกจางสีกลุ่มต่างๆ ด้วยเอนไซม์หยาบแลคเคส พบว่าสภาวะความเป็นกรดต่างในช่วง 4-5 มีความเหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาการฟอกจางสี ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัย พบว่าความเสถียรของเอนไซม์แลคเคสที่ได้จากเชื้อราส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วงค่าความเป็นกรด (Leonowicz et al., 1984) รายงานการศึกษาของ Michniewicz และคณะในปี 2008 (Michniewicz et al., 2008) พบว่าค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมของการฟอกจางสี azo และ anthraquinone ด้วยเอนไซม์หยาบแลคเคสจาก *Cerrena unicolor* มีค่าความเป็นกรดต่างประมาณ 3.5

นอกจากนี้ผลการศึกษายังพบว่าเอนไทม์แลคเคสสามารถฟอกจางสีย้อมต่างชนิดได้ดีในช่วงอุณหภูมิต่างกันในช่วง 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส เอนไทม์แลคเคสจากสิ่งมีชีวิตบางชนิดมีค่าอุณหภูมิการทำงานต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส และเอนไทม์แลคเคสที่มีค่ากิจกรรมการทำงานที่เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีค่าครึ่งชีวิต (half life) เป็นช่วงเวลานานที่ของเอนไทม์จากเชื้อ *Bacillus cinnera* (Slomczynski et al., 1995) มีค่ามากกว่า 2-3 ชั่วโมง ของเอนไทม์จากเชื้อ *L. edodes* และ *Agaricus bisporus* (D'Annibale et al., 2000) มีค่ามากกว่า 50-70 ชั่วโมง ของเอนไทม์จากเชื้อ *Trametes* sp. (Smirnov et al., 2001) ในขณะที่ของเอนไทม์จากเชื้อ *Ganoderma lucidum* เสี่ยงสภาพแบบถาวรที่อุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญในการใช้เอนไทม์ฟอกจางสีย้อม (Murugesan et al., 2007; Zeng et al., 2011)

ผลการศึกษาการฟอกจางสีย้อมชนิดต่างๆ ร่วมกับสารที่มีโอกาสพบในน้ำเสียที่มีการเจือปนของสีย้อม ได้แก่ NaN_3 , Na_2SO_4 , Na_2CO_3 และ NaCl ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM พบว่าสารเหล่านี้ส่งผลต่อการฟอกจางสีย้อมชนิดต่างๆ แตกต่างกัน โดยส่วนมากจะส่งผลให้เอนไทม์สูญเสียกิจกรรมการทำงาน และความเข้มข้นของสารตัวกลางที่ไม่เหมาะสมส่งผลต่อการยับยั้งการฟอกจางสีย้อม

การฟอกจางสีย้อมโดยเอนไทม์แลคเคสหาบในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง

เมื่อนำถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไทม์แลคเคสมากำจัดสีย้อมชนิด Acid blue 80 โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไทม์ ความเข้มข้นของสีย้อม ค่าความเป็นกรดต่างของสารละลาย และอัตราการไหลของสารเข้าระบบ สรุปได้ดังนี้ คือการกำจัดสีย้อมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไทม์แลคเคส เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไทม์และความเข้มข้นของสีย้อมเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัด โดยทำการควบคุมค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายสีย้อมเท่ากับ 7 อัตราการไหลของสารที่ 300 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไทม์ เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อมเพิ่มขึ้น โดยความเข้มข้นของเอนไทม์ 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สามารถกำจัดสีย้อมที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ดีที่สุด คือ 94.00% สำหรับการใช้สีย้อมที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นเมื่อควบคุมความเข้มข้นของเอนไทม์ 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จะส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมมีแนวโน้มลดลง ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการกำจัดสีย้อมจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอนไทม์และความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เข้าทำปฏิกิริยากัน ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าสารละลายสีย้อมที่มีค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 6-7 เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดสีย้อมด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไทม์แลคเคส ในขณะที่ผลการทดลองฟอกจางสี Acid blue 80 ในชุดทดลองแบบแบทช์ ส่วนการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของสารเข้าระบบส่งผลต่อการกำจัดสีย้อม พบว่าการเพิ่มอัตราการไหลของสารเข้าระบบทำให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อมลดลงเป็นผลจากการเพิ่มอัตราการไหลทำให้ความดันในระบบเพิ่มขึ้นส่งผลให้แรงดันส่งผ่านเพอมีเอทเร็วขึ้น และการเพิ่มอัตราการไหลทำให้ระยะเวลาสัมผัสระหว่างสีย้อมและเอนไทม์ลดลง การเกิดปฏิกิริยาจึงลดลงเหลือสีย้อมสะสมในระบบและบริเวณผิวหน้าเยื่อกรองมากขึ้น ส่งผลให้บริเวณดังกล่าวมีความเข้มข้นสูง สีย้อมจึงหลุดออกจากกระบอกเพิ่มขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนเงินวิจัยจากสำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณแผ่นดิน พ.ศ. 2555-2556 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และงานวิจัยนี้ยังได้รับการสนับสนุนทุนบางส่วนสำหรับนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติจากคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี สุดท้ายนี้ขอขอบคุณภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม สำหรับเครื่องมือและสถานที่ในการวิจัยในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานเล่มนี้จะเป็นประโยชน์แก่ผู้อ่าน หากมีข้อผิดพลาดประการใดต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เป็นการนำเอนไซม์แลคเคสหายาบสกัดจาก *Lentinus polychrous* Lev. มาใช้ในการฟอกจางสีย้อม โดยแบ่งการศึกษาเป็น 2 ส่วนคือ การฟอกจางสีย้อมด้วยแลคเคสในถังปฏิกรณ์แบบแบทช์และการฟอกจางสีย้อมด้วยแลคเคสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง สีย้อม 7 ชนิดที่มีโครงสร้างต่างกัน ได้แก่ Acid blue 80, Reactive Green 19, Indigo carmine, Reactive Orange 16, Acid Green 27, Alizarin Red และ Direct Blue 71 ถูกนำมาทดสอบการถูกฟอกจางสีในถังปฏิกรณ์แบบแบทช์ ผลการศึกษาพบว่าความสามารถในการฟอกจางสีของแลคเคสต่อสีย้อมและระยะเวลาที่ใช้ในการฟอกจางสีย้อมแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยเมื่อเปรียบเทียบแล้ว Acid blue 80 เป็นสีย้อมที่ถูกแลคเคสฟอกจางได้ดีที่สุด คือ ถูกฟอกจางได้ 100% ในเวลา 30 นาที ที่ความเข้มข้นสีย้อม 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดต่าง 4-5 อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ส่วนสี Acid Green 27 และ Alizarin Red ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มสี anthraquinone เช่นกันถูกฟอกจางได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับ Acid blue 80 ในขณะที่สีที่จัดอยู่ในกลุ่มอื่น ได้แก่ Indigo carmine, Reactive Green 19, Reactive Orange 16 และ Direct Blue 71 ไม่สามารถฟอกจางสีด้วยเอนไซม์หายาบแลคเคสได้ดีในสภาวะที่ทำการทดสอบ นอกจากนี้ความเข้มข้นของสีย้อมและความเข้มข้นของเอนไซม์ยังส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี การเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ทำให้การฟอกจางดีขึ้น และสภาวะความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมของแลคเคสต่อการทำปฏิกิริยาการฟอกจางสีย้อมเหล่านี้อยู่ในช่วง 4-5 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการฟอกจางสีย้อมแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคสถูกนำมาใช้ในการกำจัดสีย้อม Acid blue 80 เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์และความเข้มข้นของสีย้อมโดยทำการควบคุมค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายสีย้อมเท่ากับ 7 อัตราการไหลของสารที่ 300 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อมเพิ่มขึ้น โดยความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สามารถกำจัดสีย้อมที่มีความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ดีที่สุด คือ 94.00% สำหรับการใช้สีย้อมที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นเมื่อควบคุมความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จะส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมมีแนวโน้มลดลง ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการกำจัดสีย้อมจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอนไซม์และความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่เข้าทำปฏิกิริยากัน นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าสารละลายสีย้อมที่มีค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 6-7 เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดสีย้อมด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคส ส่วนการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของสารเข้าระบบส่งผลต่อการกำจัดสีย้อม พบว่าการเพิ่มอัตราการไหลของสารเข้าระบบทำให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อมลดลงเป็นผลจากความดันในระบบเพิ่มขึ้น ส่งผลให้แรงดันส่งผ่านเพอมีเอทมากขึ้น และการเพิ่มอัตราการไหลทำให้ระยะเวลาสัมผัสระหว่างสีย้อมและเอนไซม์ลดลง สีย้อมถูกสะสมในระบบและบริเวณผิวหน้าเยื่อกรองมากขึ้น ส่งผลให้บริเวณดังกล่าวมีความเข้มข้นสูง สีย้อมจึงหลุดออกจากระบบเพิ่มขึ้น

ABSTRACT

The objective of this study is to use crude laccase extracted from *Lentinus polychrous* Lev. for dye decolorization. The study is divided into 2 parts; dye decolorization by laccase in batch reactor and dye decolorization by laccase in membrane bioreactor. Seven dyes which had different structures such as Acid blue 80, Reactive Green 19, Indigo carmine, Reactive Orange 16, Acid Green 27, Alizarin Red and Direct Blue 71 were chosen for decolorization in batch reactor. The results indicated that the ability of laccase and reaction time for decolorization on each dye were different. In comparison, Acid blue 80 was best decolorized by laccase. The decolorization of Acid blue 80 was 100% in 30 minutes at dye concentration 10 µg/ml, pH 4-5, temperature 32 °C. Acid Green 27 and Alizarin Red which were classified into the same anthraquinone group were less decolorized than the Acid blue 80. While another dye groups such as Indigo carmine, Reactive Green 19, Reactive Orange 16 and Direct Blue 71 were not effectively decolorized by laccase at this testing condition. Furthermore, dye concentration and enzyme concentration affected the percentage of decolorization. Increasing enzyme concentration improved dye decolorization. The optimum pH for these dyes decolorization was in range of 4-5 whereas the optimum temperature for each dye decolorization was various.

Membrane bioreactor containing laccase was employed to decolorization of Acid blue 80. The changes of enzyme concentration and dye concentration when the pH of dye solution was 7 and the flow rate was controlled at 300 ml/min showed that the increase of enzyme concentration increased the percentage of dye removal. The enzyme concentration at 0.125 U/ml could remove 94.00% of dye at the concentration 30 mg/l. The use of higher dye concentration and fixing enzyme concentration at 0.125 U/ml resulted in decreasing the efficiency of dye removal. This study performed that dye removal depended on the enzyme concentration and the substrate concentration. The results also indicated that the pH of dye solution in range of 6-7 was the optimum value for dye removal in membrane bioreactor containing laccase. The variation of solution flow rate influenced the dye removal. The decrease of percentage of dye removal when the flow rate was increased was a result of an increase of pressure in the system and the volume of permeate. The increase of flow rate decreased the contact time between the dye and the enzyme. More dyes were accumulated in the system and on the surface of membrane. High accumulation of dye concentration on the membrane surface made more dyes was out of the system.

สารบัญ

	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	ก
กิตติกรรมประกาศ	ท
บทคัดย่อภาษาไทย	ฅ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ณ
สารบัญ	ด
สารบัญตาราง	ท
สารบัญรูป	ธ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 สมมุติฐานของการวิจัย	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 สีย้อม	4
2.2 การจำแนกสีย้อม	5
2.3 แหล่งของเอนไซม์แลคเคส	6
2.4 การทำงานของแลคเคส	7
2.5 การประยุกต์ใช้แลคเคส	9
2.6 กระบวนการเยื่อกรอง	10
2.7 ถึงปฏิกิริยชีวภาพเยื่อกรอง	13
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง	16
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	16
3.1.1 เครื่องแก้ว	16
3.1.2 เครื่องมือ	16
3.1.3 อื่นๆ	16
3.1.4 สารเคมี	17
3.1.5 เยื่อกรองอัลตราฟิวเตรชั่น	18
3.2 เชื้อเห็ด	18
3.2.1 การเก็บรักษาเชื้อเห็ดสด	18
3.2.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดสด	19
3.3 การเตรียมเอนไซม์แลคเคสหยาบ	19
3.4 การเตรียมสีย้อม	19

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5 กรอบแนวคิดของโครงการวิจัย	20
3.6 วิธีการทดลอง	21
3.6.1 การฟอกจางสีย้อมโดยเอนไซม์หยาบแลคเคสในชุดทดลองแบบแบทช์	21
3.6.2 การฟอกจางสีย้อมโดยเอนไซม์หยาบแลคเคสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง	23
3.7 การวิเคราะห์ผลการศึกษา	26
3.7.1 การวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แลคเคส	26
3.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน	27
3.7.3 การวิเคราะห์การฟอกจางสีด้วยเอนไซม์หยาบแลคเคสในชุดทดลองแบบแบทช์	27
3.7.4 การวิเคราะห์การฟอกจางสีด้วยแลคเคสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง	28
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	29
4.1 การฟอกจางสีย้อมโดยเอนไซม์หยาบแลคเคสในชุดทดลองแบบแบทช์	29
4.1.1 การทดสอบสภาวะการฟอกจางสี Acid blue 80 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส	29
4.1.2 การทดสอบสภาวะการฟอกจางสี Reactive Green 19 โดยเอนไซม์หยาบ	35
4.1.3 การทดสอบสภาวะการฟอกจางสี Indigo carmine โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส	41
4.1.4 การทดสอบสภาวะการฟอกจางสี Reactive Orange 16 โดยเอนไซม์หยาบ	46
แลคเคส	
4.1.5 การทดสอบสภาวะการฟอกจางสี Acid Green 27 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส	50
4.1.6 การทดสอบสภาวะการฟอกจางสี Alizarin Red โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส	57
4.1.7 การทดสอบสภาวะการฟอกจางสี Direct Blue 71 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส	60
4.2 การทดสอบสภาวะการฟอกจางสีของเอนไซม์หยาบแลคเคสโดยการเติมสาร	69
ตัวกลาง NaN_3 , Na_2SO_4 , Na_2CO_3 และ NaCl	
4.2.1 การฟอกจางสี Acid blue 80	69
4.2.2 การฟอกจางสี Reactive Green 19	69
4.2.3 การฟอกจางสี Indigo carmine	74
4.2.4 การฟอกจางสี Reactive Orange 16	74
4.2.5 การฟอกจางสี Acid Green 27	75
4.2.6 การฟอกจางสี Alizarin Red	81
4.2.7 การฟอกจางสี Direct Blue 71	81
4.3 การฟอกจางสีย้อมโดยเอนไซม์แลคเคสหยาบในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง	81
4.3.1 การกักเอนไซม์ในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง	82
4.3.2 การกำจัดสีย้อม Acid blue 80 เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสีย้อม	83
4.3.3 การกำจัดสีย้อม Acid blue 80 เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์	86
4.3.4 การกำจัดสีย้อม Acid blue 80 เมื่อเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างของ	89
สารละลายสีย้อม	
4.3.5 การกำจัดสีย้อม Acid blue 80 เมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของสารละลาย	94

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	98
5.1 สรุปผลการทดลอง	98
5.1.1 การฟอกจางสีย้อมโดยเอนไซม์หยาบแลคเคสในชุดทดลองแบบแบทช์	98
5.1.2 การฟอกจางสีย้อมโดยเอนไซม์แลคเคสหยาบในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพ	100
เยื่อกรอง	
5.2 ข้อเสนอแนะ	101
เอกสารอ้างอิง	103
ภาคผนวก	108
ภาคผนวก ก กราฟมาตรฐานโปรตีนและสีย้อม	108
ภาคผนวก ข ผลงานที่เผยแพร่	113

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.1	เปอร์เซ็นต์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์และโปรตีนในถังปฏิริยาและในเพอมีเอท	83
ตารางที่ 4.2	เปอร์เซ็นต์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แลคเคสในเพอมีเอทจากถังปฏิริย ชีวภาพเยื่อกรองที่ใช้กำจัดสีย้อมความเข้มข้น 10-50 mg/L	85
ตารางที่ 4.3	เปอร์เซ็นต์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แลคเคสในเพอมีเอทจากถังปฏิริย ชีวภาพเยื่อกรองเมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคส 0.013-0.125 U/ml	88
ตารางที่ 4.4	เปอร์เซ็นต์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แลคเคสในเพอมีเอทจากถังปฏิริย ชีวภาพเยื่อกรองเมื่อเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่างของสารละลายสีย้อมที่ 4-8	92
ตารางที่ 4.5	เปอร์เซ็นต์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แลคเคสในเพอมีเอทจากถังปฏิริย ชีวภาพเยื่อกรองเมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของสารเข้าระบบในช่วง 300- 700 ml/min	96
ตารางที่ ก.1	ความเข้มข้นของสีย้อม Reactive Orange 16 และค่าการดูดกลืนแสงที่ความ ยาวคลื่น 420 nm	109
ตารางที่ ก.2	ความเข้มข้นของสีย้อม Acid blue 80 และค่าการดูดกลืนแสงที่ความ ยาวคลื่น 626 nm	110
ตารางที่ ก.3	ความเข้มข้นของสีย้อม Reactive Green 19 และค่าการดูดกลืนแสงที่ความ ยาวคลื่น 630 nm	111
ตารางที่ ก.4	ความเข้มข้นของสีย้อม Indigo carmine และค่าการดูดกลืนแสงที่ความ ยาวคลื่น 650 nm	112

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 แสดง (ก) โครงสร้างของแลคเคส และ (ข) การเกิดปฏิกิริยาระหว่างสับสเตรทกับ เอนไซม์และเกิดน้ำ 2 โมเลกุลจากการรีดักชันโมเลกุลของออกซิเจน	8
รูปที่ 2.2 รูปแบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง (ก) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชื่อมต่อกับชุดเยื่อ กรอง (ข) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีเยื่อกรองแบบจมตัว	13
รูปที่ 2.3 รูปแบบการดูดซับที่เกิดขึ้นกับเยื่อกรอง	15
รูปที่ 3.1 เยื่อกรองอัลตราฟิวเตรชันรุ่น MiniKros®Sampler Filter Modules	18
รูปที่ 3.2 ลักษณะการเจริญของเชื้อเห็ดบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA	19
รูปที่ 3.3 กรอบแนวคิดของโครงการวิจัย	20
รูปที่ 3.4 การติดตั้งระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง	24
รูปที่ 4.1 กิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์หยาบแลคเคสในการฟอกจางสี Acid blue 80 ปริมาณ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์ หยาบแลคเคส 0.125 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในเวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศา เซลเซียส	30
รูปที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid blue 80 ปริมาณ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 หน่วยต่อ มิลลิลิตร เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	31
รูปที่ 4.3 กิจกรรมสัมพันธ์การฟอกจางสี Acid blue 80 ปริมาณ 30 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 unit เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	31
รูปที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid blue 80 ปริมาณ 30 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 unit/ml เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	32
รูปที่ 4.5 กิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์หยาบแลคเคสในการฟอกจางสี Acid blue 80 ปริมาณ 30 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml ในเวลา 60 นาที อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส	33
รูปที่ 4.6 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid blue 80 ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียสในเวลา 60 นาที โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit และ 0.1 M sodium acetate pH 4.5	34
รูปที่ 4.7 กิจกรรมสัมพันธ์การฟอกจางสี Acid blue 80 ปริมาณ 30 μg ในสารละลาย บัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 4, 5, 6 และ 7) และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl (pH 8 และ 9) เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลค เคส 0.125 unit/ml	34
รูปที่ 4.8 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid blue 80 ปริมาณ 30 μg ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 4, 5, 6 และ 7) และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl (pH 8 และ 9) เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบ 0.125 unit/ml	35

รูปที่ 4.9	กิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์หยาบแลคเคสในการฟอกจางสี Reactive Green 19 ปริมาณ 10, 20, 30, 40 และ 50 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml ในเวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	36
รูปที่ 4.10	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Green 19 ปริมาณ 10, 20, 30, 40 และ 50 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	37
รูปที่ 4.11	กิจกรรมสัมพันธ์การฟอกจางสี Reactive Green 19 ปริมาณ 40 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 unit เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	37
รูปที่ 4.12	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Green 19 ปริมาณ 40 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 unit เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	38
รูปที่ 4.13	กิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์หยาบแลคเคสในการฟอกจางสี Reactive Green 19 ปริมาณ 40 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml ในเวลา 60 นาที อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส	39
รูปที่ 4.14	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Green 19 ปริมาณ 40 μg ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียสในเวลา 60 นาที โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit และ 0.1 M sodium acetate pH 4.5	39
รูปที่ 4.15	กิจกรรมสัมพันธ์การฟอกจางสี Reactive Green 19 ปริมาณ 40 μg ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 4, 5, 6 และ 7) และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl (pH 8 และ 9) เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml	40
รูปที่ 4.16	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Green 19 ปริมาณ 40 μg ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 4, 5, 6 และ 7) และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl (pH 8 และ 9) เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml	40
รูปที่ 4.17	กิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์หยาบแลคเคสในการฟอกจางสี Indigo carmine ปริมาณ 20, 40, 60 และ 80 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml ในเวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	42
รูปที่ 4.18	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Indigo carmine ปริมาณ 20, 40, 60 และ 80 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	42
รูปที่ 4.19	กิจกรรมสัมพันธ์การฟอกจางสี Indigo carmine ปริมาณ 80 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 unit เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	43

รูปที่ 4.20	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Indigo carmine ปริมาณ 80 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 unit เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	43
รูปที่ 4.21	กิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์หยาบแลคเคสในการฟอกจางสี Indigo carmine ปริมาณ 80 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml ในเวลา 60 นาที อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส	44
รูปที่ 4.22	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Indigo carmine ปริมาณ 80 μg ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียสในเวลา 60 นาที โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit และ 0.1 M sodium acetate pH 4.5	45
รูปที่ 4.23	กิจกรรมสัมพันธ์การฟอกจางสี Indigo carmine ปริมาณ 80 μg ในสารละลายฟิเอช 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml	45
รูปที่ 4.24	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Indigo carmine ปริมาณ 80 μg ในสารละลายฟิเอช 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml	46
รูปที่ 4.25	กิจกรรมสัมพันธ์การฟอกจางสี Reactive Orange 16 ปริมาณ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 μg ในสารละลายฟิเอช 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4.5 เวลา 6 วัน อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml	47
รูปที่ 4.26	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Orange 16 ปริมาณ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 μg ในสารละลายฟิเอช 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4.5 เวลา 6 วัน อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml	48
รูปที่ 4.27	กิจกรรมสัมพันธ์การฟอกจางสี Reactive Orange 16 ปริมาณ 80 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 unit เวลา 6 วัน อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	48
รูปที่ 4.28	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Orange 16 ปริมาณ 80 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 unit เวลา 6 วัน อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	49
รูปที่ 4.29	กิจกรรมสัมพันธ์การฟอกจางสี Reactive Orange 16 ปริมาณ 80 μg ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียสในเวลา 6 วัน โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit และ 0.1 M sodium acetate pH 4.5	49
รูปที่ 4.30	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Orange 16 ปริมาณ 80 μg ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียสในเวลา 6 วัน โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit และ 0.1 M sodium acetate pH 4.5	51
รูปที่ 4.31	กิจกรรมสัมพันธ์การฟอกจางสี Reactive Orange 16 ปริมาณ 80 μg ในสารละลายฟิเอช 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-	51

HCl pH 8 และ 9 เวลา 6 วัน อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml	
รูปที่ 4.32 เพอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Orange 16 ปริมาณ 80 μg ในสารละลายฟิเอช 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 เวลา 6 วัน อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml	52
รูปที่ 4.33 กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Acid Green 27 ปริมาณ 20, 30, 40, 50 และ 60 μg ในสารละลายฟิเอช 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml	53
รูปที่ 4.34 เพอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid Green 27 ปริมาณ 20, 30, 40, 50 และ 60 μg ในสารละลายฟิเอช 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml	54
รูปที่ 4.35 กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Acid Green 27 ปริมาณ 30 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 unit เวลา 6 วัน อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	54
รูปที่ 4.36 เพอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid Green 27 ปริมาณ 30 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 unit เวลา 6 วัน อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	55
รูปที่ 4.37 กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Acid Green 27 ปริมาณ 30 μg ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ในเวลา 6 วัน โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit และ 0.1 M sodium acetate pH 4.5	55
รูปที่ 4.38 เพอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid Green 27 ปริมาณ 30 μg ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ในเวลา 6 วัน โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit และ 0.1 M sodium acetate pH 4.5	56
รูปที่ 4.39 กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Acid Green 27 ปริมาณ 30 μg ในสารละลายฟิเอช 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml	57
รูปที่ 4.40 เพอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid Green 27 ปริมาณ 30 μg ในสารละลายฟิเอช 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml	58
รูปที่ 4.41 เพอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Alizarin Red ปริมาณ 30, 40, 50, 60 และ 70 μg ในสารละลายฟิเอช 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4.5 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml	58
รูปที่ 4.42 กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Alizarin Red ปริมาณ 30, 40, 50, 60 และ 70 μg ในสารละลายฟิเอช 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4.5 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml	59

รูปที่ 4.43	กิจกรรมสัมพันธ์การฟอกจางสี Alizarin Red ปริมาณ 50 μg ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4.5 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลกเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 unit	61
รูปที่ 4.44	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Alizarin Red ปริมาณ 50 μg ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4.5 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลกเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 unit	61
รูปที่ 4.45	กิจกรรมสัมพันธ์การฟอกจางสี Alizarin Red ปริมาณ 50 μg ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ในเวลา 6 วัน โดยเอนไซม์หยาบแลกเคส 0.2 unit และ 0.1 M sodium acetate pH 4.5	62
รูปที่ 4.46	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Alizarin Red ปริมาณ 50 μg ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ในเวลา 6 วัน โดยเอนไซม์หยาบแลกเคส 0.2 unit และ 0.1 M sodium acetate pH 4.5	62
รูปที่ 4.47	กิจกรรมสัมพันธ์การฟอกจางสี Alizarin Red ปริมาณ 50 μg ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลกเคส 0.2 unit/ml	63
รูปที่ 4.48	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Alizarin Red ปริมาณ 50 μg ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลกเคส 0.125 unit/ml	63
รูปที่ 4.49	กิจกรรมสัมพันธ์การฟอกจางสี Direct Blue 71 ปริมาณ 60, 70, 80, 90 และ 100 μg ในสารละลายพีเอช 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4.5 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลกเคส 0.125 unit/ml	64
รูปที่ 4.50	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Direct Blue 71 ปริมาณ 60, 70, 80, 90 และ 100 μg ในสารละลายพีเอช 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4.5 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลกเคส 0.125 unit/ml	64
รูปที่ 4.51	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Direct Blue 71 ปริมาณ 80 μg ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4.5 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลกเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 unit	65
รูปที่ 4.52	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Direct Blue 71 ปริมาณ 80 μg ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4.5 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลกเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 unit	65
รูปที่ 4.53	กิจกรรมสัมพันธ์การฟอกจางสี Direct Blue 71 ปริมาณ 80 μg ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ในเวลา 6 วัน โดยเอนไซม์หยาบแลกเคส 0.125 unit และ 0.1 M sodium acetate pH 4.5	67
รูปที่ 4.54	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Direct Blue 71 ปริมาณ 100 μg ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ในเวลา 6 วัน โดยเอนไซม์หยาบแลกเคส 0.125 unit และ 0.1 M sodium acetate pH 4.5	67

รูปที่ 4.55	กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Direct Blue 71 ปริมาณ 80 μg ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml	68
รูปที่ 4.56	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Direct Blue 71 ปริมาณ 80 μg ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml	68
รูปที่ 4.57	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid blue 80 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบรวมกับการใช้ Na_2CO_3 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	70
รูปที่ 4.58	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid blue 80 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบรวมกับการใช้ Na_2SO_4 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	71
รูปที่ 4.59	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid blue 80 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบรวมกับการใช้ NaCl ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	71
รูปที่ 4.60	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Green 19 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบรวมกับการใช้ NaN_3 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	72
รูปที่ 4.61	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Green 19 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบรวมกับการใช้ Na_2CO_3 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	72
รูปที่ 4.62	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Green 19 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบรวมกับการใช้ Na_2SO_4 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	73
รูปที่ 4.63	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Green 19 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบรวมกับการใช้ NaCl ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	73
รูปที่ 4.64	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Indigo carmine ในชุดควบคุมเปรียบเทียบรวมกับการใช้ NaN_3 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium	75

acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	
รูปที่ 4.65 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Indigo carmine ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับ การใช้ Na_2CO_3 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	76
รูปที่ 4.66 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Indigo carmine ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับ การใช้ Na_2SO_4 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	76
รูปที่ 4.67 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Indigo carmine ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับ การใช้ NaCl ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	77
รูปที่ 4.68 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Orange 16 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับ การใช้ NaN_3 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	77
รูปที่ 4.69 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Orange 16 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับ การใช้ Na_2CO_3 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	78
รูปที่ 4.70 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Orange 16 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับ การใช้ Na_2SO_4 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	78
รูปที่ 4.71 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Orange 16 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับ การใช้ NaCl ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	79
รูปที่ 4.72 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid Green 27 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับ การใช้ NaN_3 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	79
รูปที่ 4.73 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid Green 27 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับ การใช้ NaCl ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 unit/ml ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	80

รูปที่ 4.74	เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid Green 27 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับการใช้ Na_2CO_3 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	80
รูปที่ 4.75	เปอร์เซ็นต์การกำจัดสี Acid blue 80 เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสีย้อม 10, 20, 30, 40 และ 50 mg/L ฟิเอช 7 เอนไซม์แลคเคส 0.125 U/ml อัตราการไหล 300 mL/min (ก) ถึงปฏิกรณ์เยื่อกรอง และ (ข) ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคส	84
รูปที่ 4.76	เพอมีเอทฟลักซ์จาก (ก) ถึงปฏิกรณ์เยื่อกรอง และ (ข) ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคส เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสีย้อม 10, 20, 30, 40 และ 50 mg/L ฟิเอช 7 เอนไซม์แลคเคส 0.125 U/ml อัตราการไหล 300 mL/min	86
รูปที่ 4.77	เปอร์เซ็นต์การกำจัดสี Acid blue 80 เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคสที่ 0.013, 0.025, 0.063 และ 0.125 U/ml ในถึงปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง ความเข้มข้นของสีย้อมเท่ากับ 30 mg/L ฟิเอช 7 อัตราการไหล 300 mL/min	87
รูปที่ 4.78	เพอมีเอทฟลักซ์จากถึงปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคสความเข้มข้น 0.013, 0.025, 0.063 และ 0.125 U/ml ความเข้มข้นของสีย้อม 30 mg/L ฟิเอช 7 อัตราการไหล 300 mL/min	89
รูปที่ 4.79	เปอร์เซ็นต์การกำจัดสี Acid blue 80 เมื่อเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่างของสารละลายสีย้อมที่ 4, 5, 6, 7 และ 8 ความเข้มข้นของสีย้อมเท่ากับ 30 mg/L เอนไซม์แลคเคส 0.125 U/ml อัตราการไหล 300 mL/min (ก) ถึงปฏิกรณ์เยื่อกรอง และ (ข) ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคส	91
รูปที่ 4.80	เพอมีเอทฟลักซ์จาก (ก) ถึงปฏิกรณ์เยื่อกรอง และ (ข) ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคส เมื่อเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่างของสารละลายสีย้อมที่ 4, 5, 6, 7 และ 8 ความเข้มข้นของสีย้อม 30 mg/L เอนไซม์แลคเคส 0.125 U/ml อัตราการไหล 300 mL/min	93
รูปที่ 4.81	เปอร์เซ็นต์การกำจัดสี Acid blue 80 เมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของสารเข้าระบบที่ 300, 400, 500, 600 และ 700 mL/min ความเข้มข้นของสีย้อมเท่ากับ 30 mg/L ฟิเอช 7 เอนไซม์แลคเคส 0.125 U/ml (ก) ถึงปฏิกรณ์เยื่อกรอง และ (ข) ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคส	94
รูปที่ 4.82	เพอมีเอทฟลักซ์จาก (ก) ถึงปฏิกรณ์เยื่อกรอง และ (ข) ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคส เมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของสารเข้าระบบที่ 300, 400, 500, 600 และ 700 mL/min ความเข้มข้นของสีย้อม 30 mg/L ฟิเอช 7 เอนไซม์แลคเคส 0.125 U/ml	97
รูปที่ ก.1	กราฟมาตรฐานโปรตีน	108
รูปที่ ก.2	การดูดกลืนแสงของสีย้อม Reactive Orange 16 ที่ความยาวคลื่น 420 nm	109
รูปที่ ก.3	การดูดกลืนแสงของสีย้อม Acid blue 80 ที่ความยาวคลื่น 626 nm	110
รูปที่ ก.4	การดูดกลืนแสงของสีย้อม Reactive Green 19 ที่ความยาวคลื่น 630 nm	111

รูปที่ ก.5 การดูดกลืนแสงของสีย้อม Indigo carmine ที่ความยาวคลื่น 650 nm

112

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันสีย้อมถูกนำมาใช้เป็นจำนวนมากในอุตสาหกรรม เช่น สิ่งทอ พลาสติก การพิมพ์ เครื่องสำอาง และการผลิตยา เมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิต สีย้อมจำนวนหนึ่งจะถูกปล่อยออกมากับน้ำทิ้ง และถ้าไม่ผ่านการบำบัดที่เหมาะสมจะก่อให้เกิดปัญหามลพิษทางน้ำอย่างมาก โดยเฉพาะอุตสาหกรรมสิ่งทอเป็นอุตสาหกรรมที่มีการใช้น้ำและสารเคมีเป็นจำนวนมาก น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมนี้จะมีปริมาณสารเคมีตกค้างสูงและมีสีที่ค่อนข้างกำจัดได้ยาก พบว่าประมาณ 10-15% ของสีที่ใช้ จะปนเปื้อนออกมากับน้ำทิ้งของกระบวนการ (Kunamneni et al., 2008) สีย้อมส่วนใหญ่เป็นสีสังเคราะห์ที่เป็นผลิตภัณฑ์มาจากน้ำมันปิโตรเลียม มีโครงสร้างเป็นสารไฮโดรคาร์บอนพวกอะโรมาติกและวงแหวนอะโรมาติกหลายวงมาต่อกัน ซึ่งมีความเสถียรต่อแสง ความร้อน สารออกซิไดซ์ต่างๆ สีเหล่านี้ยังมีโครงสร้างซับซ้อน ความคงตัวสูง ยากต่อการย่อยสลาย และสามารถบดบังแสง ดังนั้นปริมาณแสงส่องผ่านลงไปในน้ำได้น้อยลง ส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์แสง การเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตในน้ำและปริมาณของก๊าซออกซิเจนที่ละลายในน้ำลดลง ทำให้ระบบนิเวศวิทยาเสียสมดุล นอกจากนี้ยังพบว่าสีสังเคราะห์หลายชนิดที่เตรียมจากกลุ่มเบนซีนหรือกลุ่มสารประกอบอะโรมาติก มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ และเป็นสารพิษก่อมะเร็ง (toxic carcinogenic) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในมนุษย์ (Enayatzamir et al., 2009; Kariminiaae-Hamedani et al., 2007) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องกำจัดสีย้อมที่ปนเปื้อนออกมากับน้ำทิ้งก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติต่อไป

วิธีการกำจัดสีย้อมทางกายภาพและทางเคมีถูกนำมาทดสอบหลายวิธีการด้วยกัน เช่น การใช้กระบวนการดูดซับ (Adsorption) ด้วยถ่านกัมมันต์ เบนโทไนท์ และแร่ดินธรรมชาติ (Robinson et al., 2001) การสร้างและรวมตะกอน (Coagulation and Flocculation) การแลกเปลี่ยนไอออน (Ion-exchange) การจัดการด้วยวิธีเหล่านี้ก่อให้เกิดปริมาณตะกอนมากและยากต่อการจัดการเนื่องจากความเป็นพิษของสารยังคงเหลืออยู่ (Katuri et al., 2009) นอกจากนี้ยังมีวิธีการใช้โอโซน (Ozonation) วิธีการออกซิเดชันและคลอรีนชัน (Oxidation and Chlorination) (Ciardelli and Ranieri, 2001; Konsowa, 2003) และวิธีการทางอิเล็กโตรเคมีคัล (Electrochemical method) (Lin and Peng, 1996; Rodríguez Couto, 2009) พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดด้วยวิธีการเหล่านี้ไม่ดีเท่าที่ควรเมื่อเทียบกับค่าใช้จ่ายในการลงทุนและดำเนินการที่สูง ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคเยื่อกรองมาใช้อย่างแพร่หลายในการบำบัดน้ำเสีย การเลือกใช้แผ่นเยื่อกรองที่เหมาะสมต่อคุณลักษณะน้ำเสียเป็นสิ่งสำคัญ การกรองแบบออสโมซิสผันกลับ (Reverse osmosis) และการกรองแบบนาโน (Nanofiltration) ถูกนำมาใช้กำจัดสีย้อมในอุตสาหกรรมสิ่งทอ (Kim et al., 2005; Tang and Chen, 2002) แต่การดำเนินระบบในเยื่อกรองทั้งสองเกิดการอุดตันได้ง่ายและยังต้องใช้พลังงานในการผลักดันสูง สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายอย่างมาก จึงได้มีการศึกษาการใช้เยื่อกรองแบบอัลตรา (Ultrafiltration membrane) ซึ่งมีคุณสมบัติที่ให้อัตราการไหลสูงภายใต้สภาวะความดันต่ำ ใช้พลังงานน้อยกว่า แต่พบว่าความสามารถในการกำจัดสีย้อมต่ำ (Tang and Chen, 2002) อย่างไรก็ตามได้มีการมีความพยายามในการนำการ

กรองแบบอัลตรามาใช้ร่วมกับวิธีการบำบัดอื่นๆ เช่นการใช้ร่วมกับการดูดซับด้วยเบนโทไนท์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัด (Al-Bastaki and Banat, 2004)

นอกจากกระบวนการบำบัดสีย้อมทางกายภาพและทางเคมี กระบวนการทางชีวภาพโดยอาศัยตัวเร่งทางชีวภาพ เช่น จุลินทรีย์ หรือเอนไซม์ เป็นอีกวิธีที่น่าสนใจ กลไกการกำจัดสีย้อมโดยจุลินทรีย์ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือการดูดซับสีไว้ที่ผิวเซลล์และเซลล์จะผลิตเอนไซม์มาย่อยสลาย (Tatarko and Bumpus, 1998) อย่างไรก็ตามนอกจากจะพบสีย้อมในน้ำทิ้งแล้วยังอาจพบการเจริญของสารฆ่าแมลงในกลุ่มออกแทนไดรด์ โลหะหนัก และพิกเมนต์ โดยสารเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและเป็นพิษต่อจุลินทรีย์ และเมื่อจุลินทรีย์ทำการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนพบว่าสารประกอบไนโตรเจนที่อยู่ในสีย้อมจะถูกเปลี่ยนรูปไปเป็นอะโรมาติกเอไมด์ที่มีความเป็นพิษสูงขึ้น ส่งผลให้การทำงานของจุลินทรีย์ลดลง (Zouari-Mechichi et al., 2006) การนำเอนไซม์มาประยุกต์ใช้ในการกำจัดสีย้อมแทนจุลินทรีย์สามารถช่วยลดปัญหาดังกล่าว นอกจากนี้ เอนไซม์ยังมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้น ทำงานได้ถึงแม้จะมีสารพิษเจือปนและสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง (เช่น อุณหภูมิ ค่าพีเอช ค่าความเค็ม การเจริญของสารปนเปื้อน) (Katuri et al., 2009) และเอนไซม์ยังช่วยเปลี่ยนรูปโครงสร้างของสีให้มีความเป็นพิษลดลง เมื่อปล่อยสู่สิ่งแวดล้อมสามารถถูกย่อยสลายได้สมบูรณ์ด้วยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ

เอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโอไลติก เช่น ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase; LiP) แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase; MnP) และ แลคเคส (Laccase; Lac) สามารถย่อยสลายลิกนินและสารประกอบอะโรมาติกที่ก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมได้ จึงนิยมนำมาใช้ในการฟอกจางสีเคมีสังเคราะห์ในน้ำทิ้ง และพบว่าแลคเคสเป็นเอนไซม์ที่ได้รับความนิยมอย่างมากเนื่องจากความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสับสเตรทได้หลากหลาย เช่น สารประกอบโพลีฟีนอล ไคเอมีน อะโรมาติกเอไมด์ และสารอินทรีย์บางชนิด เอนไซม์ชนิดนี้พบทั่วไปในพืชชั้นสูง แมลงบางชนิด แบคทีเรียและเชื้อรา โดยเฉพาะเชื้อราจำพวกไวท์รอต (white-rot fungi) อย่างไรก็ตามการนำเอนไซม์มาใช้มีข้อจำกัดคือ เอนไซม์มีราคาแพง ขั้นตอนการแยกและสกัดเอนไซม์ยุ่งยาก จึงมีความพยายามในการนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่โดยอาศัยวิธีการตรึงเอนไซม์ แต่เมื่อเอนไซม์ถูกตรึงกับสารเคมีอาจส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลงเนื่องจากบริเวณเร่งของเอนไซม์ไปจับกับสารเคมีที่ใช้ตรึง ส่งผลให้ความสามารถในการจับกันระหว่างเอนไซม์กับสีลดลง การแก้ปัญหาดังกล่าวอาจทำได้โดยนำเอนไซม์มาตรึงโดยใช้หลักการทางกายภาพ คือการกักเอนไซม์ไว้ในชุดเยื่อกรองแบบอัลตรา และผ่านน้ำทิ้งสีย้อมเข้าไปบำบัด ทำให้เอนไซม์มีคุณสมบัติเหมือนเอนไซม์ในรูปอิสระ ไม่กระทบต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ การดำเนินระบบสามารถทำได้อย่างต่อเนื่อง เอนไซม์ไม่สูญหายไปกับน้ำที่ผ่านระบบ และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาความสามารถในการกำจัดสีย้อมด้วยเอนไซม์แลคเคสที่สกัดจากเชื้อเห็ดตับเต่าและนำเอนไซม์มาใช้ร่วมกับชุดเยื่อกรองแบบอัลตรา รวมถึงศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการกำจัดสี

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดสีของเอนไซม์แลคเคส
- 1.2.2 เพื่อศึกษาผลสภาวะแวดล้อมที่ส่งผลต่อการฟอกจางสีในชุดการทดลองแบบแบทช์
- 1.2.3 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพและสภาวะการเดินระบบในการกำจัดสีด้วยเอนไซม์แลคเคสในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพการกำจัดสีด้วยเอนไซม์แลคเคสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง โดยมีขอบเขตของงานวิจัยดังนี้

- 1.3.1 แหล่งของเอนไซม์แลคเคสที่ใช้ ได้จากเชื้อเห็ดบด (*Lentinus polychrous* Lev.)
- 1.3.2 ตัวอย่างน้ำที่ใช้ในการศึกษาจะเตรียมจากการใช้สีผสม ละลายในน้ำให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ
- 1.3.3 สีผสมที่ใช้ในการทดลองแบบแบทช์มี 3 ชนิด คือ สีผสมอะโซ สีผสมแอนทราควิโนน และสีผสมอินดิโกยด์ สำหรับการทดลองในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง จะเลือกสีผสมเพียงชนิดเดียว
- 1.3.4 เยื่อกรองที่ใช้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นเยื่อกรองแบบอัลตรา (Ultrafiltration Membrane, UF)
- 1.3.5 อุณหภูมิที่ใช้ในการดำเนินการทดลองเป็นอุณหภูมิห้อง
- 1.3.6 พารามิเตอร์ที่ทำการวิเคราะห์สำหรับการทดลองแบบแบทช์ คือ กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ค่าการดูดกลืนแสง และพารามิเตอร์ที่ทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมสำหรับการทดลองในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง คือ ฟลักซ์ของเพอมีเอท
- 1.3.7 การทดสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ใช้ 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid); ABTS

1.4 สมมุติฐานของการวิจัย

- 1.4.1 ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่แตกต่าง การทำงานของแลคเคสจะแตกต่างกัน ทำให้ผลการกำจัดสีต่างกัน
- 1.4.2 เยื่อกรองอัลตราสามารถกักกันแลคเคสในระบบได้ ในขณะที่การกักกันสีผสมทำได้น้อย
- 1.4.3 เสถียรภาพการทำงานของแลคเคสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองลดลงเมื่อระยะเวลาในการดำเนิน ระบบเพิ่มขึ้น
- 1.4.4 การกำจัดสีของแลคเคสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองให้ประสิทธิภาพการกำจัดที่ดีกว่าแบบแบทช์

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.5.1 ลดปัญหามลพิษของสีผสมที่จะแพร่กระจายสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ
- 1.5.2 ผลการศึกษาการกำจัดสีด้วยเอนไซม์แลคเคส สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน เพื่อจะนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับระบบบำบัดน้ำเสียด้วยวิธีอื่นได้
- 1.5.3 สามารถนำผลจากการวิจัยไปประยุกต์ใช้กับการลดสีในน้ำทิ้งจากการย้อมผ้าในชุมชน
- 1.5.4 ผลการศึกษาการทำงานของแลคเคสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองสำหรับการกำจัดสีผสมนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงกับการบำบัดน้ำเสียจากสีผสมของอุตสาหกรรมสิ่งทอ
- 1.5.5 สามารถนำมาใช้เป็นระบบต้นแบบ และประยุกต์ใช้กับระบบบำบัดน้ำเสียของอุตสาหกรรมการผลิตเยื่อกระดาษและกระดาษ อุตสาหกรรมพลาสติก หรืออุตสาหกรรมอื่นๆที่มีการปนเปื้อนของสีได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การนำเอนไซม์แลคเคสที่ยาบสกัดจาก *Lentinus polychrous* Lev. มาใช้ร่วมกับชุดทดลองถึงปฏิกิริยาชีวภาพเยื่อกรองเพื่อศึกษาถึงความสามารถในการกำจัดสีย้อมที่ปนเปื้อนในน้ำนั้น จำเป็นต้องมีการรวบรวมและศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับ สีย้อม การจำแนกสีย้อม เอนไซม์แลคเคส แหล่งของเอนไซม์แลคเคส การทำงานของเอนไซม์แลคเคส กระบวนการเยื่อกรอง ปัจจัยที่ส่งผลต่อการกรอง และถึงปฏิกิริยาชีวภาพเยื่อกรอง โดยรายละเอียดของหัวข้อดังกล่าวมีดังต่อไปนี้

2.1 สีย้อม

เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างซับซ้อน นิยมใช้ในอุตสาหกรรมย้อมผ้า ผลิตภัณฑ์พลาสติก สีย้อมที่นิยมใช้ในปัจจุบันเป็นสีย้อมสังเคราะห์ได้มาจากน้ำมันปิโตรเลียมหรือถ่านหิน โดยโมเลกุลของสีย้อมประกอบด้วยองค์ประกอบ 2 ส่วน คือ

2.1.1 Dye Chromophore ส่วนนี้ จะประกอบด้วยพันธะคู่ และส่วนที่ทำให้เกิดสีในสีย้อม มักเป็นสารประกอบอินทรีย์พวกวงแหวน กับพันธะคู่ เช่น $-N=N-$, $-NO_2$, $-C=O$ เป็นตัวรับอิเล็กตรอน เมื่อโมเลกุลของสีย้อมถูกกระทบโครงสร้างจะเกิดการสั่น เนื่องจากการดูดกลืนคลื่นแสงบางความยาวคลื่นไป เป็นผลให้เกิดการเห็นสีตามช่วงความยาวคลื่นที่ไม่ถูกดูดกลืน

2.1.2 Dye Functional Group ส่วนนี้จะก่อให้เกิดพันธะระหว่างโมเลกุลสีกับเส้นใย ทำให้เกิดการยึดติดกันขึ้น ด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent Bond) พันธะไอออนิก (Ionic Bond) พันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond) แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals' forces) หรือโดยการซึมซับเอาอนุภาคคอลลอยด์ของโมเลกุลสีเข้าไปไว้ในเส้นใย โครงสร้างส่วนนี้จะประกอบไปด้วยวงแหวนเบนซีน ที่มีกลุ่มอะตอมที่ไวต่อปฏิกิริยาติดอยู่ เช่น $-SO_3$, $-NH_2$, $-NR_2$, $-OH$, $-OR$, $-COOH$

สีย้อมมีลักษณะเป็นผลึกหรือผงละเอียด สีย้อมบางชนิดละลายน้ำได้ บางชนิดจะไม่สามารถละลายน้ำ แต่จะละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ เมื่อนำสีย้อมไปใช้ในกระบวนการย้อมจะทำให้โมเลกุลของสีย้อมซึมผ่านเข้าไปในโมเลกุลของเส้นใยโดยจะทำลายโครงสร้างผลึกของวัตถุนั้นชั่วคราว และสร้างพันธะกับเส้นใยที่ต้องการย้อมโดยตรง สีที่เห็นจากสีย้อมนั้นเกิดจากอิเล็กตรอนในพันธะคู่ซึ่งอยู่ในโมเลกุลของสีย้อมนั้นมีความสามารถดูดกลืนพลังงานในช่วงสเปกตรัมต่างกัน พลังงานแสงที่สายตามองเห็นจะมีความยาวคลื่นช่วง 400 – 700 นาโนเมตร สีย้อมที่มีโครงสร้างทางโมเลกุลต่างกันทั้งในรูปร่างและขนาดจะมีผลต่อการติดสี เช่น ถ้าโมเลกุลของสีย้อมมีขนาดเล็กและยาว จะสามารถผ่านเข้าไปในช่องว่างของเส้นใยได้มากทำให้ติดสีย้อมได้ดีขึ้น ถ้าโมเลกุลของสีย้อมแบนหรือมีความกว้างมากกว่าความยาวจะทำให้การติดสีมีความคงทนสูงมากขึ้น

2.2 การจำแนกสีย้อม

2.2.1 การจำแนกประเภทของสีย้อมตามโครงสร้างทางเคมี

จะพิจารณาจากโครโมฟอร์ที่ประกอบอยู่ในโมเลกุลของสีย้อม โครงสร้างที่สำคัญได้แก่

2.2.1.1 สีย้อมอะโซ (Azo Dyes) คือ สีย้อมที่มีกลุ่มอะโซ ($N=N$) หนึ่งกลุ่มหรือมากกว่าทำหน้าที่เป็นโครโมฟอร์อยู่ในโครงสร้างของโมเลกุล สีย้อมกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่ใหญ่ และมีความสำคัญมากที่สุด โดยครอบคลุมถึงร้อยละ 50 ของสีย้อมที่ใช้ทั้งหมดคุณลักษณะที่สำคัญของสีย้อมในกลุ่มนี้คือ มีสีให้เลือกครบทุกเฉด แต่โดยทั่วไป จะมีความสำคัญโดยเฉพาะในช่วงของสีเหลือง แสด แดง น้ำตาล และดำ มีกรรมวิธีการสังเคราะห์ที่ง่าย มีความสว่างสดใส และความคงทนต่อแสงอยู่ในเกณฑ์ปานกลางถึงดี ราคาไม่แพง เมื่อน้ำเสียที่มีสีย้อมอะโซอยู่ในสถานะแอนไอออนิก จุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกาศจะสามารถย่อยสลายสารอินทรีย์และกำจัดสีในน้ำเสียได้ โดยย่อยสลายสารอินทรีย์ในโตรเจน สารอินทรีย์คาร์บอน ให้กลายเป็นแอมโมเนีย และ ก๊าซต่างๆ และย่อยสลายสารประกอบอะโซ ที่ตำแหน่งพันธะอะโซ ให้กลายเป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กลง เช่น สารประกอบอะโรมาติกเอมีน ซึ่งเป็นสารพิษ โดยในกระบวนการนี้สีย้อมอะโซจะเป็นตัวรับอิเล็กตรอนขั้นสุดท้ายในกระบวนการหายใจของจุลินทรีย์ และเกิดการรื้อดักจับและการแตกของพันธะอะโซซึ่งทำให้สีลดลงได้

2.2.1.2 สีย้อมแอนทราควิโนน (Anthraquinone Dyes) เป็นสีย้อมที่มีโครงสร้างของแอนทราควิโนนเป็นโครงสร้างหลักอยู่ในโมเลกุล สีย้อมกลุ่มนี้มีความสำคัญเป็นอันดับสอง รองจากอะโซ ครอบคลุมประมาณร้อยละ 25 ของสีย้อมทั้งหมด เป็นสีที่มีความสว่างสดใสดี และมีความคงทนต่อแสงอยู่ในเกณฑ์ดี แต่ความเข้มของสีน้อยกว่าอะโซ และมีราคาแพงกว่า

2.2.1.3 สีย้อมไตรฟีนิลมีเทน (Triphenylmethane Dyes) สีย้อมกลุ่มนี้มีความสว่างสดใสมาก แต่สมบัติในด้านความคงทนต่อแสงไม่ดี

2.2.1.4 สีย้อมซัลเฟอร์ (Sulphur Dyes) เป็นสีย้อมที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบอยู่ในโครงสร้างของโมเลกุล สีย้อมกลุ่มนี้ มีเป็นสีที่มีราคาถูก นิยมใช้ย้อมสีทึบ เช่น สีน้ำตาล ดำ และน้ำเงิน ราคาถูก นิยมใช้ย้อมสีทึบๆ ส่วนใหญ่ไม่ละลายน้ำ บางตัวละลายได้แต่ต้องละลายในด่างโซเดียมซัลไฟด์

2.2.1.5 สีย้อมอินดิโกอยด์ (Indigoid Dyes) เป็นสีที่มีโครงสร้างของอินดิโกตินซึ่งเป็นโครงสร้างหลักอยู่ในโมเลกุล

2.2.2 การจำแนกประเภทของสีย้อมตามการนำไปใช้

การจำแนกสีย้อมที่นิยมมาก คือ การจำแนกสีย้อมตามการนำไปใช้ โดยจะขึ้นกับความสามารถในการละลายน้ำของสี การยิดเกาะกับเส้นใย และสถานะโมเลกุลของสีย้อม ทำให้สีมีความคงทนต่อการซัก แสงและต่อความร้อนที่ต่างกัน ซึ่งในกลุ่มโรงงานอุตสาหกรรมได้จำแนกสีย้อมตามวิธีใช้ออกเป็น 11 ประเภท คือ (1) สีแอซิด (2) สีไดเรกต์ (3) สีเบสิค (4) สีดิสเพอร์ส (5) สีรีแอกทีฟ (6) สีอะโซอิก (7) สีแว็ต (8) สีมอร์แดนท์ (9) สีซัลเฟอร์ (10) สีออกซิเดชั่น และ (11) สีอินเกรน โดยที่สีย้อมแต่ละประเภทจะมีสูตรโครงสร้างทางเคมี สมบัติของสีย้อม ตลอดจนวิธีใช้ที่แตกต่างกันไป ดังนั้นการเลือกใช้สีย้อมจึงมีความสำคัญอย่างมากในการย้อม

นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกประเภทสีย้อมตามการแตกตัวให้ประจุ ชนิดเส้นใยที่ใช้ย้อม การจำแนกตามหมู่ช่วยละลาย และลักษณะสีที่มองเห็น

2.3 แหล่งของเอนไซม์แลคเคส (Source of Laccase)

เอนไซม์ชนิดนี้พบใน พืชชั้นสูง แมลงบางชนิด และเชื้อรา (Riva, 2006; Sadhasivam et al., 2008) โดยเฉพาะจากพวกไวท์รอต (white-rot) เป็นราที่ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตและลิกนินในเนื้อไม้ได้เร็วและสมบูรณ์ แสดงให้เห็นว่าร่าในกลุ่มนี้ผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโนไลติกได้ดี (ligninolytic enzyme) เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ แลคเคส (Laccase), แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase), ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase) เป็นต้น อย่างไรก็ตามแลคเคสเป็นเอนไซม์ที่ได้รับความนิยมมากกว่าเอนไซม์ตัวอื่นในกลุ่มลิกนินโนไลติก เนื่องจากสามารถออกซิไดส์โดยใช้ออกซิเจน ในขณะที่กลุ่มเปอร์ออกซิเดสจะอาศัยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นโคแฟกเตอร์ และมีความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นมากกว่า เอนไซม์นี้เป็นได้ทั้ง extra- และ intracellular enzyme ขึ้นอยู่กับแหล่งกำเนิดที่พบ

แลคเคสถูกศึกษามากในกลุ่มเชื้อรา (Couto and Toca-Herrera, 2007; Wesenberg et al., 2003) เนื่องจากให้ปริมาณผลผลิตที่สูง ใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสั้นกว่าพืชและแมลง จักกับสารตั้งต้นหลากหลายชนิดสามารถกำจัดสีย้อมได้ในหลายกลุ่ม เช่น แลคเคสจาก *Panus rudis* 0.016 µg/ml สามารถกำจัดสีย้อมกลุ่มแอนทราควิโนนได้ 74% ใน 30 นาที สีกุ่มอะโซและอินดิโกคาไมด์ ได้ 26 และ 12% ตามลำดับ ใน 1 ชั่วโมง (Zhang et al., 2006) แลคเคสจาก *Cerrena unicolor* ถูกนำมาใช้ย่อยสลายสีย้อมในกลุ่มส้อมโซและแอนทราควิโนน (Michniewicz et al., 2008) *Cyathus bulleri* ผลิตแลคเคส และ ถูกนำมาใช้ในการกำจัดสีย้อมเบสิกและสีแอซิด (Chhabra et al., 2009) ส่วนใหญ่มวลโมเลกุลของแลคเคสที่พบในกลุ่มเชื้อรามีขนาด 59-110 kDa (Wesenberg et al., 2003) และมีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ 10-45 % ทำให้เสถียรภาพของเอนไซม์เพิ่มขึ้น (Claus, 2004) ปัจจุบันแลคเคสยังพบในโปรคาริโอตเซลล์พวกแบคทีเรีย เช่น *Klebsiella pneumoniae* (Wong and Yuen, 1996), *Streptomyces psammoticus* (Niladevi and Prema, 2008), *Bacillus subtilis* (Wang et al., 2008) และ *Pseudomonas desmolyticum* (Kalme et al., 2009)

ในการศึกษาครั้งนี้เลือกแหล่งเอนไซม์จาก *Lentinus polychrous* Lev. ซึ่งรู้จักกันในชื่อของเห็ดขอนดำ เห็ดลม เห็ดกระด้าง หรือเห็ดบด พบและนิยมนำมาบริโภคมากในเขตภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ เป็นเชื้อราในกลุ่มไวท์รอตชนิดที่สร้างเอนไซม์แลคเคสแล้วขับออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ลักษณะของเห็ดชนิดนี้ประกอบด้วย

2.3.1 หมวกดอก (Cap หรือ Pileus) หมวกดอกมีสีน้ำตาลหรือน้ำตาลอมเทาอ่อน ลักษณะรูปทรงคล้ายแตร บริเวณกลางหมวกดอกบุ่มลึกลงเป็นทรงกรวย หมวกดอกเหนียว ฉีกขาดยาก ผิวหมวกดอกขรุขระ มีขนเล็กๆ ปกคลุมทั่วผิวหมวกดอก ขอบหมวกดอกแผ่กางออก บางดอกขอบหมวกดอกงอและหยักเป็นคลื่น บางดอกขอบหมวกดอกฉีกขาด ขนาดหมวกดอกกว้าง 4.0-6.0 เซนติเมตร ยาว 4.0-7.0 เซนติเมตร

2.3.2 ครีบดอก (Gill หรือ Lamella) ครีบดอกมีสีน้ำตาลอ่อนหรือน้ำตาลอมดำ ลักษณะครีบเรียงตัวกันถี่ ลู่ลงไปตามก้านดอก ครีบดอกยึดติดเป็นแผ่นเดียวกับก้านดอก

2.3.3 ก้านดอก (Stalk หรือ Stipe) ก้านดอกมีสีน้ำตาลอมเหลืองหรือน้ำตาลอมดำ ก้านดอกมีรูปทรงเป็นทรงกระบอก ภายในก้านดอกตัน เนื้อภายในก้านดอกมีสีขาวหรือขาวอมน้ำตาลอ่อน มีลักษณะเป็นเส้นใยเรียงตัวตามยาวอัดตัวแน่น ก้านดอกเหนียวและฉีกขาดยาก บริเวณโคนก้านดอกโป่งพองออกเล็กน้อย ขนาดก้านดอก กว้าง 0.5-0.8 เซนติเมตร ยาว 2.5-3.5 เซนติเมตร

2.3.4 สปอร์ (Basidiospore) สปอร์มีลักษณะเป็นรูปวงรี ผิวสปอร์เรียบ ขนาดสปอร์มีขนาด 2.7–4.0 × 4.0-5.4 ไมโครเมตร สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในน้ำกลั่นใสไม่มีสี ไม่สามารถทำพิมพ์สปอร์ได้

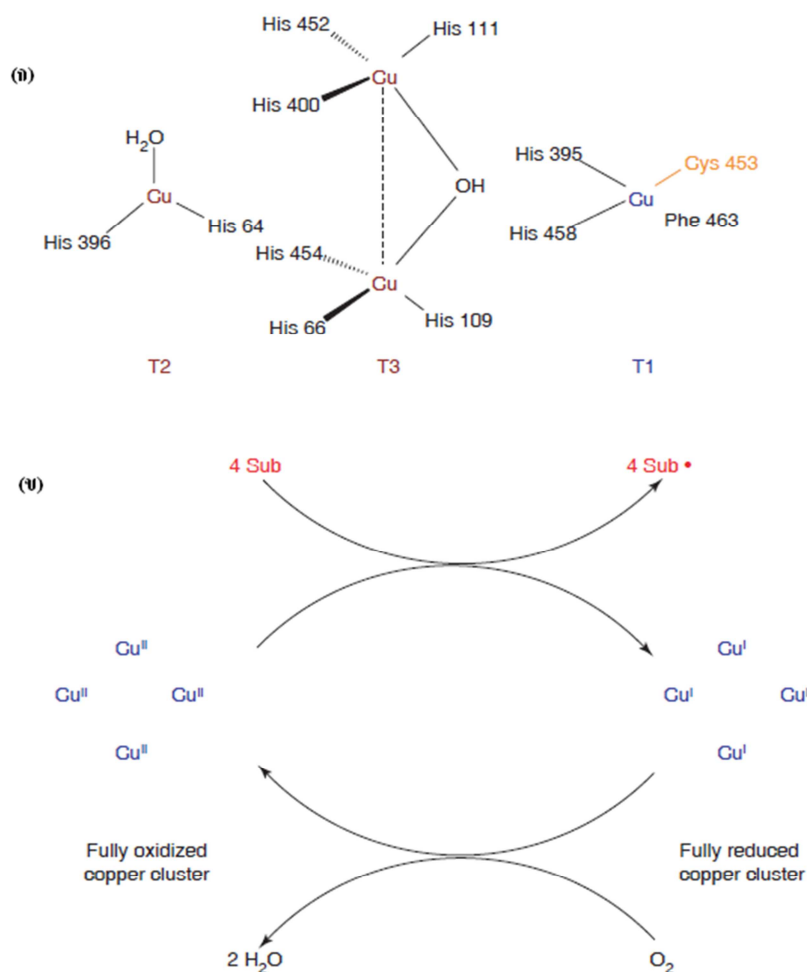
2.4 การทำงานของแลคเคส

แลคเคสเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม benzenediol: oxygen oxidoreductase (EC 1.10.3.2) ประกอบด้วยไกลโคโปรตีนและส่วนมากพบว่ามีโมเลกุลของคอปเปอร์ประมาณ 4 โมเลกุลเป็นองค์ประกอบโดยจับกับกรดอะมิโนซิสเตอีน 1 โมเลกุลและกรดอะมิโนฮิสทีดีน 10 โมเลกุล (ดังรูปที่ 2.1) บางครั้งจึงเรียกเอนไซม์ชนิดนี้ว่า blue copper oxidase (Riva, 2006)

หน้าที่ของแลคเคสคือจะเร่งปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันในสารตั้งต้น และเนื่องจากแลคเคสมีความจำเพาะเจาะจงต่อวงแหวนอะโรมาติก (aromatic rings) น้อยจึงสามารถออกซิไดส์สารตั้งต้นได้หลากหลายชนิด (D'Annibale et al., 2000; Rodríguez Couto and Toca Herrera, 2006; Rosconi et al., 2005) เช่น สารอินทรีย์ (organic substance), สารอนินทรีย์ (inorganic substance), ไดฟีนอล (diphenol), โพลีฟีนอล (polyphenols), ไดเอไมด์ (diamines), อะโรมาติกเอไมด์ (aromatic amines) และ แอสคอเบท (ascorbate) (Kalme et al., 2009; Rodríguez Couto and Toca Herrera, 2006) โดยอิเล็กตรอนในสารตั้งต้นจะถูกขนย้ายไปยังคอปเปอร์ในโมเลกุลของเอนไซม์ จากนั้นโมเลกุลของออกซิเจนจะรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายไปเป็นน้ำ (Saito et al., 2003)

เอนไซม์แลคเคสสามารถทำปฏิกิริยาออกซิเดชันร่วมกับสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ร่วมกับการเกิดปฏิกิริยารีดักชันกับโมเลกุลของออกซิเจนในน้ำ น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนหน่วยย่อย (โมโนเมอร์) อยู่ในช่วง 50 ถึง 100 kDa นอกจากนั้นยังพบว่าแลคเคสจากเชื้อรา มีการยึดเกาะกับคาร์โบไฮเดรตด้วยพันธะโคเวเลนต์ และอาจทำให้เอนไซม์มีความเสถียรสูงขึ้น สำหรับตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์แลคเคส คือ ทองแดง 4 อะตอมต่อหนึ่งหน่วยโปรตีนที่ทำปฏิกิริยา หรืออาจเพิ่มจำนวนเพื่อเพิ่มการทำงานของเอนไซม์

แลคเคสมีความสามารถในการออกซิไดส์สารประกอบในกลุ่ม phenolic ได้ และสามารถออกซิไดส์โมเลกุลได้มากขึ้นถ้าใช้สารตัวกลาง (mediator) ร่วมในกลไกการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งสารตัวกลางเป็นสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ถูกออกซิไดส์ได้ง่ายโดยแลคเคส ทำให้เกิดเป็น reductive cationic radicals ที่ไม่เสถียร ซึ่งสามารถออกซิไดซ์โมเลกุลของสารประกอบเชิงซ้อนในปฏิกิริยา ก่อนจะกลับไปอยู่ในภาวะปกติ และอิเล็กตรอนที่แลคเคสได้รับมาจะเคลื่อนกลับไปให้ออกซิเจนและเกิดการรวมตัวเป็นน้ำ



รูปที่ 2.1 แสดง (ก) โครงสร้างของแลคเคส และ (ข) การเกิดปฏิกิริยาระหว่างสับสเตรทกับเอนไซม์และเกิดน้ำ 2 โมเลกุลจากการรีดักชันโมเลกุลของออกซิเจน (Riva, 2006)

สารตัวกลาง

ระบบตัวกลางแลคเคส (Laccases Mediator System : LMS) ที่ส่งเสริมในแลคเคสสามารถทำงานได้ดีขึ้น พบว่ามีการใช้ในปริมาณมาก แต่ต้นทุนของสารตัวกลางมีราคาสูง และขาดความรู้ในการเกิดสารประกอบชนิดใหม่ๆ หรืออนุพันธ์ที่อาจเป็นพิษ ดังนั้นจึงมีการศึกษาการใช้สารตัวกลางที่มีในธรรมชาติ ซึ่งมีข้อดีในเรื่องต้นทุน และไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม พบรายงานของ Camarero และคณะ ในปี 2005 พบว่าการใช้อนุพันธ์ลิกลินของฟีนอลต่างๆ (เช่น syringaldehyde และ acetosyringone) ในการส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์แลคเคส ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนั้นยังพบว่ามีการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์แลคเคสโดยการใช้สารตัวกลางสังเคราะห์ ในการกำจัดสีย้อมชนิดต่างๆ เพื่อช่วยในการขนย้ายอิเล็กตรอนระหว่างเอนไซม์แลคเคส และสารตั้งต้น หรือสีย้อม ตัวอย่างสารที่มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาการทำงานมีหลายชนิด เช่น N-hydroxybenzotriazole (HBT), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), syringaldehyde จากรายงานการศึกษาส่วนใหญ่มุ่ง

ความสำคัญที่ใช้ ABTS เป็นสารตัวมัลติช่วยเร่งปฏิกิริยาการทำงานของแลคเคส ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความเสถียรของโอโซนิกและการรีดอกซ์ในปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์แลคเคส อย่างไรก็ตามการกลไกของการทำงานระหว่าง ABTS ร่วมกับแลคเคสยังไม่ชัดเจน แต่มีหลักฐานของการทำงานของ ABTS ที่แสดงให้เห็นถึงการทำหน้าที่กระตุ้น หรือ ตัวร่วมปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอนไซม์แลคเคส ดังนั้นจึงอธิบายได้ว่า ABTS ขนส่งหนึ่งอิเล็กตรอนให้กับเอนไซม์เพื่อกระตุ้นการทำงาน

2.5 การประยุกต์ใช้แลคเคส

ในอดีตจนถึงปัจจุบัน พบว่ามีการใช้แลคเคสในอุตสาหกรรมสิ่งทอเป็นจำนวนมาก ทั้งในด้านการกำจัดสีในน้ำทิ้ง การฟอกขาว การสังเคราะห์สี และการดัดแปรผิวหน้าของผ้า สำหรับอุตสาหกรรมสิ่งทอ พบว่ามีการใช้งานแลคเคสครั้งแรกในกระบวนการตกแต่งผ้ายีนส์ จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้ปัจจุบันแลคเคสได้รับความสนใจและถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างมาก ในด้านสิ่งแวดล้อมและทางเทคโนโลยีชีวภาพและด้านอื่นๆ เช่น

2.5.1 อุตสาหกรรมอาหาร

การนำแลคเคสมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารโดยการประยุกต์เอนไซม์เข้ากับกระบวนการผลิต เพื่อที่จะเพิ่มหรือปรับปรุงสีของอาหาร หรือเครื่องดื่ม และกำจัดสารประกอบฟีนอลิกที่ทำให้เกิดสีน้ำตาลในอาหาร และการเกิดความขุ่นในน้ำผลไม้ เปียร์ และไวน์ (Rodríguez Couto and Toca Herrera, 2006) นอกจากนั้น เอนไซม์แลคเคสยังใช้ในการวิเคราะห์กรดแอสคอร์บิก น้ำตาลจากหัวบีทที่ใช้ทำเจล การทำเบเกอรี่ และการบำบัดน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันมะกอก

2.5.2 อุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษ

เอนไซม์แลคเคสสามารถทำลายโครงสร้างของลิกนินโดยทำลายสายโพลีเมอร์ และกำจัดลิกนินในเนื้อไม้ และเยื่อกระดาษต่างๆ โดยไม่ใช้สารคลอรีน (Vikineswary *et al.*, 2006) ซึ่งช่วยลดการใช้สารเคมี และทำให้พื้นผิวของไฟเบอร์มีความเป็นระเบียบของโครงสร้างเส้นใย สามารถนำเส้นใยกลับมาใช้ใหม่ได้ (Widsten and Kandelbauer, 2008)

2.5.3 อุตสาหกรรมเส้นใย

ในการใช้สารมัลติช่วยเร่งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์แลคเคส โดยการประยุกต์ใช้ในการฟอกจางสีในอุตสาหกรรมเส้นใยและสีย้อม (Kunamneni *et al.*, 2008) ส่วนใหญ่แล้วจะทำการบำบัดน้ำเสียที่ปนมากับน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมเส้นใย ดังนั้นการพัฒนากระบวนการใช้เอนไซม์แลคเคสจึงขึ้นอยู่กับศักยภาพของเอนไซม์ในการสลายสีย้อม โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสี รวมทั้งสีสังเคราะห์ต่างๆที่ใช้ในอุตสาหกรรม (Rodríguez Couto and Toca Herrera, 2006)

2.5.4 การบำบัดสารพิษโดยวิธีชีวภาพ

เอนไซม์แลคเคสเกี่ยวข้องกับกระบวนการกำจัดสารพิษต่างๆ จัดเป็นการย่อยสลายโดยวิธีชีวภาพ ซึ่งการทำงานจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติการเร่งปฏิกิริยา โดยสารประกอบในกลุ่มที่เป็นสาร xenobiotic ที่ปนเปื้อนในดินและสามารถสลายได้โดยเอนไซม์แลคเคส (Rodriguez and Toca, 2006) นอกจากนั้นสารประกอบ polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) ซึ่งเกิดขึ้นจากกระบวนการปิโตรเคมี (Anastasi *et al.*,

2009) และพบว่าสาร PAHs หลายชนิดทำให้เกิดพิษต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต การกลายพันธุ์ และการเกิดมะเร็ง ส่งผลเสียต่อสุขภาพของมนุษย์ (Bamforth and Singleton, 2005)

2.5.5 การประยุกต์ในด้านต่างๆ

ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้แลคเคสในการเร่งปฏิกิริยาของสารประกอบอินทรีย์ (Mayer and Staples, 2002) การทำงานของเอนไซม์ในการสังเคราะห์โพลิเมอร์ หรือการสังเคราะห์สารประกอบ (Akta and Tanyolac, 2003) มีการนำแลคเคสมาประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์ โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของ functional groups และการเกิดปฏิกิริยาควบ (coupling) ของสารประกอบฟินอล และสเตียรอยด์ หรือสารที่ออกฤทธิ์ทางยา (ยาชา, ยาลดการอักเสบ, ยาปฏิชีวนะ และยากดประสาท) โดยการสร้างพันธะระหว่างอะตอมของคาร์บอนและไนโตรเจน และในการสังเคราะห์สารประกอบธรรมชาติ และอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง นอกจากนี้แลคเคสยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจจับชีวภาพ (biosensors) หรือ bioreporter (Sazmoki *et al.*, 2009) และประยุกต์ใช้ในการทำเซลล์พลังงาน (fuel cell) ซึ่งเป็นที่น่าสนใจสำหรับการประยุกต์ใช้ทางด้านการแพทย์ในการเป็นแหล่งพลังงานที่ปลูกถ่ายในมนุษย์ (Heller, 2004)

2.6 กระบวนการเยื่อกรอง (Membrane Process)

ระบบเยื่อกรองได้รับความนิยมและถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรม เนื่องจากเป็นระบบที่ไม่ต้องใช้สารเคมี ใช้พลังงานน้อย ง่ายต่อการนำไปใช้ เป็นอุปกรณ์ที่ไม่มีความซับซ้อน ระบบเยื่อกรองเป็นการใช้เยื่อเลือกผ่านเพื่อใช้ในการแยกสาร อาศัยหลักความแตกต่างทั้งทางกายภาพและทางเคมีระหว่างเยื่อกรองกับสารนั้น โดยใช้แรงดันผ่านเยื่อกรอง (Transmembrane pressure) เป็นแรงขับเคลื่อนของไหลให้ซึมผ่านเยื่อกรอง สารละลายที่ผ่านระบบเยื่อกรองเรียกว่าเพอเมต (Permeate) ส่วนสารละลายที่ไม่สามารถไหลผ่านระบบเยื่อกรองจะเรียกกรีเทนเทจ (Retentate) ทำให้เกิดสารละลายเข้มข้นบริเวณผิวเยื่อกรอง ความสามารถในการกักกันสารขึ้นกับ ชนิดของเยื่อกรอง แรงขับเคลื่อนที่ใช้ ขนาดโมเลกุลของสาร ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้สามารถนำมาจัดประเภทของเยื่อกรองได้เป็นไมโครฟิลเตรชัน (Microfiltration : MF) อัลตราฟิวเตรชัน (Ultrafiltration : UF) นาโนฟิลเตรชัน (Nanofiltration : NF) และออสโมซิสผกผัน (Reverse Osmosis : RO)

ไมโครฟิลเตรชัน (Microfiltration; MF) เป็นกระบวนการที่ใช้เยื่อกรองที่มีแผ่นรูพรุนค่อนข้างใหญ่ ขนาด 50-1000 nm สำหรับแยกโมเลกุลใหญ่ ๆ เช่น สารแขวนลอย หรืออนุภาคเล็ก ๆ ออกจากของเหลว แรงขับเคลื่อนที่ใช้อยู่ระหว่าง 100-500 kPa หรือ 1-5 atm ใช้สำหรับการกำจัดสารแขวนลอยที่เป็นสาเหตุความขุ่นของน้ำ แบคทีเรียทั่วไป ชนิดของเยื่อกรองที่ใช้กันโดยทั่วไป เช่น cellulose acetate, polysulfone และ polystyrene เป็นต้น การใช้งานเหมาะสมสำหรับใช้ในการบำบัดน้ำทิ้ง อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม และเทคโนโลยีชีวภาพอาจรวมกับการะบวนการหมักเพื่อแยกเซลล์จากผลิตภัณฑ์ เป็นต้น

อัลตราฟิวเตรชัน (Ultrafiltration; UF) เป็นกระบวนการที่ใช้เยื่อกรองขนาดรูพรุนขนาดเล็ก (Micro Porous) มีขนาดรูพรุนประมาณ 5-100 nm แรงขับเคลื่อนที่ใช้อยู่ระหว่าง 100-800 kPa หรือ 1-8 atm ใช้สำหรับแยกอนุภาคคอลลอยด์ แบคทีเรีย ไวรัส ออกจากน้ำและสารประกอบอินทรีย์ที่มีโมเลกุลใหญ่ เช่น

โพรตีน ชนิดของเยื่อกรองที่ใช้กันโดยทั่วไป เช่น cellulose acetate, polyacrylonitrile และ polyester เป็นต้น การใช้งานเหมาะสำหรับการแยกหรือเพิ่มความเข้มข้นโพรตีน การกำจัดคอลอยด์ การบำบัดน้ำทิ้ง ทำน้ำให้บริสุทธิ์ การทำน้ำผลไม้ให้ใส เป็นต้น

นาโนฟิลเตรชัน (Nanofiltration; NF) เป็นกระบวนการที่ใช้เยื่อกรองขนาดรูพรุน 2-5 nm ซึ่งใกล้เคียงกับออสโมซิสผันกลับมาก คือมีผลต่างของความดันเป็นแรงขับเคลื่อนในการแยกตัวถูกละลายที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 1,000 ดาลตัน ออกจากสารละลายตัวอย่าง เช่น น้ำตาล สารอินทรีย์น้ำหนักโมเลกุลต่ำ โดยความดันที่ใช้ในการป้อนสารละลายอยู่ระหว่าง 1-2 MPa หรือ 10-20 atm มีความสามารถในการแยกไอออนบางชนิดและสารอินทรีย์ตามธรรมชาติ (Natural Organic Matter; NOM) ชนิดของเยื่อกรองที่ใช้กันโดยทั่วไป เช่น polymer organic compounds, aromatic polyimide และ polyvinyl alcohol เป็นต้น เยื่อกรองนาโนฟิลเตรชันส่วนมากเป็นเยื่อกรองเชิงประกอบซึ่งประกอบด้วยชั้นผิวที่มีโครงสร้างแน่นอยู่บนชั้นรองรับที่มีรูพรุนใหญ่กว่า มีความสามารถในการกักกันเกลือประจุเดียว (เช่น โซเดียมคลอไรด์) ต่ำกว่าออสโมซิสผันกลับอยู่ในช่วง 40-80%

ออสโมซิสผันกลับ (Reverse Osmosis; RO) กระบวนการนี้เรียกว่าไฮเพอร์ฟิวเตรชัน (Hyper Filtration) เป็นการแยกสารละลายโดยผลต่างความดันระหว่างเยื่อกรองเป็นแรงขับเคลื่อน เยื่อกรองออสโมซิสผันกลับมีความสามารถในการกักกันโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น เกลือ น้ำตาล (น้ำหนักโมเลกุล < 500 ดาลตันหรือมีขนาดประมาณ 0.1-1 nm) แต่ยอมให้น้ำผ่านได้ และเป็นเยื่อที่มีโครงสร้างแน่นหรือไม่มีรูพรุน การผ่านเยื่อกรองของสารเกิดจากความสามารถในการละลายและการแพร่ (Solution-diffusion) ในเยื่อกรอง ความดันที่ใช้ในการป้อนสารละลายอยู่ระหว่าง 1-10 MPa หรือ 10-100 atm การใช้งานที่สำคัญของกระบวนการนี้ คือการแยกเกลือจากน้ำกร่อย น้ำทะเล เพื่อผลิตน้ำจืด การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำผลไม้ การผลิตน้ำที่มีความบริสุทธิ์สูง ตลอดจนการบำบัดน้ำทิ้งที่มีโลหะเจือปน เช่น อุตสาหกรรมชุบเคลือบโลหะ เป็นต้น

2.6.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเยื่อกรอง

1) การสะสมความเข้มข้นสูง เป็นการสะสมของอนุภาคต่างๆที่บริเวณผิวของเยื่อกรอง จนมีความเข้มข้นที่สูงกว่าสารตัวอย่างหลายเท่า ส่งผลให้ค่าฟลักซ์ลดลง สามารถแก้ไขได้ด้วยการล้างเยื่อกรองด้วยสารเคมีหรือใช้แรงดันน้ำย้อนกลับให้สารเหล่านั้นหลุดจากผิวของเยื่อกรอง

2) อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดต่าง และสารออกซิไดซ์ โดยทั่วไปการใช้งานของเยื่อกรองจะดำเนินการในช่วงอุณหภูมิประมาณ 0-85 องศาเซลเซียส จึงไม่ควรทำการกรองในอุณหภูมิสูงเกินไป เพราะการกรองแบบอัลตราฟิวเตรชันและไมโครฟิวเตรชันที่ใช้ความดันต่ำจะทำให้อุณหภูมิไม่เกิน 100 องศาเซลเซียส ถึงแม้ว่าการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียสจะทำให้ฟลักซ์เพิ่มขึ้นร้อยละ 3-5 แต่อาจก่อให้เกิดความเสียหายแก่เยื่อกรองที่ผลิตจากสารอินทรีย์ เช่นเดียวกับค่าความเป็นกรดต่างและสารออกซิไดซ์

3) ความดัน การเพิ่มความดันจะส่งผลดีคือจะทำให้ค่าฟลักซ์ของเยื่อกรองเพิ่มขึ้น แต่ถ้าแรงดันมีมากเกินไปจะทำให้อนุภาคสารต่างๆที่สะสมอยู่บนเยื่อกรองเกิดการอัดตัวจนแน่น อาจส่งผลต่อโครงสร้างของเยื่อกรองหรือทำให้เยื่อกรองเกิดการฉีกขาดเสียหายได้

4) ความสกปรกของเยื่อกรอง การเกาะและสะสมของอนุภาคสารต่างๆบนเยื่อกรอง หรือระหว่างเยื่อกรอง จะทำให้การซึมผ่านของเพอมีเอทมีน้อย ต้องเพิ่มความดันในการดำเนินการ แก้ไขได้โดยการล้างทำความสะอาดเยื่อกรองด้วยสารเคมี

2.6.2 การทำความสะอาดเยื่อกรอง

เมื่อทำการเดินระบบจนถึงช่วงเวลาหนึ่ง ค่าฟลักซ์จะลดลง เพอมีเอทออกจากระบบได้น้อยซึ่งเป็นผลมาจากการเกิดการอุดตันของเยื่อกรอง จึงต้องทำความสะอาดเยื่อกรองเพื่อให้ระบบสามารถกลับมาทำงานอย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดิมและเพื่อยืดอายุการใช้งานของเยื่อกรองด้วย การทำความสะอาดเยื่อกรองแบ่งเป็น 2 วิธีหลักคือ วิธีทางกายภาพ (Physical Method) และวิธีทางเคมี (Chemical Method)

1) วิธีทางกายภาพ (Physical Method) เป็นการทำความสะอาดเยื่อกรองที่ใช้วิธีการเปลี่ยนแปลงสภาวะการทำงานของระบบโดยการล้างกลับทางหรือล้างย้อนเพื่อให้อนุภาคต่างๆที่สะสมอยู่บนเยื่อกรองหลุดออกไป โดยในการล้างอาจมีการเพิ่มอัตราการไหล เพื่อเพิ่มแรงเฉือนที่ผิวของเยื่อกรอง วิธีนี้จะช่วยลดการสะสมและการอุดตันของเยื่อกรองได้เพียงส่วนหนึ่งเท่านั้น ไม่สามารถกำจัดได้หมดจึงต้องใช้ในการกำจัดโดยใช้สารเคมีอีกครั้ง

2) วิธีทางเคมี (Chemical Method) การใช้สารเคมีเป็นการทำให้อนุภาคสารที่อุดตันเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เช่น การพองตัว หดตัว หรือละลายแล้วหลุดออกจากเยื่อกรอง หรือการที่สารเคมีเข้าไปทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส หรือเกิดสารประกอบเชิงซ้อน สารเคมีที่ใช้คือ กรด เบส สารลดแรงตึงผิว หรือสารฆ่าเชื้อ ซึ่งในการเลือกสารเคมีมาใช้นั้นจะต้องคำนึงถึงชนิดของเยื่อกรองว่ามีความทนทานต่อสารเคมีที่จะใช้หรือไม่

การทำความสะอาดโดยใช้กรด โดยส่วนมากกรดจะไปทำความสะอาดตะกอนที่เกิดจากเกลือ เช่น เกลือของสารประกอบแคลเซียม และโลหะออกไซด์ กรดที่ใช้จะเป็นได้ทั้งกรดอินทรีย์หรือกรดอนินทรีย์ กรดที่นิยมนำมาใช้ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก กรดซัลฟูริก กรดไนตริก กรดซิตริก เป็นต้น

การทำความสะอาดโดยใช้ด่างจะใช้ในการกำจัดสารอินทรีย์ อนินทรีย์ คอลลอยด์ และซิลิกา สารที่นิยมใช้ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมไตรฟอสเฟต โซเดียมไฮโปคลอไรต์ เป็นต้น

การทำความสะอาดโดยใช้สารลดแรงตึงผิว สารชนิดนี้จะกำจัดการอุดตันที่เกิดจากไขมันและน้ำมัน ซึ่งสารลดแรงตึงผิวจะไปรวมตัวกับสารที่อุดตันบนเยื่อกรองทำให้เกิดเป็นไมเซลล์ที่มีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ โดยส่วนที่ชอบน้ำจะหันด้านที่มีขั้วเข้าหาน้ำทำให้สารที่อุดตันหลุดออกจากเยื่อกรอง สารลดแรงตึงผิวที่ใช้ล้างเยื่อกรองมีโครงสร้างทางเคมีที่หลากหลาย เช่น เป็นกลาง ประจุบวก ประจุลบ ตัวอย่างของสารลดแรงตึงผิวที่นำมาใช้ได้แก่ ซัลเฟต ฟอสเฟต และสารประกอบแอมโมเนีย เป็นต้น

การทำความสะอาดด้วยสารจับโลหะ สารจับโลหะประกอบไปด้วยตัวรับอิเล็กตรอน 2 อะตอม หรือมากกว่า ซึ่งจะไปทำให้เกิดการสร้างพันธะร่วมกับอะตอมเดี่ยวของโลหะ สารที่นิยมใช้ได้แก่ อีดีทีเอ (Ethylenediamine tetra Acetic Acid: EDTA) และซีเตรท เป็นต้น

การทำความสะอาดด้วยสารฆ่าเชื้อ จะนิยมใช้กับเยื่อกรองที่ไม่ทนความร้อนซึ่งไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ด้วยความร้อนหรือน้ำ สารที่นิยมใช้ได้แก่ สารไฮโปคลอไรต์

2.6.3 ค่าการกักกันสารของเยื่อกรอง

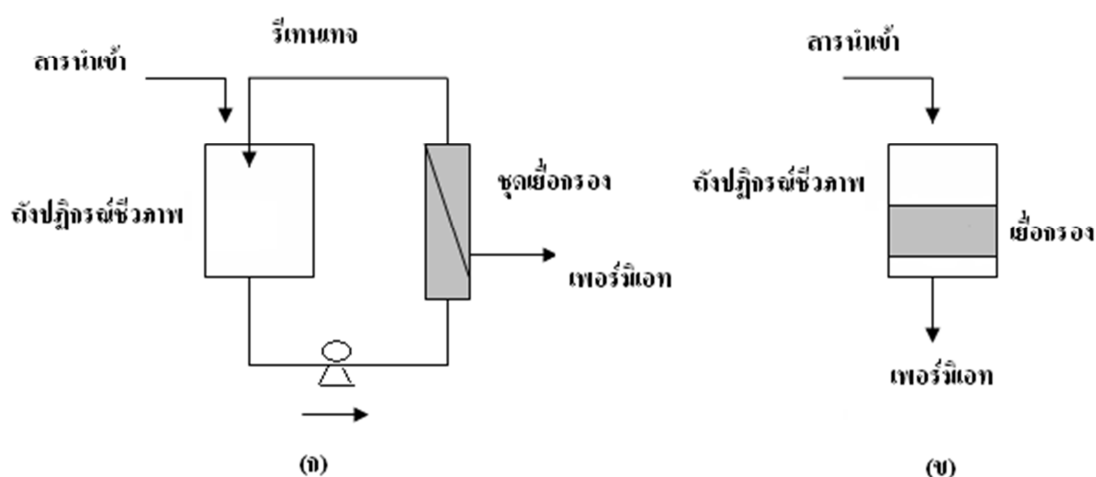
ค่าการกักกันสารของเยื่อกรองจะแสดงในรูปของเปอร์เซ็นต์รีเจคชัน (%Rejection) โดยหาจากความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารที่ถูกกักไว้ด้วยเยื่อกรองเทียบกับความเข้มข้นของสารละลายที่ป้อนเข้าระบบ

2.7 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง (Membrane Bioreactor; MBR)

เป็นระบบที่รวมเอาการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพซึ่งเกิดขึ้นในถังปฏิกรณ์ โดยอาศัยสารชีวภาพ เช่น จุลินทรีย์ เอนไซม์ เซลล์พืช หรือเซลล์สัตว์ มาใช้ร่วมกับการแยกสารด้วยเยื่อกรอง เมื่อระบบมีการเปลี่ยนแปลงเกิดผลิตภัณฑ์ขึ้น ขนาดที่แตกต่างระหว่างสารชีวภาพ สารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์จะถูกกักและถูกแยกออกด้วยเยื่อกรองโดยอาศัยแรงดันขับเคลื่อน (Lopez et al., 2002; Thomas and Murrer, 2001) สารชีวภาพที่ถูกกักสามารถถูกนำกลับมาใช้ในระบบได้อีกครั้ง สารชีวภาพที่แขวนลอยในถังปฏิกรณ์บางส่วนถูกดูดซึมที่ผิวเยื่อกรอง หรืออาจจับกับพื้นผิวของเยื่อกรองด้วยแรงวันเดอวาลส์ พันธะไอออนิก หรือพันธะโคเวเลนต์

2.7.1 รูปแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง

การใช้งานถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองโดยทั่วไปมี 2 รูปแบบ คือ แบบที่ 1 ชุดเยื่อกรองจะถูกต่อเข้ากับถังปฏิกรณ์ชีวภาพภายนอก (รูปที่ 2.2 (ก)) แบบที่ 2 เป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่เยื่อกรองถูกรวมไว้ในถังปฏิกรณ์ หรืออาจเรียกว่าถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบจมตัว (รูปที่ 2.2 (ข))

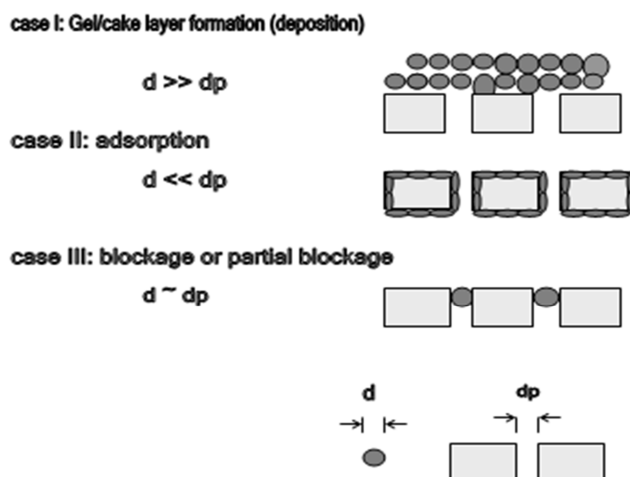


รูปที่ 2.2 รูปแบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง (ก) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเชื่อมต่อกับชุดเยื่อกรอง (ข) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีเยื่อกรองแบบจมตัว

2.7.2 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการทำงานของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง เช่น อุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจะทำให้ความหนืดของสารลดลง ทำให้สารสามารถไหลผ่านเยื่อกรองได้ง่ายขึ้น ฟลักซ์ของเพอร์มิเอทจะสูงขึ้น 3-4 % ทุกๆ 1 องศา แต่อุณหภูมิที่สูงขึ้นอาจส่งผลต่อการทำงานของสารชีวภาพในระบบได้ (Dina Afonso et al., 2004) ความเข้มข้นของสารสูง สามารถส่งผลต่อการทำงานของระบบเช่นกัน สารหรืออนุภาคจะถูกสะสมใกล้ผิวหน้าของเยื่อกรอง เกิดปรากฏการณ์ concentration polarization ทำให้ความเข้มข้นของสารที่ผิวหน้าสูงกว่าค่าเฉลี่ยของสารนั้นในระบบหลายเท่า เป็นผลให้ฟลักซ์ลดลง ค่าพีเอชและความแรงของประจุ จะส่งผลต่อโครงสร้างของสารชีวภาพโดยเฉพาะเอนไซม์ เช่นเอนไซม์ไลโซซามแสดงประจุบวกที่ค่าพีเอชต่ำ เมื่อเพิ่มพีเอชทำให้ประจุบวกของไลโซซามลดลง ส่งผลให้ repulsion effect ลดลง ค่าฟลักซ์เพิ่มขึ้น แต่ถ้าพีเอชต่ำไลโซซามจะแสดงประจุบวกเพิ่มขึ้นเกิดแรงกระทำระหว่างเอนไซม์กับพื้นผิวของเยื่อกรองที่เป็นประจุลบ เอนไซม์จะถูกดูดซับที่ผิวหน้าเยื่อกรอง ทำให้เกิดการอุดตันขึ้น (Muller et al., 2003) การเพิ่มแรงดันในการดำเนินระบบมากเกินไปจะทำให้โครงสร้างและอนุภาคสารต่างๆ ที่สะสมบริเวณผิวหน้าเยื่อกรองอัดตัวกันแน่น จนทำให้ค่าฟลักซ์ลดลง นอกจากนี้ปัญหาการอุดตันของเยื่อกรองก็เป็นปัจจัยสำคัญส่งผลต่อการทำงานของระบบเช่นกัน

การอุดตันของเยื่อกรอง เกิดจากการสะสมของสารหรืออนุภาคบนพื้นผิวหรือรูช่องว่างของเยื่อกรอง ทำให้อัตราการซึมผ่านลดลง ประสิทธิภาพการทำงานของเยื่อกรองลดลง ต้องใช้แรงดันขับเคลื่อนสารสูงขึ้น ปัจจัยที่ส่งผลต่อการอุดตัน ได้แก่ คุณสมบัติของสารที่เข้าระบบ (เช่น ความเข้มข้น โครงสร้างโมเลกุล และชนิดของสาร) ชนิดของเยื่อกรอง วัสดุที่ใช้ทำเยื่อกรอง ลักษณะการดำเนินและควบคุมระบบ กลไกการอุดตันสามารถจำแนกได้ 3 กรณี คือ (Belfort et al., 1994) 1. การอุดตันที่เกิดจากชั้นเจลหรือเค้กบนผิวเยื่อกรอง (Gel/Cake formation model) เกิดจากขนาดของสารหรืออนุภาคมีขนาดใหญ่กว่ารูของเยื่อกรอง ทำให้ความเข้มข้นของสารถูกสะสมมากขึ้นและเกิดชั้นเจลขึ้นบริเวณผิวหน้าเยื่อกรอง 2. การอุดตันที่เกิดจากการดูดซับของสารหรืออนุภาคบนผิวหรือรูของเยื่อกรอง โดยขนาดของอนุภาคจะเล็กกว่าขนาดของรูเยื่อกรอง 3. การอุดตันที่เกิดจากโมเลกุลของสารมีขนาดใกล้เคียงหรือเท่ากับขนาดรูของเยื่อกรอง (Intermediate blocking model) ทำให้เกิดการอุดตันระหว่างช่องรูของเยื่อกรอง (รูปที่ 2.3) การลดการอุดตันของเยื่อกรองทำได้โดยเลือกสภาวะการดำเนินระบบที่เหมาะสม เช่น แรงดันที่ใช้ขับเคลื่อน รูปแบบของเยื่อกรองที่ใช้ อุณหภูมิในการดำเนินระบบ การปรับเปลี่ยนปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างตัวถูกละลายด้วยกัน และระหว่างตัวถูกละลายกับเยื่อกรอง (Howell et al., 1999)



รูปที่ 2.3 รูปแบบการอุดตันที่เกิดขึ้นกับเยื่อกรอง (Belfort et al., 1994)

2.7.3 การประยุกต์ใช้งานระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองถูกนำมาประยุกต์ใช้หลายด้าน ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหาร สำหรับผลิตมอลโตสไซรัปจากแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ maltogenase (Gaouar et al., 1998) การใช้ polygalacturonase ย่อยสลายเพคติน (Belafi-Bako et al., 2007) อุตสาหกรรมการผลิตยาเพื่อผลิต 6-aminopenicillanic acid และ phenylacetic acid (Bryjak et al., 1996) การนำไปใช้ร่วมกับระบบบำบัดน้ำเสีย เช่น การนำตะกอนสลัดจ์มาบำบัดฟีนอลในน้ำเสีย จากการศึกษาไม่พบฟีนอลอยู่เลยในเพอร์มิเอทที่ออกจากระบบ (Barrios-Martinez et al., 2006) การบำบัดน้ำมันเชื้อเพลิงที่ปนเปื้อนในน้ำได้ถึง 99.9% โดยใช้ระยะเวลาเก็บกัก 13.3 ชั่วโมง (Scholz and Fuchs, 2000) การบำบัดน้ำที่มีการปนเปื้อนของสารประกอบทางยา เช่น ibuprofen, ketoprofen, mefenamic acid และ naproxen ด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองแบบจมตัว (Kimura et al., 2005)

บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 เครื่องแก้ว

- ขวดปรับปริมาตร (Volumetric Flask)
- หลอดทดลอง (Test tube)
- ขวดรูปชมพู่ (Flask)
- กระบอกตวง (Cylinder)
- ปิเปต (Pipette)
- จานเพาะเชื้อ (Petridish)
- แท่งแก้วคนสาร
- กระบอกตวง (Cylinder)
- บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 250, 500 ml

3.1.2 เครื่องมือ

- Spectrophotometer (Themo Genesys 20 Vis Spectrophotometer, USA)
- Water bath (Julabo SW23, USA)
- ตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส รุ่น HF 201 SR SONGSERM เดนมาร์ก
- ตู้แช่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส รุ่น GN-S392QVC อินโดนีเซีย
- Laminar air flow Faster BHA 48 อิตาลี
- เครื่อง Vortex รุ่น G560E Scientific Industries USA
- เครื่อง Incubator รุ่น 9010-0088 BINDER เยอรมัน
- เครื่อง Sonicate (Branson Ultrasonics CORPORATION, CT 06813, USA)
- Cuvette plastic
- Autopipette range (0.5-10, 10-100, 20-200, 100-1000 ul) (Nichiroryo Le, USA)
- Pipette tip size (10, 200, 1000 µl)
- หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) รุ่น ES-315 Tomy JAPAN
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น 39812079 JAPAN
- เครื่องเขย่า (Shaker) innova 2100 USA
- เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง ELECTRONIC BALANCE (Thailand)
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง DGX-4000 (JAPAN)

3.1.3 อื่นๆ

- เชื้อเห็ดคุด *Lentinus polychrous* (ฟาร์มเห็ดรุจิรา จังหวัดกาฬสินธุ์)

- แกลบ
- รำละเอียด
- Sterile centrifuge tube size 15, 50 ml (Biologix, USA)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- ลูป (Loop)
- ซ้อนตักสาร
- ตะแกรงลวด
- Centrifuge tube ขนาด 15 ml
- เพลทพลาสติกสำหรับเลี้ยงเชื้อ
- ลูกยาง
- สำลี
- ฟอยล์
- Magnetic bar
- กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
- ถุงมือ
- ผ้าขาวบาง

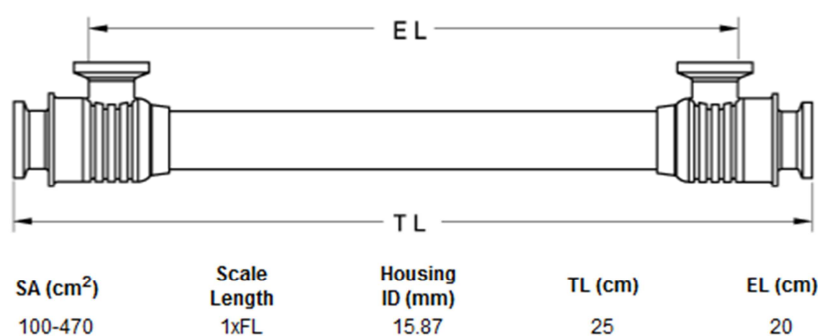
3.1.4 สารเคมี

- น้ำกลั่น
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (BD Difco™ USA)
- Phosphoric acid (H_3PO_4) (Sigma-Aldrich, USA)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$) (Sigma-Aldrich, USA)
- Bovine Serum Albumin (BSA)
- Absolute ethanol
- Coomassie brilliant blue G250 (Thermo Scientific, USA)
- Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4) (Sigma-Aldrich, USA)
- Sodium acetate ($C_2H_3NaO_2$) (Sigma-Aldrich, USA)
- Sodium hydroxide
- Sodium azide
- Citric acid ($C_6H_8O_7$) (Sigma-Aldrich, USA)
- 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (Sigma-Aldrich, USA)
- Indigo carmine (Acros organics, Fisher Scientific, USA)
- Reactive Orange 16 (Sigma-Aldrich, USA)
- Reactive Green 19 (Sigma-Aldrich, USA)

- Acid Green 27 (Sigma-Aldrich, USA)
- Acid blue 80 (Sigma-Aldrich, USA)
- Alizarin red (Sigma-Aldrich, USA)
- Direct Blue 71 (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.5 เยื่อกรองอัลตราฟิวเตรชั่น (Ultrafiltration membrane)

เยื่อกรองอัลตราฟิวเตรชั่นที่ใช้ในการศึกษาเป็นรุ่น MiniKros®Sampler Filter Modules (Part No. S02-S010-05-P) ของบริษัท SPECTRUM LABS ประเทศสหรัฐอเมริกา แผ่นเยื่อกรองทำจากโพลีซัลโฟน (Polysulphone) พื้นที่หน้าตัด 1000 ลูกบาศก์เซนติเมตร ขนาดคัดกรองน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight cut – off (MWCO)) 10 กิโลดาลตัน (kDa) ลักษณะโมดูลเป็นแบบเส้นใยกลวง (Hollow fiber membrane) ดังแสดงในรูปที่ 3.1



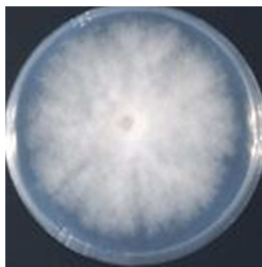
รูปที่ 3.1 เยื่อกรองอัลตราฟิวเตรชั่นรุ่น MiniKros®Sampler Filter Modules

3.2 เชื้อเห็ด

เชื้อเห็ดที่ใช้ในการศึกษาค้นครั้งนี้คือ *Lentinus polychrous* Lev. หรือเรียกว่าเห็ดตับ หรือเห็ดกระด้าง โดยได้รับความอนุเคราะห์เชื้อเห็ดจากฟาร์มเห็ดจุฬา จังหวัดกาฬสินธุ์ โดยทำการเก็บรักษาและเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็งด้วยเทคนิคปลอดเชื้อดังต่อไปนี้

3.2.1 การเก็บรักษาเชื้อเห็ดตับ (Preservation of *Lentinus polychrous* Lev.)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ลงบนจานเพาะเชื้อ ตัดเชื้อเห็ดตับให้ได้ขนาดกว้างยาวประมาณ 0.5x0.5 เซนติเมตร ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเห็ดตับลงบนอาหาร PDA ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นใช้พาราฟินหุ้ม เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ทุกๆ 4 สัปดาห์ ดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 ลักษณะการเจริญของเชื้อเห็ดคบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

3.2.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดคด (Cultivation of *Lentinus polychrous* Lev.)

เตรียมอาหารแข็งสำหรับการเพาะเลี้ยงโดยผสมเกล็ดกับรำในอัตราส่วน 1:2 โดยน้ำหนัก บรรจุลงในขวดแก้วเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วทำการเติมน้ำ 60% (v/w) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำมาผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ถ่ายเชื้อเห็ดคดที่เจริญบน PDA ขนาด 0.5×0.5 ซม. ลงบนอาหารแข็งด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 14 วัน จะได้อาหารแข็งที่มีเชื้อเห็ดเจริญ

3.3 การเตรียมเอนไซม์แลคเคสหายาบ (Preparation of crude enzyme)

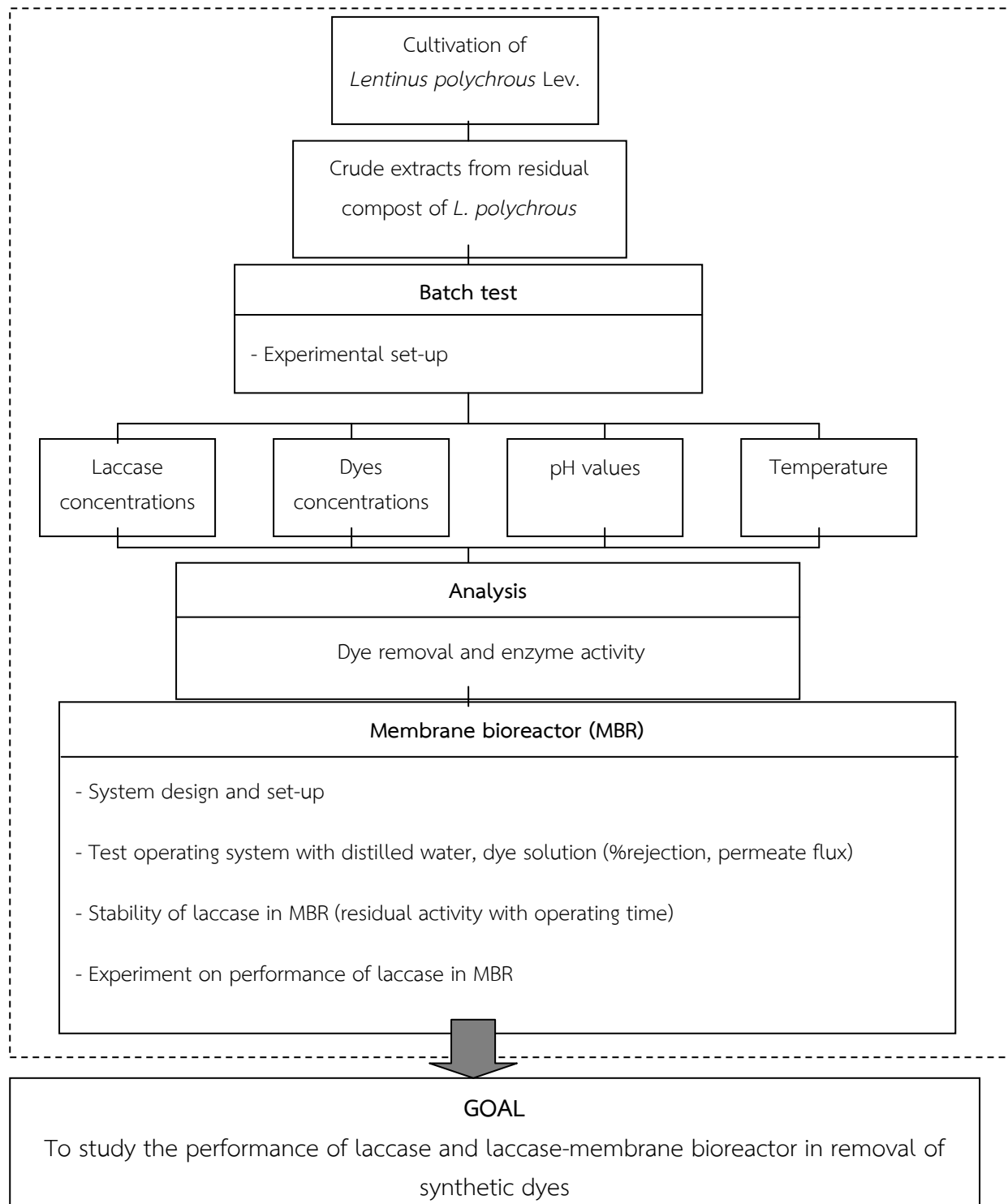
เอนไซม์แลคเคสหายาบถูกเตรียมตามวิธีของ Saranthima และคณะ (Saranthima et al., 2009) โดยนำเชื้อเห็ดคดที่เจริญบนอาหารแข็ง 14 วัน มาเติมน้ำกลั่น ด้วยอัตราส่วน น้ำกลั่น 3 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 กรัม นำมาควนบนเครื่องควนแบบแม่เหล็กเป็นเวลา 45 นาที กรองกากอาหารเลี้ยงเชื้อออกโดยใช้ผ้าขาวบาง นำสารละลายที่ผ่านการกรองมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนตะกอนทิ้งไป และส่วนที่เป็นสารละลายจะเรียกว่าเอนไซม์หายาบ นำเอนไซม์หายาบที่สกัดได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.4 การเตรียมสีย้อม

ทำการละลายสีย้อม Acid blue 80, Reactive Green 19, Reactive Orange 16, Indigo carmine, Acid Green 27, Alizarin Red และ Direct Blue 71 โดยทำการชั่งน้ำหนักสีย้อม 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 50 ml ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสมรวมกับการเจือจางสีย้อมในกรณีที่ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่า 1 โดยการวัด Acid blue 80 ที่ความยาวคลื่น 626 nm สี Reactive Green 19 ที่ความยาวคลื่น 630 nm สี Reactive Orange 16 ที่ความยาวคลื่น 420 nm สี Indigo carmine ที่ความยาวคลื่น 650 nm สี Acid Green 27 ที่ความยาวคลื่น 605 nm สี Alizarin Red ที่ความยาวคลื่น 423 nm และ สี Direct Blue 71 ที่ความยาวคลื่น 594 nm

3.5 กรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

กรอบแนวคิดของโครงการวิจัยแสดงในรูปที่ 3.3 โดยแบ่งการศึกษาเป็น 2 ส่วนคือ 1) การฟอกจางสีย้อมด้วยแลคเคสในชุดทดลองแบบเบทช์เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์ สีย้อม ความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ และ 2) การฟอกจางสีย้อมด้วยแลคเคสในชุดทดลองในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง



รูปที่ 3.3 กรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การฟอกจางสีย้อมโดยเอนไซม์หยาบแลคเคสในชุดทดลองแบบแบทช์

นำเอนไซม์หยาบแลคเคสที่ได้จากขั้นตอน 3.3 มาทำการวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์หยาบ แล้วนำเอนไซม์หยาบที่ได้มาทำการฟอกจางสีย้อม Acid blue 80, Reactive Green 19, Reactive Orange 16, Indigo carmine, Acid Green 27, Alizarin Red และ Direct Blue 71 โดยการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการฟอกจางสีย้อมดังนี้

3.6.1.1 การทดสอบสภาวะการฟอกจางสีของเอนไซม์หยาบแลคเคสโดยการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสีย้อมชนิดต่างๆ

เตรียมสารละลายเพื่อทำปฏิกิริยาการฟอกจางสีย้อมชนิดต่างๆ เช่นเดียวกับในขั้นตอน 3.4 โดยการปรับเปลี่ยนปริมาณของสีย้อม คือ Acid blue 80 ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามีปริมาณ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 μg สีย้อม Reactive Green 19 มีปริมาณ 10, 20, 30, 40 และ 50 μg สีย้อม Reactive Orange 16 มีปริมาณ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 μg สีย้อม Indigo carmine มีปริมาณ 20, 40, 60 และ 80 μg สีย้อม Acid Green 27 มีปริมาณ 20, 30, 40, 50 และ 60 μg สีย้อม Direct Blue 71 มีปริมาณ 60, 70, 80, 90 และ 100 μg และ สีย้อม Alizarin Red มีปริมาณ 30, 40, 50, 60 และ 70 μg โดยใช้เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ในปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร แล้วทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส แล้วทำการวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่นของสีย้อมชนิดต่างๆ เช่นเดียวกับขั้นตอน 3.4 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 10 นาที ในเวลา 1 ชั่วโมง ยกเว้นสีย้อม Acid Green 27, Alizarin Red, Reactive Orange 16 และ Direct Blue 71 จะทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 1 วัน เป็นเวลา 6 วัน

3.6.1.2 การทดสอบสภาวะการฟอกจางสีของเอนไซม์หยาบแลคเคสโดยการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเอนไซม์หยาบแลคเคส

เตรียมสารละลายเพื่อทำปฏิกิริยาการฟอกจางสีย้อมชนิดต่างๆ เช่นเดียวกับในขั้นตอน 3.4 โดยการปรับเปลี่ยนปริมาณของสีย้อม Acid blue 80 ปริมาณ 30 μg , Reactive Green 19 ปริมาณ 40 μg , Reactive Orange 16 ปริมาณ 80 μg , Indigo carmine ปริมาณ 80 μg , และ Acid Green 27 ปริมาณ 30 μg , Alizarin Red ปริมาณ 50 μg และ Direct Blue 71 ปริมาณ 100 μg โดยใช้เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 10 นาที เป็นระยะเวลา 60 นาที ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ในปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร แล้วทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส แล้วทำการวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่นของสีย้อมชนิดต่างๆ เช่นเดียวกับขั้นตอน 3.4 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 10 นาที ในเวลา 1 ชั่วโมง ยกเว้นสีย้อม Acid Green 27, Alizarin Red, Reactive Orange 16 และ Direct Blue 71 จะทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 1 วัน เป็นเวลา 6 วัน

3.6.1.3 การทดสอบสภาวะการฟอกจางสีของเอนไซม์หยาบแลคเคสโดยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วง 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส

เตรียมสารละลายเพื่อทำปฏิกิริยาการฟอกจางสีย้อมชนิดต่างๆ ในปริมาณที่วัดค่าการดูดกลืนแสงได้สูงสุดและไม่เกิน 1 โดยการผสมสีย้อม Acid blue 80 ปริมาณ 30 μg , Reactive Green 19 ปริมาณ 40 μg , Reactive Orange 16 ปริมาณ 80 μg , Indigo carmine ปริมาณ 80 μg , และ Acid Green 27 ปริมาณ 30 μg , Alizarin Red ปริมาณ 50 μg และ Direct Blue 71 ปริมาณ 100 μg โดยการผสมสีย้อมชนิดต่างๆ ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 และเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร แล้วทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส แล้วทำการวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่นของสีย้อม Acid blue 80 ที่ความยาวคลื่น 626 nm สี Reactive Green 19 ที่ความยาวคลื่น 630 nm และสี Indigo carmine ที่ความยาวคลื่น 650 nm โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 10 นาที ในเวลา 1 ชั่วโมง สี Alizarin Red ที่ความยาวคลื่น 423 nm Acid Green 27 ที่ความยาวคลื่น 605 nm สี Reactive Orange 16 ที่ความยาวคลื่น 420 nm และ สี Direct Blue 71 ที่ความยาวคลื่น 594 nm โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 1 วัน ในระยะเวลา 6 วัน

3.6.1.4 การทดสอบสภาวะการฟอกจางสีของเอนไซม์หยาบแลคเคสโดยการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่าง (พีเอช) 4, 5, 6, 7, 8 และ 9

เตรียมสารละลายเพื่อทำปฏิกิริยาการฟอกจางสีย้อมชนิดต่างๆ เช่นเดียวกับในขั้นตอน 3.4 โดยการเปลี่ยนชนิดของบัฟเฟอร์ คือ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 โดยการผสมสีย้อม Acid blue 80 ปริมาณ 30 μg , Reactive Green 19 ปริมาณ 40 μg , Reactive Orange 16 ปริมาณ 80 μg , Indigo carmine ปริมาณ 80 μg , และ Acid Green 27 ปริมาณ 30 μg , Alizarin Red ปริมาณ 50 μg และ Direct Blue 71 ปริมาณ 100 μg และเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร แล้วทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส แล้วทำการวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่นของสีย้อมชนิดต่างๆ เช่นเดียวกับขั้นตอน 3.4 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 10 นาที ในเวลา 1 ชั่วโมง ยกเว้นสีย้อม Acid Green 27, Alizarin Red, Reactive Orange 16 และ Direct Blue 71 จะทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 1 วัน เป็นเวลา 6 วัน

3.6.1.5 การทดสอบสภาวะการฟอกจางสีของเอนไซม์หยาบแลคเคสโดยการเติมสารตัวกลาง NaN_3 , Na_2SO_4 , Na_2CO_3 และ NaCl

เตรียมสารละลายเพื่อทำปฏิกิริยาการฟอกจางสีย้อมชนิดต่างๆ Acid blue 80 ปริมาณ 30 μg , Reactive Green 19 ปริมาณ 40 μg , Reactive Orange 16 ปริมาณ 80 μg , Indigo carmine ปริมาณ 80 μg , และ Acid Green 27 ปริมาณ 30 μg , Alizarin Red ปริมาณ 50 μg และ Direct Blue 71 ปริมาณ 100 μg เช่นเดียวกับในขั้นตอน 3.5 และเติมสารตัวกลาง NaN_3 , Na_2SO_4 , Na_2CO_3 และ NaCl ปริมาณ 5, 10, 15 และ 20 $\mu\text{mole/reaction}$ โดยการผสมสีย้อมชนิดต่างๆ ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 และเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร แล้วทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส แล้วทำการวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่นของสีย้อมเช่นเดียวกับขั้นตอน

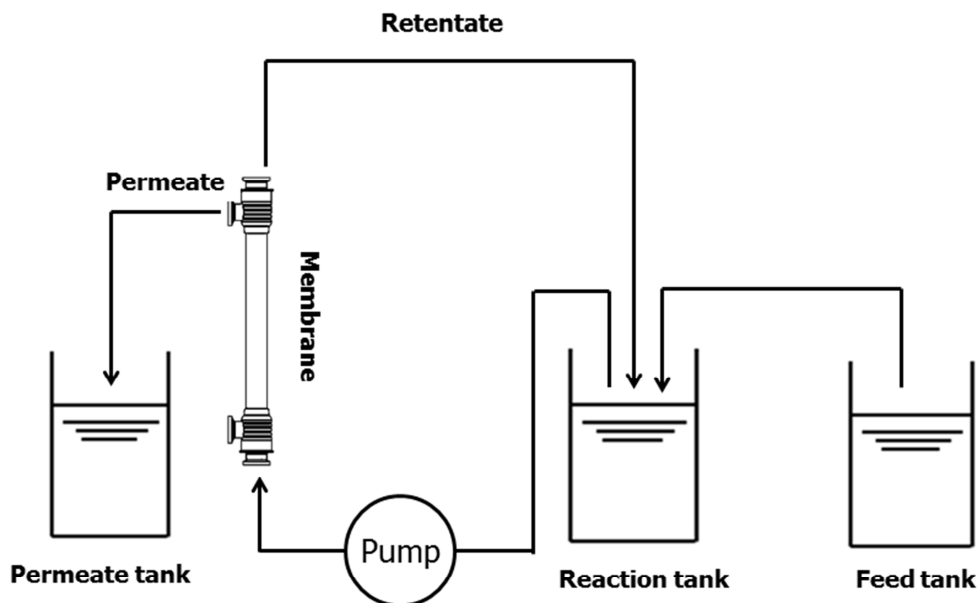
3.4 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 10 นาที ในเวลา 1 ชั่วโมง ยกเว้นสีย้อม Acid Green 27, Alizarin Red, Reactive Orange 16 และ Direct Blue 71 จะทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก 1 วัน เป็นเวลา 6 วัน

3.6.2 การฟอกจางสีย้อมโดยเอนไซม์หยาบแลคเคสในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง

3.6.2.1 การติดตั้ง ทดสอบระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง และล้างทำความสะอาด

ระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ถูกแสดงดังรูปที่ 3.4 ซึ่งประกอบไปด้วยถังป้อนสาร (Feed tank) ถังปฏิกิริยา (Reaction tank) ถังเก็บสารจากเพอมีเอท (Permeate tank) ปั๊ม และเยื่อกรองอัลตราฟิวเตรชันรุ่น MiniKros® Sampler Filter Modules (Part No. S02-S010-05-P) (รูปที่ 3.1) การทำงานของระบบดังกล่าวเริ่มจากสารละลายสีย้อมและเอนไซม์ถูกเติมลงในถังปฏิกิริยาในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นสารละลายจะถูกปั๊มส่งผ่านไปยังเยื่อกรองอัลตราฟิวเตรชันด้วยอัตราการไหล 300 มิลลิลิตรต่อนาที ในขณะที่เยื่อกรองอัลตราฟิวเตรชันจะกรองสีย้อมออกจากสารละลายและปล่อยให้สารละลายที่ปราศจากสีย้อมไหลเข้าสู่ถังเก็บสารจากเพอมีเอท สำหรับสารละลายที่ถูกส่งผ่านไปยังเยื่อกรองอัลตราฟิวเตรชันจะถูกแบ่งเป็นสารละลายที่สามารถผ่านเยื่อกรองได้ เรียกสารละลายส่วนนี้ว่าเพอมีเอท (Permeate) ส่วนสารละลายที่ไม่ผ่านเยื่อกรองเรียกว่า รีเทนเตท (Retentate) จะไหลกลับสู่ถังปฏิกิริยาและจะวนเข้าสู่ระบบอีกครั้ง ทำการเก็บตัวอย่างสารละลายที่เข้าและออกจากระบบ โดยในการศึกษานี้สารละลายสีย้อมจะถูกปั๊มเข้าสู่ถังปฏิกิริยาด้วยอัตราการไหลที่เท่ากับอัตราการไหลของเพอมีเอท ทำให้ปริมาตรของสารในถังปฏิกิริยาถูกควบคุมให้คงที่ สำหรับการทดสอบการทำงานของระบบหลังติดตั้งชุดอุปกรณ์ จะเดินระบบด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็นเวลา 30 นาที วัดอัตราการไหลเมื่อเปลี่ยนแปลงความดันในการดำเนินระบบ

หลังการใช้งานทุกครั้งเยื่อกรองจะถูกนำมาล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.01 โมลต่อลิตร โดยสารเคมีดังกล่าวถูกนำมาวนล้างในระบบเป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นล้างด้วยกรดซิตริก 0.01 โมลต่อลิตร วนล้างในระบบเป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนอีกครั้ง ทดสอบค่าฟลักซ์ของน้ำหลังการล้างเปรียบเทียบกับฟลักซ์ก่อนใช้งาน



รูปที่ 3.4 การติดตั้งระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง

3.6.2.2 การกักเอนไซม์ในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง

เอนไซม์หยาบแลคเคสถูกเติมลงในถังปฏิกรณ์และถูกปั๊มผ่านเยื่อกรองอัลตราฟิวเตรชันด้วยอัตราการไหล 300 มิลลิลิตรต่อนาที สารละลายที่ไม่ผ่านเยื่อกรองจะถูกนำมวนกลับเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ดังเดิม ในขณะเดียวกันสารละลายบัฟเฟอร์จากถังป้อนสารจะไหลเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ด้วยอัตราการไหลที่เท่ากับอัตราการไหลของเพอมีเอททำให้ปริมาตรของสารในถังปฏิกรณ์ถูกควบคุมให้คงที่ ทำการเดินระบบเป็นเวลา 240 นาที เก็บตัวอย่างของสารละลายทั้งในส่วนของเพอมีเอทและที่อยู่ในถังปฏิกรณ์ที่เวลาต่างๆ มาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน

3.6.2.3 การทดสอบความเข้มข้นเอนไซม์แลคเคสต่อการกำจัดสีย้อม Acid blue 80 ในระบบถังปฏิกรณ์

ทำการศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อการกำจัดสีย้อมในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง โดยเตรียมสารละลายสีย้อมที่มีความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับสภาพความเป็นกรดต่างของสารละลายสีย้อมเท่ากับ 7 เติมเอนไซม์หยาบแลคเคสที่มีความเข้มข้น 0.013, 0.025, 0.063 และ 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ลงในถังปฏิกรณ์ในอัตราส่วนเอนไซม์ต่อสีย้อมคงที่คือ 1:1 (ปริมาตร:ปริมาตร) และเติมสารสีย้อมลงในถังป้อนสารเข้าสู่ระบบ ซึ่งจะป้อนสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบอย่างต่อเนื่อง ปรับอัตราการไหลของระบบที่ 300 มิลลิลิตรต่อนาที ดำเนินการทดสอบเก็บสารละลายส่วนเพอมีเอทมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสีย้อมและปริมาณโปรตีน พร้อมบันทึกอัตราการไหลของเพอมีเอทเพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าเพอมีเอทฟลักซ์ทุก 30 นาที ตั้งแต่เวลาที่ 0-240 นาที

3.6.2.4 การทดสอบความเข้มข้นของสีย้อมต่อการกำจัดสีย้อม Acid blue 80 ในระบบถัง

ปฏิกรณ์

ทำการศึกษาค่าผลความเข้มข้นของสีย้อมต่อการกำจัดสีย้อมในระบบถังปฏิกรณ์เยื่อกรองโดยเตรียมสารละลายสีย้อมที่มีความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปรับสภาพความเป็นกรดต่างของสารละลายสีย้อมเท่ากับ 7 พร้อมเติมลงในถังปฏิกรณ์และถังป้อนสารเข้าสู่ระบบ ซึ่งจะป้อนสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบอย่างต่อเนื่อง ปรับอัตราการไหลของระบบ 300 มิลลิลิตรต่อนาที ดำเนินการทดสอบและเก็บสารละลายส่วนเพอมีเอทมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสีย้อม พร้อมบันทึกอัตราการไหลของเพอมีเอทเพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าเพอมีเอทฟลักซ์ ทุก 30 นาที ตั้งแต่เวลาที่ 0-240 นาที

สำหรับการศึกษาความเข้มข้นของสีย้อมต่อการกำจัดสีย้อมในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง ทำการทดลองโดยเตรียมสารละลายสีย้อมที่มีความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปรับสภาพความเป็นกรดต่างของสารละลายสีย้อมเท่ากับ 7 เติมเอนไซม์หยาบแลคเคสลงในถังปฏิกรณ์ในอัตราส่วนเอนไซม์ต่อสีย้อม 1:1 (ปริมาตร:ปริมาตร) และเติมสารสีย้อมลงในถังป้อนสารเข้าสู่ระบบ ซึ่งจะป้อนสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบอย่างต่อเนื่อง ปรับอัตราการไหลของระบบที่ 300 มิลลิลิตรต่อนาที ดำเนินการทดสอบเก็บสารละลายส่วนเพอมีเอทมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสีย้อมและปริมาณโปรตีน พร้อมบันทึกอัตราการไหลของเพอมีเอทเพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าเพอมีเอทฟลักซ์ทุก 30 นาที ตั้งแต่เวลาที่ 0-240 นาที

3.6.2.5 การทดสอบความเป็นกรดต่างของสีย้อมต่อการกำจัดสีย้อม Acid blue 80 ในระบบถัง

ปฏิกรณ์

ทำการศึกษาค่าผลความเป็นกรดต่างต่อการกำจัดสีย้อมในระบบถังปฏิกรณ์เยื่อกรองโดยเตรียมสารละลายสีย้อมความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนแปลงสภาพความเป็นกรดต่างที่ 4, 5, 6, 7, และ 8 ตามลำดับ พร้อมเติมลงในถังปฏิกรณ์และถังป้อนสารเข้าสู่ระบบ ซึ่งจะป้อนสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบอย่างต่อเนื่อง ปรับอัตราการไหลของระบบ 300 มิลลิลิตรต่อนาที ดำเนินการทดสอบและเก็บสารละลายส่วนเพอมีเอทมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสีย้อม พร้อมบันทึกอัตราการไหลของเพอมีเอทเพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าเพอมีเอทฟลักซ์ ทุก 30 นาที ตั้งแต่เวลาที่ 0-240 นาที

สำหรับการศึกษาความเป็นกรดต่างต่อการกำจัดสีย้อมในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง ทำการทดลองโดยเตรียมสารละลายสีย้อมความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนแปลงสภาพความเป็นกรดต่างที่ 4, 5, 6, 7 และ 8 ตามลำดับ เติมเอนไซม์หยาบแลคเคสลงในถังปฏิกรณ์ในอัตราส่วนเอนไซม์ต่อสีย้อม 1:1 (ปริมาตร:ปริมาตร) และเติมสารสีย้อมลงในถังป้อนสารเข้าสู่ระบบ ซึ่งจะป้อนสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบอย่างต่อเนื่อง ปรับอัตราการไหลของระบบที่ 300 มิลลิลิตรต่อนาที ดำเนินการทดสอบเก็บสารละลายส่วนเพอมีเอทมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสีย้อมและปริมาณโปรตีน พร้อมบันทึกอัตราการไหลของเพอมีเอทเพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าเพอมีเอทฟลักซ์ทุก 30 นาที ตั้งแต่เวลาที่ 0-240 นาที

t = เวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา (นาที)

และค่าเปอร์เซ็นต์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์สัมพัทธ์ (% relative enzyme activity) สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 3.2

$$\% \text{ relative enzyme activity} = (\text{Act}_{\text{end}} \times 100\%) / \text{Act}_{\text{start}} \quad (3.2)$$

เมื่อ $\text{Act}_{\text{start}}$ = กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เริ่มต้น

Act_{end} = กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์สุดท้าย

3.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

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 ในขวดปรับปริมาตร ก่อนนำไปใช้นำสารละลายดังกล่าวมากรองผ่านการกรอง Whatman No.1 เก็บสารละลายในขวดสีชา อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ก่อนใช้ทุกครั้งต้องนำมากรองสารที่ตกตะกอนออกก่อน

นำสารตัวอย่างมา 40 ไมโครลิตร เติม Bradford reagents 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm และเตรียมสารละลาย Bovine Serum Albumin (BSA) เป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐาน โดยเตรียมในช่วงความเข้มข้น 0-1000 $\mu\text{g/ml}$ นำผลค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในสารตัวอย่างมาเทียบกับเส้นกราฟโปรตีนมาตรฐานซึ่งแสดงในภาคผนวก ก

3.7.3 การวิเคราะห์การฟอกจางสีด้วยเอนไซม์หยาบแลคเคสในชุดทดลองแบบแบทช์

การฟอกจางสีของสีย้อมโดยเอนไซม์หยาบแลคเคสในขั้นตอน 3.6.1 ได้ทำการทดลองสามซ้ำ และนำค่าเฉลี่ยรวมทั้งค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ไม่ได้แสดงไว้ในผลการวิเคราะห์) มาทำการวิเคราะห์เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีของสีย้อมและวิเคราะห์กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์หยาบแลคเคสในการฟอกจางสีของสีย้อมชนิดต่างๆ แล้วหาความสัมพันธ์กับระยะเวลาการฟอกจางสี โดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่นที่เหมาะสมของสีย้อมชนิดต่างๆ ได้ดังนี้ Acid blue 80, Reactive Green 19, Reactive Orange 16, Indigo carmine, Acid Green 27, Alizarin Red และ Direct Blue 71 โดยการใช้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสมของสีย้อมชนิดต่างๆ ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของสีย้อมโดยใช้หลักการวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer สำหรับการคำนวณเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีของสีย้อม (%decolorization) แสดงดังสมการที่ 3.3

$$\% \text{ decolorization} = ((\text{OD}_{\text{start}} - \text{OD}_{\text{end}}) \times 100\%) / \text{OD}_{\text{start}} \quad (3.3)$$

เมื่อ OD_{start} = ค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อมเริ่มต้น

OD_{end} = ค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อมสุดท้าย

3.7.4 การวิเคราะห์การฟอกจางสีด้วยเอนไซม์หยาบแลคเคสในชุดทดลองระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง

การศึกษาการฟอกจางสีด้วยเอนไซม์หยาบแลคเคสถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองจะพิจารณาจากค่าการกำจัดสีที่เกิดจากเอนไซม์แลคเคสร่วมกับระบบถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง ค่าการรั่วไหลของเอนไซม์ออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง และเพอมีเอทฟลักซ์ โดยสามารถคำนวณได้ดังนี้

การกำจัดสีที่เกิดจากเอนไซม์แลคเคสร่วมกับระบบถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง จะคำนวณอยู่ในรูปของเปอร์เซ็นต์การกำจัดสี (% removal of dye) ซึ่งแสดงดังสมการที่ 3.4

$$\% \text{ removal of dye} = ((OD_{\text{start}} - OD_{\text{permeate}}) \times 100\%) / OD_{\text{start}} \quad (3.4)$$

เมื่อ OD_{start} = ค่าการดูดกลืนแสงของสีเริ่มต้น
 OD_{permeate} = ค่าการดูดกลืนแสงของสีในเพอมีเอท

ค่าการรั่วไหลของเอนไซม์ออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองจะวิเคราะห์ในรูปของเปอร์เซ็นต์กิจกรรมการทำงานของแลคเคสที่ตรวจวัดได้ในเพอมีเอทเทียบกับปริมาณเอนไซม์ที่มีในระบบทั้งหมด ซึ่งแสดงดังสมการที่ 3.5

$$\text{การรั่วไหลของเอนไซม์ (\%)} = (Act_{\text{permeate}} \times 100\%) / Act_{\text{start}} \quad (3.5)$$

เมื่อ Act_{start} = กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เริ่มต้น
 Act_{permeate} = กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในเพอมีเอท

เพอมีเอทฟลักซ์ (permeate flux) มีหน่วยเป็นลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง ซึ่งคำนวณได้จากอัตราการไหลของเพอมีเอทส่วนด้วยพื้นที่หน้าตัดของแผ่นเยื่อกรอง แสดงดังสมการที่ 3.6

$$\text{เพอมีเอทฟลักซ์} = \text{อัตราการไหลเพอมีเอท} / \text{พื้นที่หน้าตัดแผ่นเยื่อกรอง} \quad (3.6)$$

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้เป็นการนำเอนไซม์แลคเคสที่ยาบสกัดจาก *Lentinus polychrous* Lev. มาใช้ในการฟอกจางสีย้อม โดยแบ่งการศึกษาเป็น 2 ส่วนใหญ่คือ 1) การฟอกจางสีย้อมด้วยแลคเคสในชุดการทดลองแบบแบทช์เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นของสีย้อม การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิและผลของสารเติมที่มีต่อการฟอกจางสีย้อมด้วยแลคเคส และ 2) การฟอกจางสีย้อมด้วยแลคเคสในชุดทดลองในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง โดยจะศึกษาถึงการกักกันเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง การกำจัดสีย้อมด้วยถังปฏิกรณ์เยื่อกรองและถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคสเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นของสีย้อม การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่าง และอัตราการไหลของสารเข้าสู่ระบบ ผลการศึกษาเป็นดังนี้

4.1 การฟอกจางสีย้อมโดยเอนไซม์หยาบแลคเคสในชุดทดลองแบบแบทช์

การทดสอบการฟอกจางสีย้อม Acid blue 80, Reactive Green 19, Reactive Orange 16, Indigo carmine, Acid Green 27, Alizarin Red และ Direct Blue 71 โดยใช้เอนไซม์หยาบแลคเคส และวิเคราะห์ผลการฟอกจางสีย้อมจากค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (% Relative activity) เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี (% decolorization) ในระยะเวลา และสถานะต่างๆ ดังนี้

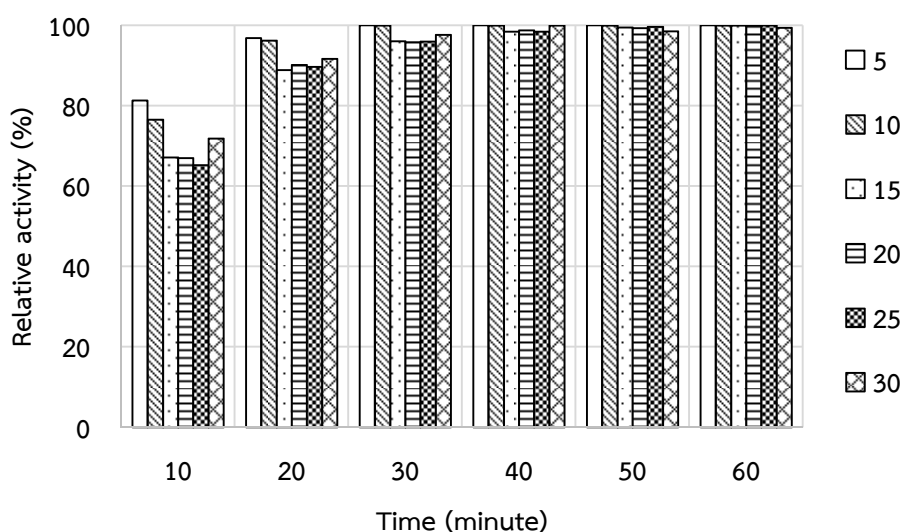
4.1.1 การทดสอบสถานะการฟอกจางสี Acid blue 80 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส

4.1.1.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของสี

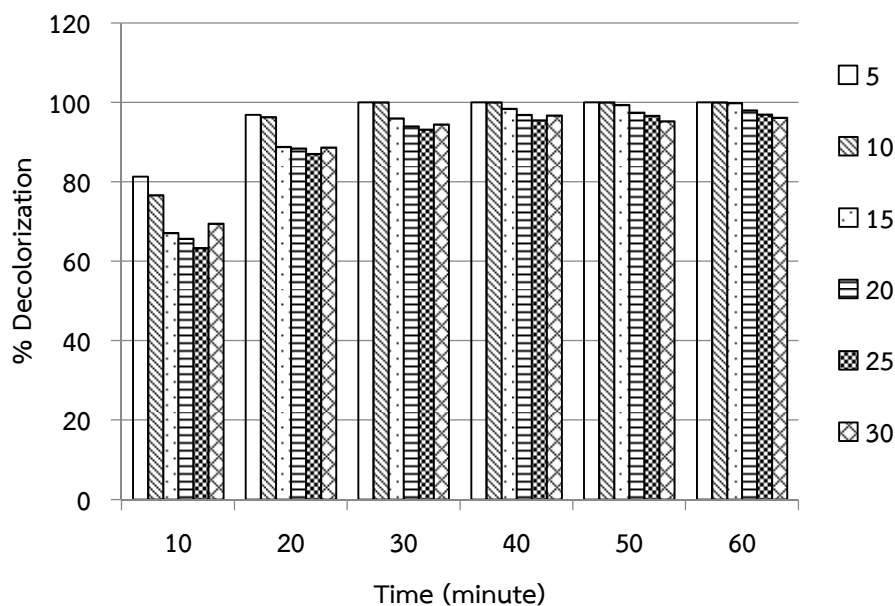
การศึกษาการฟอกจางสี Acid blue 80 ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยการปรับเปลี่ยนปริมาณ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 μg ของสี Acid blue 80 โดยใช้เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่สถานะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 10 นาที เป็นระยะเวลา 60 นาที แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity) กับปริมาณของสี Acid blue 80 พบว่าปริมาณสีย้อม Acid blue 80 ในปริมาณ 5 และ 10 μg มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เทียบเท่ากับ 100 % ที่เวลา 30 นาที ในขณะที่สี Acid blue 80 ปริมาณ 15, 20 และ 25 μg มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เทียบเท่ากับ 100 % ที่เวลา 60 นาที จากผลการทดลองการเพิ่มปริมาณสี Acid blue 80 เท่ากับ 30 μg พบว่ากิจกรรมสัมพัทธ์เทียบเท่ากับ 100 % ที่เวลา 40 นาที และเริ่มลดต่ำลงเล็กน้อยเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ที่ระดับ 98-99% แสดงผลในรูปที่ 4.1 จากรายงานการวิจัยเชื้อรา *Lentinus* sp. ที่สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ สามารถฟอกจางสี Acid Blue 80 ได้ 97% (Hsu *et al.* 2012) เมื่อทำการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีทุก 10 นาที เป็นเวลา 60 นาที พบว่า Acid blue 80 มีเปอร์เซ็นต์การถูกฟอกจางสีได้สูงขึ้น เมื่อระยะเวลาการบ่มปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น และมีค่าเปอร์เซ็นต์ลดต่ำลงในขณะที่เพิ่มปริมาณสี จากผลการทดลองพบว่าปริมาณของสีและเอนไซม์มีความสัมพันธ์กับระยะเวลาในการฟอกสี แสดงผลในรูปที่ 4.2

4.1.1.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอนไซม์หยาบแลคเคส

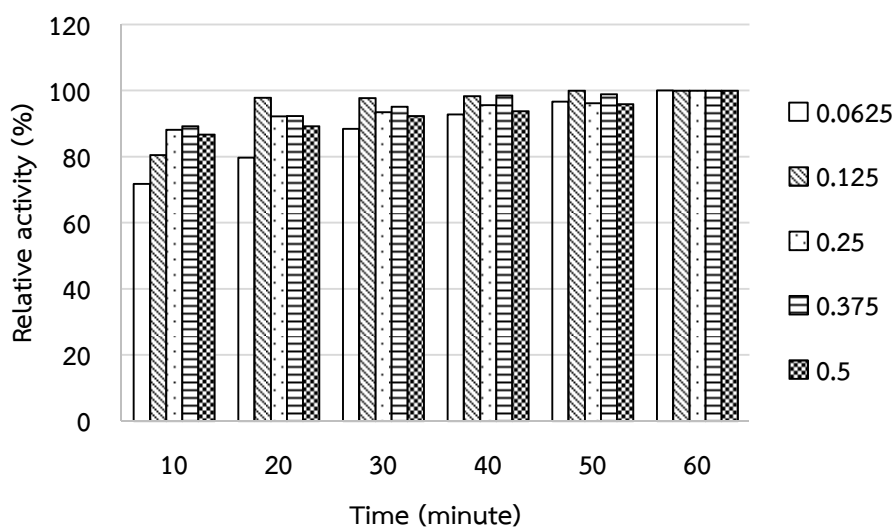
การศึกษาการฟอกจางสี Acid blue 80 ปริมาณ 30 μg โดยปรับเปลี่ยนปริมาณของเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 10 นาที เป็นระยะเวลา 60 นาที แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity) เมื่อใช้เอนไซม์ปริมาณ 0.0625 – 0.5 ยูนิต พบว่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์กับเท่ากับ 100 % ในระยะเวลาการฟอกจางสี 60 นาที การฟอกจางสีโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.125 ยูนิต มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 96.20% และกิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 100% ในเวลา 50 นาที จากผลการศึกษาพบว่าปริมาณเอนไซม์มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid blue 80 โดยการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ทำให้เกิดการฟอกจางสีได้ดีขึ้น แสดงผลในรูปที่ 4.3 และ 4.4 แต่การใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.0625 ยูนิต พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีต่ำที่สุด อาจเนื่องจากปริมาณเอนไซม์ไม่เพียงพอต่อการทำปฏิกิริยา แต่การเพิ่มปริมาณเอนไซม์ 0.5 ยูนิต ซึ่งเป็นปริมาณและปริมาตรสูงสุดที่ใช้ในการทดลอง พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีมีค่าต่ำกว่าการใช้ปริมาณเอนไซม์ที่ต่ำกว่า อาจเนื่องจากในปฏิกิริยามีการรบกวนจากสารปนเปื้อนที่เกิดขึ้นจากการสกัดเอนไซม์หยาบ ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไม่เต็มที่ จึงส่งผลให้มีเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีลดต่ำลง



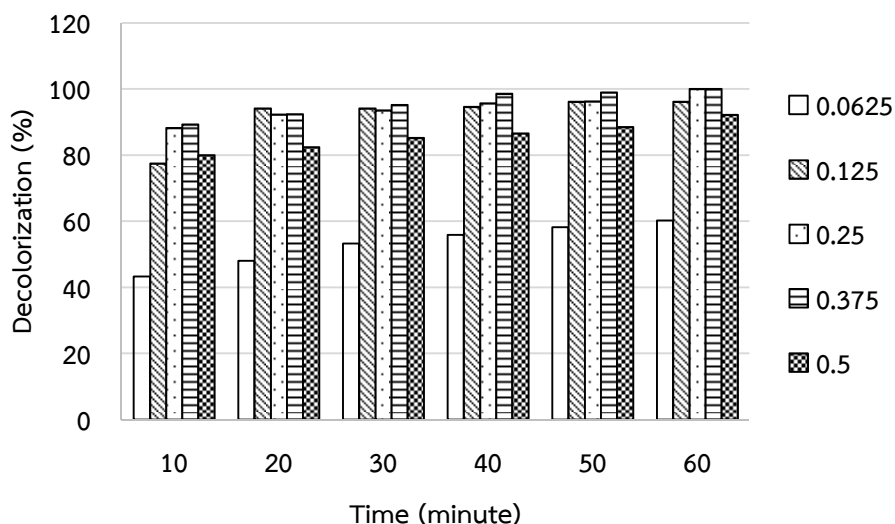
รูปที่ 4.1 กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์หยาบแลคเคสในการฟอกจางสี Acid blue 80 ปริมาณ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.2 เปอร์เซนต์การฟอกจางสี Acid blue 80 ปริมาณ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 µg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 หน่วยต่อมิลลิลิตร เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.3 กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Acid blue 80 ปริมาณ 30 µg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 หน่วย เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid blue 80 ปริมาณ 30 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลกเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

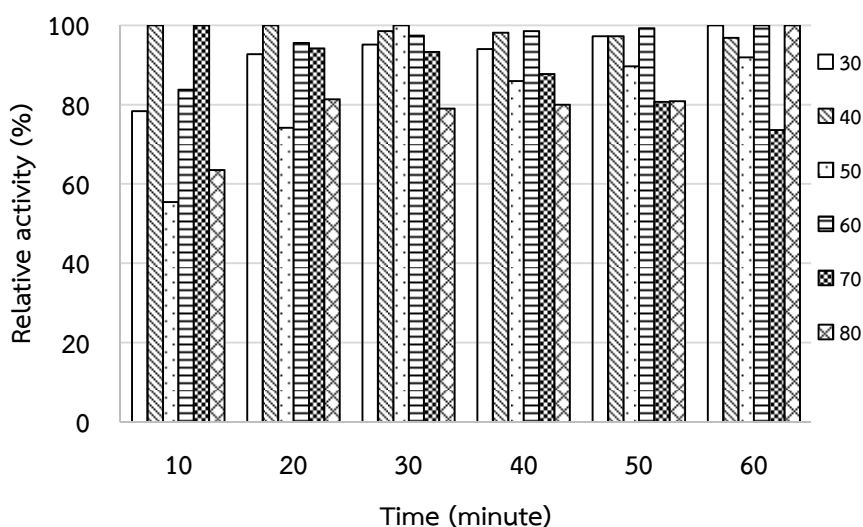
4.1.1.3 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิการฟอกจางสี

การศึกษาการฟอกจางสี Acid blue 80 ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในการฟอกจางสี Acid blue 80 ปริมาณ 30 μg โดยใช้เอนไซม์หยาบแลกเคส 0.125 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 10 นาที เป็นระยะเวลา 60 นาที แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมสัมพันธ์ (relative activity) กับปริมาณของสี Acid blue 80 พบว่าอุณหภูมิต่ำมีกิจกรรมสัมพันธ์สูงกว่าอุณหภูมิสูง แสดงผลในรูปที่ 4.5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพันธ์เพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาการฟอกจางสีที่เพิ่มขึ้น และมีระดับ 100% หรือเทียบเท่า 72.63% ของการฟอกจางสีที่เวลา 60 นาที ในขณะที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพันธ์สูงใกล้เคียงกัน เนื่องจากเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีมีค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกันคือ 52% ตั้งแต่ระยะเวลาการฟอกจางสี 10 นาที เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมสัมพันธ์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่ากิจกรรมมีค่าเทียบเท่า 100% เมื่อเวลาการฟอกจางสีที่ 30 นาที เทียบเท่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 44.85% และเริ่มลดลงในระดับเฉลี่ย 40% ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่ากิจกรรมสัมพันธ์มีค่าเทียบเท่า 100% เมื่อเวลาการฟอกจางสี 60 นาที และเทียบเท่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 35.61% ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พบว่ากิจกรรมสัมพันธ์มีค่าเทียบเท่า 100% เมื่อเวลาการฟอกจางสี 10 นาที และเทียบเท่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 33.13% อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส พบว่ากิจกรรมสัมพันธ์มีค่าเทียบเท่า 100% เมื่อเวลาการฟอกจางสี 60 นาที และเทียบเท่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 27.12% จากผลการวิเคราะห์พบว่าอุณหภูมิ 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีต่ำกว่าในการฟอกจางสีที่อุณหภูมิต่ำกว่า จากรายงานการวิจัยพบว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญใน

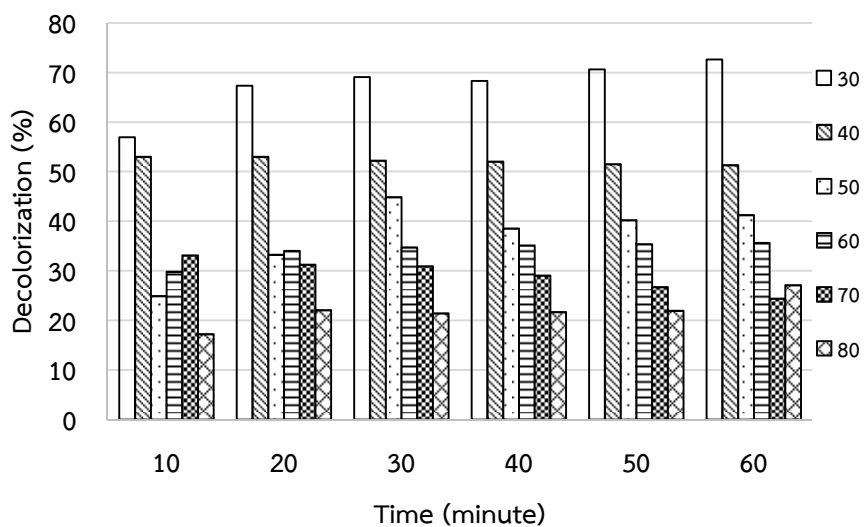
การทำงานของเอนไซม์ในการฟอกจางสีย้อม (Murugesan et al., 2007; Nyanhongo et al., 2002) แสดงผลในรูปที่ 4.6

4.1.1.4 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่าง (พีเอช) 4, 5, 6, 7, 8 และ 9

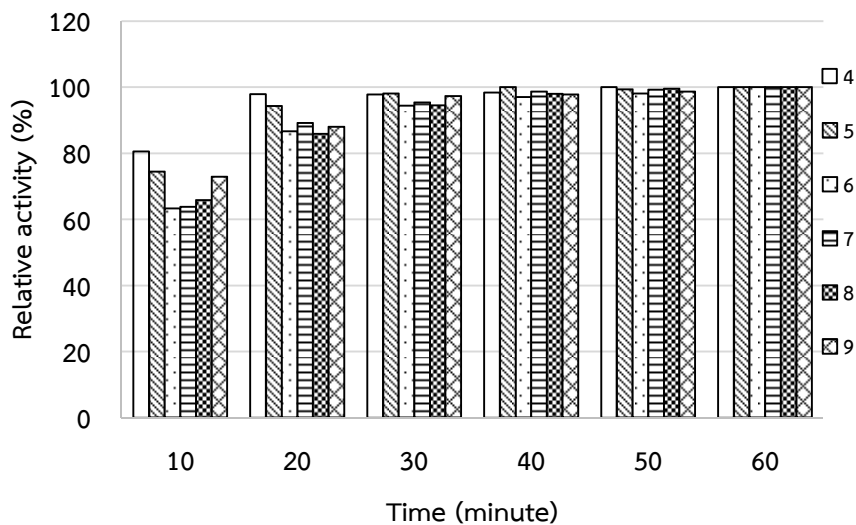
การศึกษาการฟอกจางสี Acid blue 80 ปริมาณ 30 μg โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 หน่วย ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 ที่สภาวะ อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 10 นาที ในระยะเวลา 60 นาที แล้วทำการ วิเคราะห์กิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity) กับปริมาณของสี Acid blue 80 พบว่าการฟอกจางสีได้ดีใน บัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 4) มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เทียบเท่า 100% แสดงผลในรูปที่ 4.7 เมื่อใช้ ระยะเวลาการฟอกจางสี 50 นาที เทียบเท่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี 97.3% เมื่อทดสอบการฟอกจางสีใน สารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 5, 6 และ 7) พบว่ากิจกรรมสัมพัทธ์ 100% ในเวลา 60 นาที และ เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีในบัฟเฟอร์พีเอช 5, 6 และ 7 เท่ากับ 99.10%, 93.00% และ 91.10% ตามลำดับ ในขณะที่การฟอกจางสีในบัฟเฟอร์พีเอช 8 และ 9 มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ 100% ในเวลา 60 นาที เท่ากับ เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี 72.40 และ 64.83 ตามลำดับ แสดงผลในรูปที่ 4.8



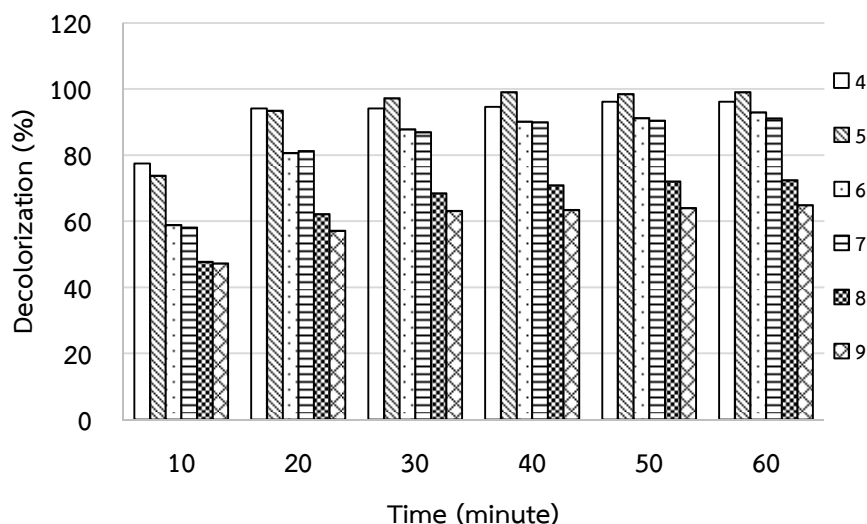
รูปที่ 4.5 กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์หยาบแลคเคสในการฟอกจางสี Acid blue 80 ปริมาณ 30 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในเวลา 60 นาที อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.6 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid blue 80 ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียสใน เวลา 60 นาที โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต และ 0.1 M sodium acetate pH 4.5



รูปที่ 4.7 กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Acid blue 80 ปริมาณ 30 μg ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 4, 5, 6 และ 7) และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl (pH 8 และ 9) เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.8 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid blue 80 ปริมาณ 30 μg ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 4, 5, 6 และ 7) และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl (pH 8 และ 9) เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 หน่วยต่อมิลลิลิตร

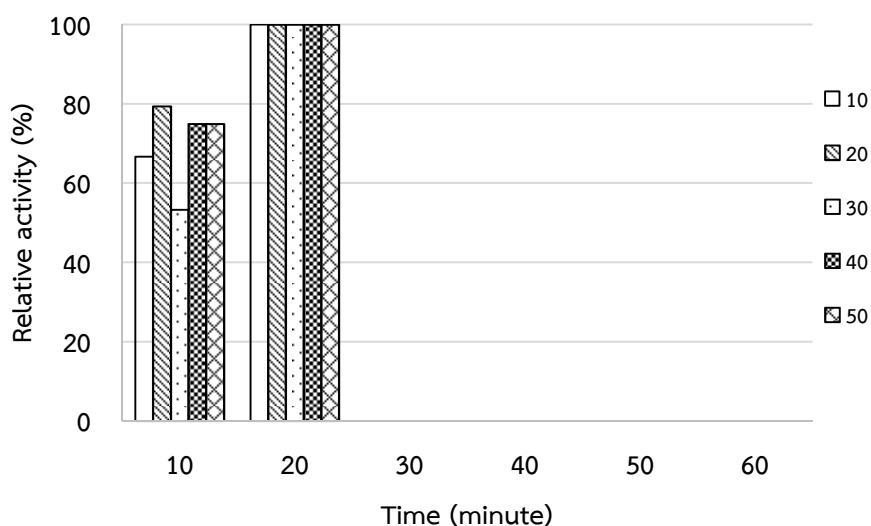
4.1.2 การทดสอบสถานะการฟอกจางสี Reactive Green 19 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส

4.1.2.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของสี Reactive Green 19

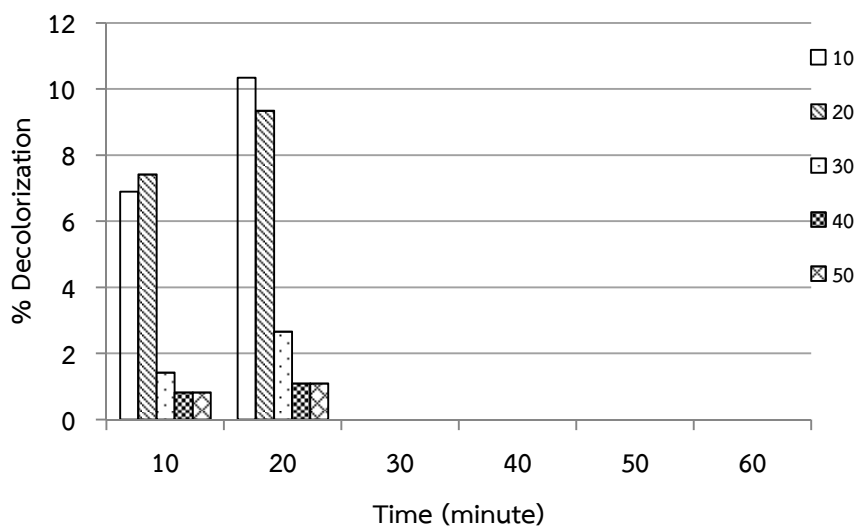
การศึกษาการฟอกจางสี Reactive Green 19 ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยการปรับเปลี่ยนปริมาณ 10, 20, 30, 40 และ 50 μg ของสี Reactive Green 19 โดยใช้เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 หน่วย ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 10 นาที เป็นระยะเวลา 60 นาที แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมสัมพันธ์ (relative activity) กับปริมาณของสี Reactive Green 19 พบว่าปริมาณสีย้อมที่มีกิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ 100 % เมื่อทำการฟอกจางสีในเวลา 20 นาที ในทุกระดับปริมาณของสีย้อม แต่เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงสุดเพียง 10.34% ในเวลา 20 นาที ที่ระดับความเข้มข้นของสีเท่ากับ 10 μg รวมถึงกิจกรรมสัมพันธ์และเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีมีค่าลดลงในระดับศูนย์ เมื่อเวลาเพิ่มมากกว่า 20 นาที ในทุกระดับปริมาณของสีย้อมทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ผลของการฟอกจางสีได้ แสดงผลในรูปที่ 4.9 และ 4.10 เมื่อทำการเพิ่มปริมาณสี Reactive Green 19 ทำให้วิเคราะห์ผลการฟอกจางสีไม่ได้ เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงของสี Reactive Green 19 มีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาของการบ่มปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น พบรายงานการทดสอบเพิ่มความเข้มข้นของสีย้อมในปฏิกิริยาการฟอกจางสี ทำให้เกิดปฏิกิริยาการฟอกจางสีได้ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสีย้อม (Siddiqui et al., 2010)

4.1.2.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอนไซม์หยาบแลคเคส

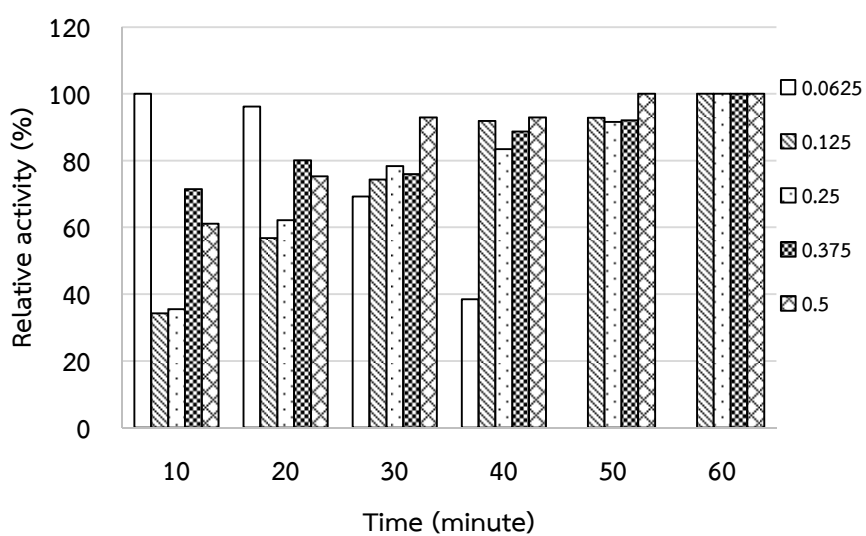
การศึกษาการฟอกจางสี Reactive Green 19 ปริมาณ 40 μg ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยการปรับเปลี่ยนปริมาณของเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 10 นาที เป็นระยะเวลา 60 นาที แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมสัมพันธ์ (relative activity) พบว่าปริมาณของเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625 ยูนิต ในการฟอกจางสี Reactive Green 19 มีกิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ 100 % เมื่อทำการฟอกจางสีในเวลา 10 นาที และเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงสุดเท่ากับ 0.26% เมื่อทำการทดสอบโดยเพิ่มปริมาณเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 4.33%, 4.65%, 2.66% และ 2.99% ตามลำดับ และมีค่ากิจกรรมสัมพันธ์ 100% ในเวลา 60 นาที แสดงผลในรูปที่ 4.11 และ 4.12



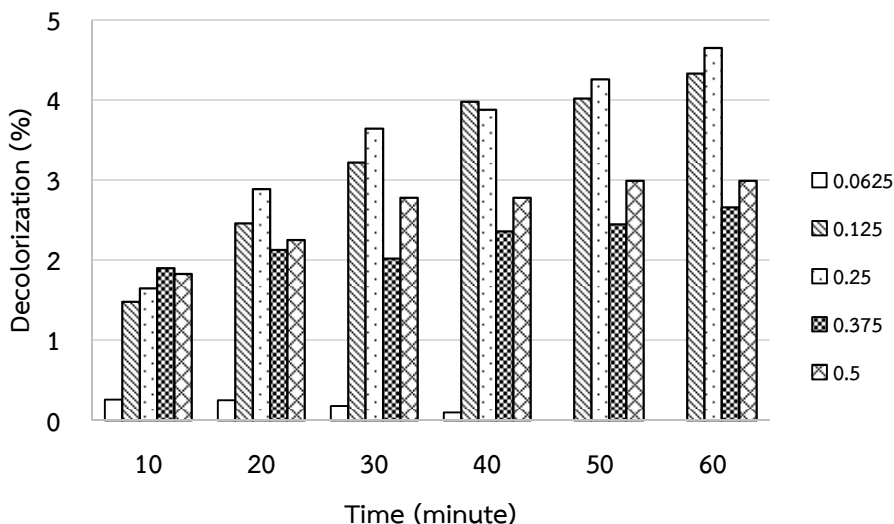
รูปที่ 4.9 กิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์หยาบแลคเคสในการฟอกจางสี Reactive Green 19 ปริมาณ 10, 20, 30, 40 และ 50 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.10 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Green 19 ปริมาณ 10, 20, 30, 40 และ 50 µg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลกเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.11 กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Reactive Green 19 ปริมาณ 40 µg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลกเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.12 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Green 19 ปริมาณ 40 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

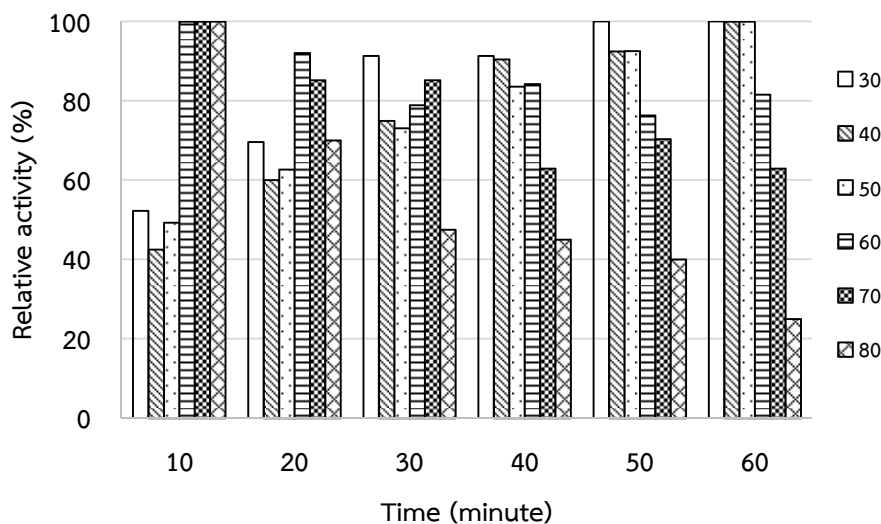
4.1.2.3 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วง 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส

การศึกษาการฟอกจางสี Reactive Green 19 ปริมาณ 40 μg ในการทำปฏิกิริยาโดยปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในการฟอกจางสี Reactive Green 19 ทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส โดยใช้เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 10 นาที เป็นระยะเวลา 60 นาที แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมสัมพันธ์ (relative activity) กับปริมาณของสี Reactive Green 19 พบว่าอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมสัมพันธ์เทียบเท่า 100% ในช่วงเวลา 50 นาที และเทียบเท่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 2.43% ที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพันธ์เทียบเท่า 100% ในช่วงเวลา 60 นาที และเทียบเท่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 4.35% และ 7.27% ตามลำดับ ในขณะที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพันธ์เทียบเท่า 100% ในเวลา 10 นาที และมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาการฟอกจางสีเพิ่มขึ้น เทียบเท่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 3.89%, 2.80% และ 4.05% ตามลำดับ แสดงผลในรูปที่ 4.13 และ 4.14

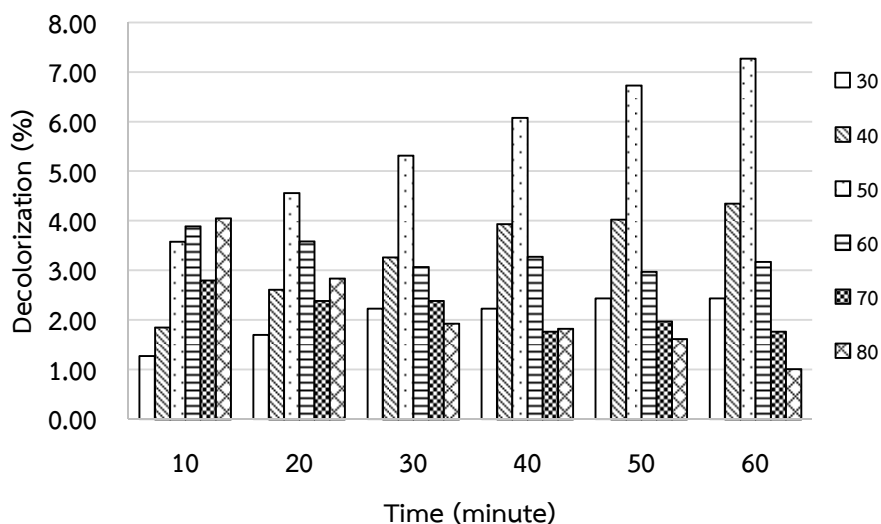
4.1.2.4 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่าง (พีเอช) 4, 5, 6, 7, 8 และ 9

การศึกษาการฟอกจางสี Reactive Green 19 ปริมาณ 40 μg โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 ที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 10 นาที เป็นระยะเวลา 60 นาที แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมสัมพันธ์ (relative activity) กับปริมาณของสี พบว่า Reactive Green 19 ถูกฟอกจางสีได้ดีเมื่อใช้บัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 4, 5 และ 6) โดยมีค่ากิจกรรมสัมพันธ์เทียบเท่า 100% ในช่วงเวลา 60 นาที และมีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 6.43%, 3.94% และ 2.40% ตามลำดับ ใน

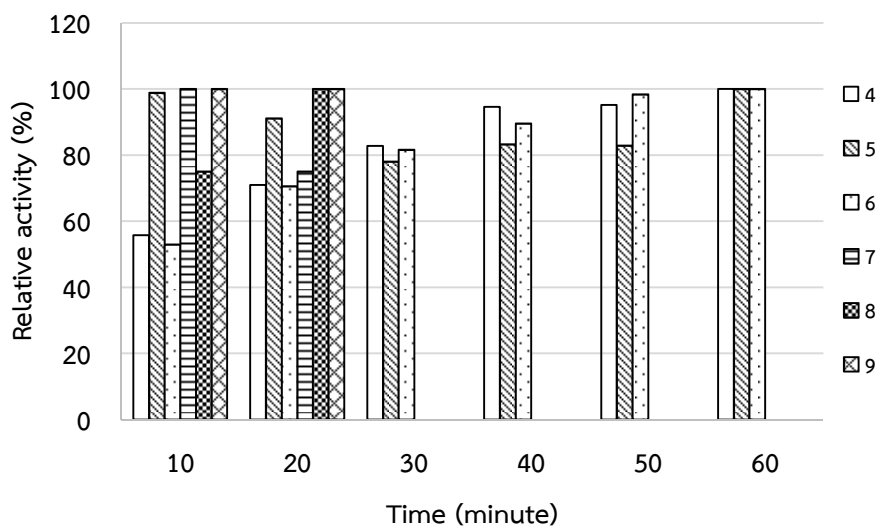
การฟอกจางสีโดยใช้บัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 7) มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 0.88% เทียบเท่ากิจกรรมสัมพันธ์ 100% ในเวลา 10 นาที ในขณะที่การใช้บัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl (pH 8 และ 9) มีค่ากิจกรรมสัมพันธ์ 100% ในเวลา 20 และ 10 นาที ตามลำดับ แต่ค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 1.09% และ 0.56% ตามลำดับ แสดงผลในรูปที่ 4.15 และ 4.16



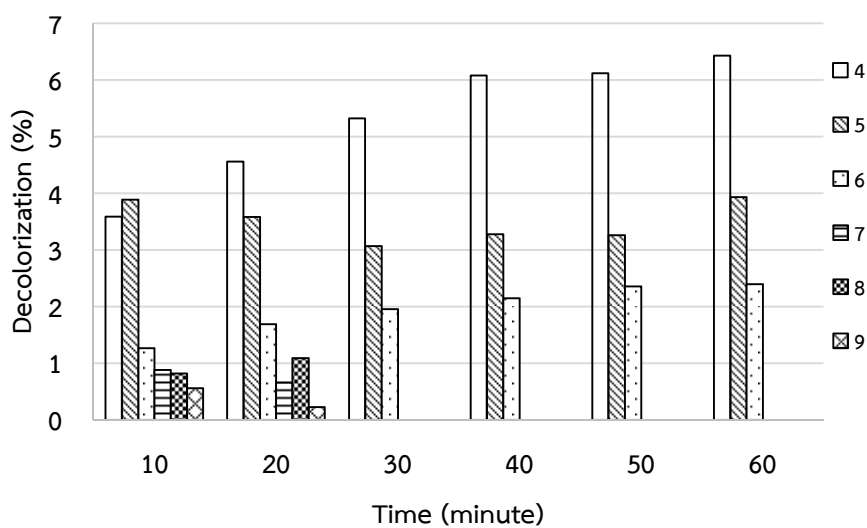
รูปที่ 4.13 กิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์หยาบแลคเคสในการฟอกจางสี Reactive Green 19 ปริมาณ 40 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเวลา 60 นาที อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.14 เปอร์เซนต์การฟอกจางสี Reactive Green 19 ปริมาณ 40 μg ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียสในเวลา 60 นาที โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต และ 0.1 M sodium acetate pH 4.5



รูปที่ 4.15 กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Reactive Green 19 ปริมาณ 40 μg ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 4, 5, 6 และ 7) และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl (pH 8 และ 9) เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.16 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Green 19 ปริมาณ 40 μg ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 4, 5, 6 และ 7) และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl (pH 8 และ 9) เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

4.1.3 การทดสอบสภาวะการฟอกจางสี Indigo carmine โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส

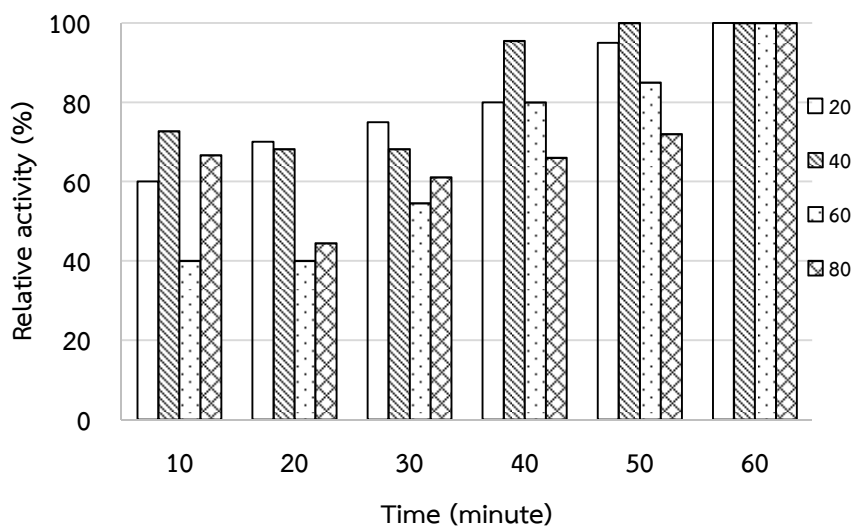
4.1.3.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของสี Indigo carmine

การศึกษาการฟอกจางสี Indigo carmine ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยการปรับเปลี่ยนปริมาณ 20, 40, 60 และ 80 μg ของสี Indigo carmine โดยใช้เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 10 นาที เป็นระยะเวลา 60 นาที แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity) กับปริมาณของสี Indigo carmine 20, 60 และ 80 μg พบว่าปริมาณสีย้อมที่มีกิจกรรมสัมพัทธ์ในการฟอกจางสีเท่ากับ 100 % ในเวลา 60 นาที ในขณะที่กิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 100 % ของสีย้อม Indigo carmine ปริมาณ 40 μg เกิดขึ้นที่เวลา 50 นาที ซึ่งปริมาณของสีย้อม Indigo carmine ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้กิจกรรมการฟอกจางสีเกิดลดลง เมื่อวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีพบว่าสอดคล้องกับกิจกรรมการฟอกจางสีเมื่อปริมาณสีย้อมเพิ่มขึ้น และใช้ระยะเวลาในการฟอกจางสีมากขึ้น ซึ่งผลการทดลองแสดงเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงสุดที่ระดับ 8.55% เมื่อใช้ปริมาณสีย้อมเท่ากับ 20 μg ในเวลา 60 นาที ในขณะที่การเพิ่มปริมาณสีเป็น 40, 60 และ 80 μg จะพบเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีได้สูงสุดที่ระดับ 4.88%, 3.96% และ 2.02% ตามลำดับ ในเวลาการทำปฏิกิริยา 60 นาที จากผลการทดลองพบว่าปริมาณของสีและเอนไซม์มีความสัมพันธ์กับระยะเวลาในการฟอกสี แสดงผลในรูปที่ 4.17 และ 4.18

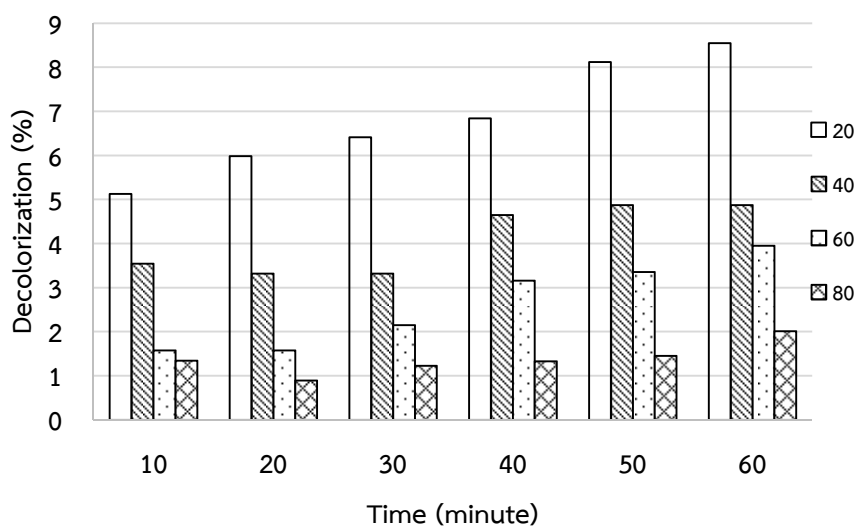
มีรายงานการใช้เอนไซม์แลคเคสจากเชื้อ *Coriopsis rigida* ในการฟอกจางสี Indigo carmine พบว่ามีประสิทธิภาพ 100% ภายในเวลา 4 ชั่วโมง และแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างของสีมีความจำเพาะต่อการทำงานของเอนไซม์แลคเคสในการฟอกจางสี (Gómez et al., 2005) และยากที่จะจำแนกเอนไซม์แลคเคสจากชนิดของสารตั้งต้น เนื่องจากเอนไซม์แลคเคสสามารถใช้สารตั้งต้นได้หลายชนิด นอกจากนั้นยังพบว่ากิจกรรมการฟอกจางสีของเอนไซม์ยังแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของเอนไซม์และโครงสร้างทางเคมีของสีย้อมที่ทำปฏิกิริยาเช่นกัน (Abadulla et al., 2000; Michniewicz et al., 2008)

4.1.3.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอนไซม์หยาบแลคเคส

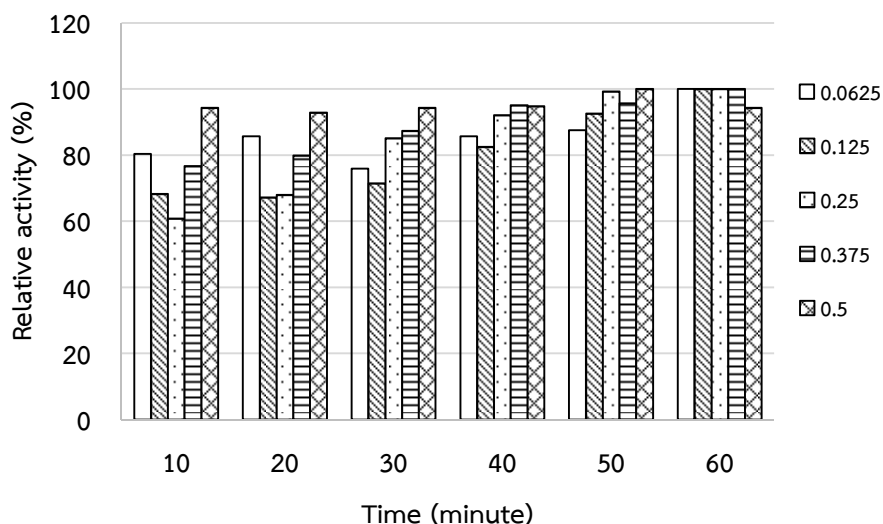
การศึกษาการฟอกจางสี Indigo carmine ปริมาณ 80 μg ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยการปรับเปลี่ยนปริมาณของเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 10 นาที เป็นระยะเวลา 60 นาที แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity) กับปริมาณของสี Indigo carmine พบว่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 100% ในเวลา 60 นาที เมื่อใช้เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25 และ 0.375 ยูนิต ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 1.12%, 1.89%, 2.78% และ 2.44% ตามลำดับ เมื่อทดสอบเพิ่มปริมาณเอนไซม์หยาบแลคเคสในการทำปฏิกิริยาฟอกจางสีเท่ากับ 0.5 ยูนิต พบว่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 100% ในเวลา 50 นาที และค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 2.10% แสดงผลในรูปที่ 4.19 และ 4.20



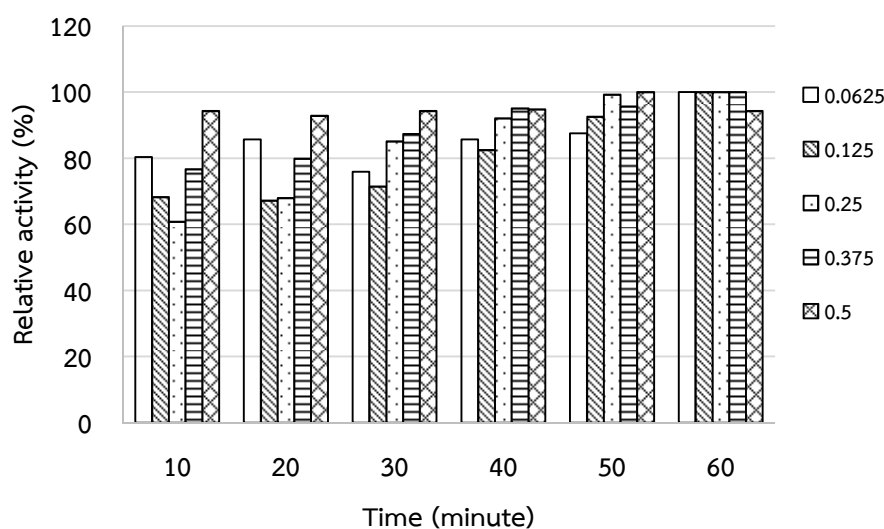
รูปที่ 4.17 กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์หยาบแลกเคสในการฟอกจางสี Indigo carmine ปริมาณ 20, 40, 60 และ 80 µg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลกเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.18 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Indigo carmine ปริมาณ 20, 40, 60 และ 80 µg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลกเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.19 กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Indigo carmine ปริมาณ 80 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.20 เปอร์เซนต์การฟอกจางสี Indigo carmine ปริมาณ 80 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

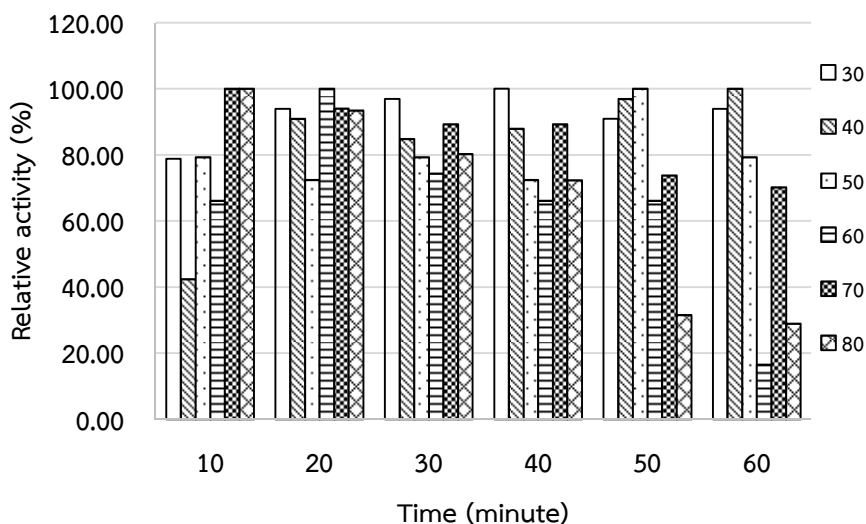
4.1.3.3 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วง 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส

การศึกษาการฟอกจางสี Indigo carmine ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในการฟอกจางสี Indigo carmine ปริมาณ 80 μg โดยใช้เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศา

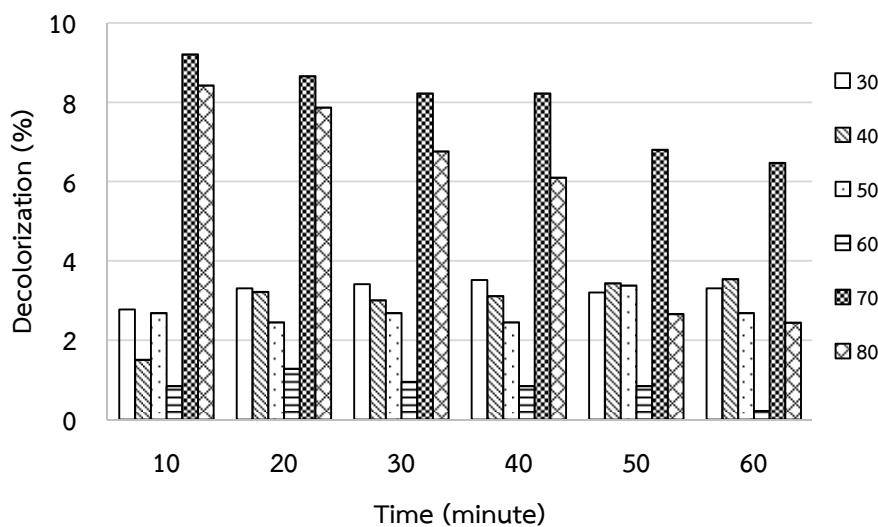
เซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 10 นาที เป็นระยะเวลา 60 นาที แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity) กับปริมาณของสี Indigo carmine พบว่าอุณหภูมิ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมสัมพัทธ์เทียบเท่า 100% ในช่วงเวลา 40, 50 และ 60 นาที และเทียบเท่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเฉลี่ยเท่ากับ 3.48% ในขณะที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เทียบเท่า 100% ในช่วงเวลา 20 นาที และเทียบเท่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 1.28% แต่ที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เทียบเท่า 100% ในเวลา 10 นาที เทียบเท่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 9.21% และ 8.43% ตามลำดับ และมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาการฟอกจางสีเพิ่มขึ้น แสดงผลในรูปที่ 4.21 และ 4.22

4.1.3.4 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่าง (พีเอช) 4, 5, 6, 7, 8 และ 9

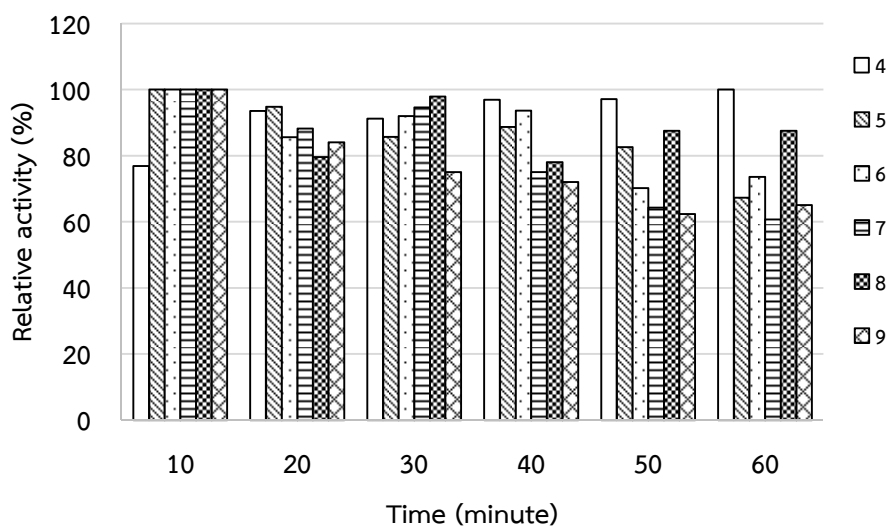
การศึกษาการฟอกจางสี Indigo carmine ปริมาณ 80 μg โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 หน่วย ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 ที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 10 นาที เป็นระยะเวลา 60 นาที แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity) กับปริมาณของสี พบว่า Indigo carmine ถูกฟอกจางสีได้ดีเมื่อใช้ 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 4) โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 3.42% เมื่อใช้ระยะเวลาการฟอกจางสี 60 นาที เทียบเท่ากิจกรรมสัมพัทธ์ 100% และการใช้บัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 (pH 5, 6 และ 7) และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl (pH 8 และ 9) มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 3.27%, 2.99%, 2.80%, 1.26% และ 1.0% ตามลำดับ ในเวลา 10 นาที และมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น และค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 100% ในช่วงเวลา 10 นาที เมื่อเปรียบเทียบการใช้บัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชสูงขึ้น พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีมีค่าลดลง แสดงในรูปที่ 4.23 และ 4.24



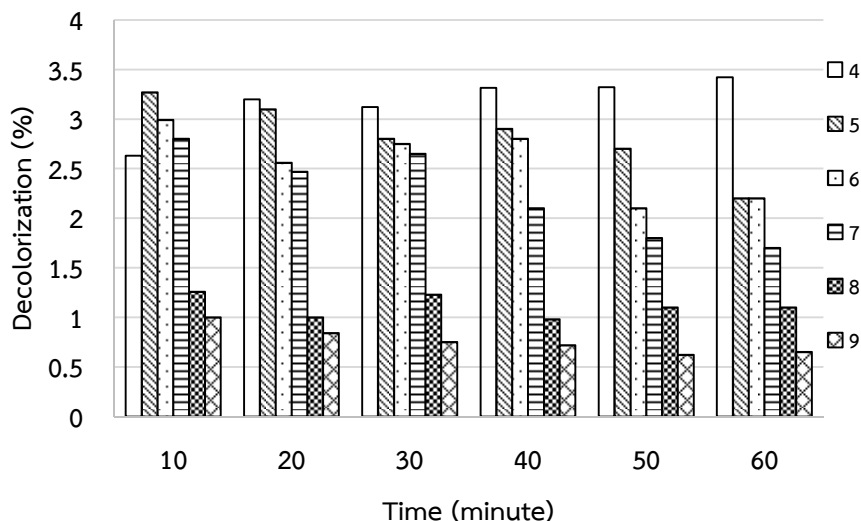
รูปที่ 4.21 กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์หยาบแลคเคสในการฟอกจางสี Indigo carmine ปริมาณ 80 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในเวลา 60 นาที อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.22 เปอร์เซนต์การฟอกจางสี Indigo carmine ปริมาณ 80 μg ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียสในเวลา 60 นาที โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต และ 0.1 M sodium acetate pH 4.5



รูปที่ 4.23 กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Indigo carmine ปริมาณ 80 μg ในสารละลาย 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.24 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Indigo carmine ปริมาณ 80 μg ในสารละลาย 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 เวลา 60 นาที อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

4.1.4 การทดสอบสถานะการฟอกจางสี Reactive Orange 16 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส

4.1.4.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของสี Reactive Orange 16

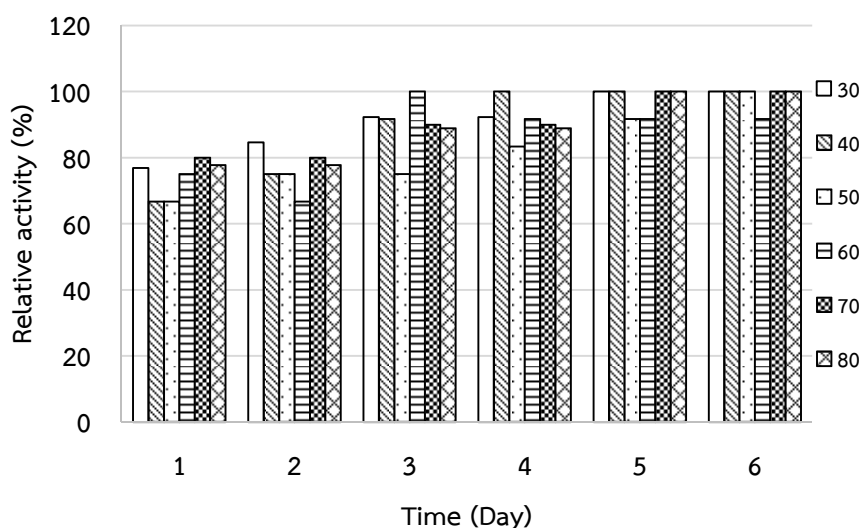
การศึกษาการฟอกจางสี Reactive Orange 16 ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยการปรับเปลี่ยนปริมาณปริมาณ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 μg ของสี Reactive Orange 16 โดยใช้เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 1 วัน เป็นระยะเวลา 6 วัน แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมสัมพันธ์ (relative activity) กับปริมาณของสี Reactive Orange 16 พบว่าปริมาณสีย้อมปริมาณ 30-80 μg ทำให้เกิดกิจกรรมสัมพันธ์ในการฟอกจางสีเท่ากับ 100% และเทียบเท่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเฉลี่ยเท่ากับ 0.12% ในเวลาเฉลี่ย 4-6 วัน ซึ่งกิจกรรมการฟอกจางสีมีค่าต่ำมาก ทำให้ผลของการฟอกจางสีไม่ชัดเจนแสดงผลในรูปที่ 4.25 และ 4.26 อาจเนื่องจากความจำเพาะของเอนไซม์และโครงสร้างของสีย้อมทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาช้า รายงานการใช้เอนไซม์แลคเคสบริสุทธิ์จากเชื้อ *Trametes modesta* ในการทดสอบการฟอกจางสี Reactive Orange 16 พบว่าไม่เกิดการฟอกจางสี (Tauber et al., 2008).

4.1.4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอนไซม์หยาบแลคเคส

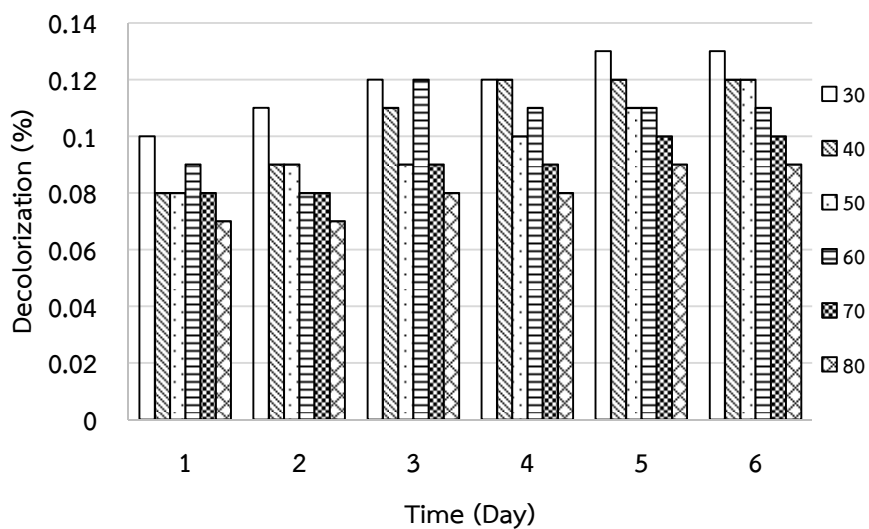
การศึกษาการฟอกจางสี Reactive Orange 16 ปริมาณ 80 μg ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยการปรับเปลี่ยนปริมาณของเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 1 วัน เป็นระยะเวลา 6 วัน แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมสัมพันธ์ (relative activity) กับปริมาณของสี Reactive Orange 16 พบว่ากิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ 100% ในวันที่ 5-6 เมื่อใช้เอนไซม์หยาบ

แลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต ในการฟอกจางสี พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี เท่ากับ 0.13%, 0.23%, 0.26% และ 0.09% ตามลำดับ แสดงผลในรูปที่ 4.27 และ 4.28

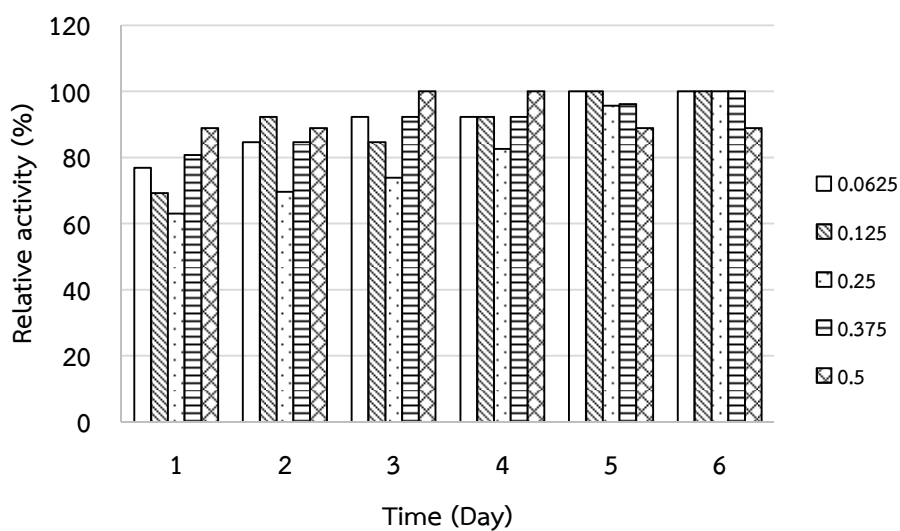
รายงานการศึกษาของ Ong และคณะในปี 2007 ได้รายงานวิธีการกำจัดสีย้อม Reactive Orange 16 โดยการอาศัยตัวดูดซับ สามารถทำได้โดยการใช้สารเคมีเปลี่ยนสภาพของพื้นผิววัสดุ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซับ เช่น การใช้ ethylenediamine ในการเปลี่ยนสภาพพื้นผิวของเปลือกข้าว สามารถดูดซับสีย้อม Reactive Orange 16 ได้สูงถึง 99% (Ong et al., 2007) หรือการใช้สีย้อมผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ *Shewanella algae* และ *S. marisflavi* ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์ พบว่า *S. algae* และ *S. marisflavi* สามารถฟอกจางสี Reactive Orange 16 ได้ 21.1 % และ 19.7 % ตามลำดับ (Liu et al., 2013)



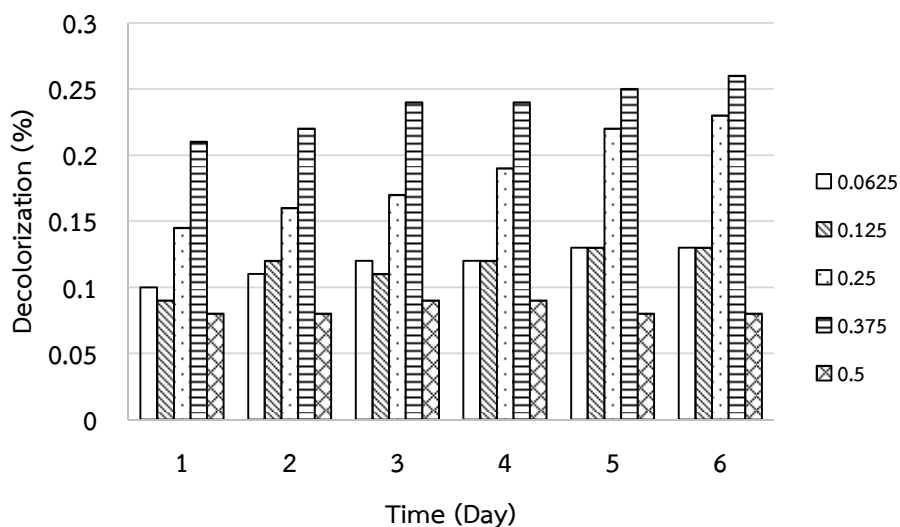
รูปที่ 4.25 กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Reactive Orange 16 ปริมาณ ในสารละลาย 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4.5 เวลา 6 วัน อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.26 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Orange 16 ปริมาณ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 µg ในสารละลาย 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4.5 เวลา 6 วัน อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.27 กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Reactive Orange ปริมาณ 80 µg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต เวลา 6 วัน อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.28 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Orange ปริมาณ 80 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต เวลา 6 วัน อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

4.1.4.3 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วง 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส

การศึกษาการฟอกจางสี Reactive Orange 16 ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในการฟอกจางสี Reactive Orange 16 ปริมาณ 80 μg โดยใช้เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 1 วัน เป็นระยะเวลา 6 วัน แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมสัมพันธ์ (relative activity) กับปริมาณของสี Reactive Orange 16 พบว่าอุณหภูมิ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมสัมพันธ์เทียบเท่า 100% ในช่วงเวลา 4-5 วัน และเทียบเท่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเฉลี่ยเท่ากับ 0.13% ในขณะที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพันธ์เทียบเท่า 100% ในช่วงเวลา 6 วัน และเทียบเท่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 0.26% ในขณะที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพันธ์เทียบเท่า 100% ในเวลา 6 วัน เทียบเท่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 0.05% ซึ่งอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ไม่สามารถฟอกจางสี Reactive Orange 16 แสดงผลในรูปที่ 4.29 และ 4.30

4.1.4.4 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่าง (พีเอช) 4, 5, 6, 7, 8 และ 9

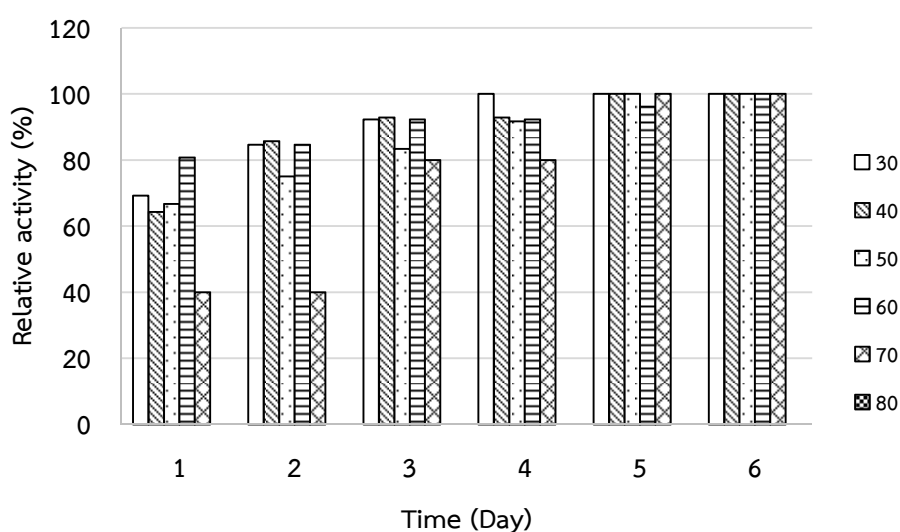
ผลการศึกษาการฟอกจางสี Reactive Orange 16 ปริมาณ 80 μg และ เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 ที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 1 วัน เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่าเอนไซม์หยาบแลคเคสฟอกจางสี Reactive Orange 16 ได้ในเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีต่ำ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.13% ในบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5 และ 6 และมีค่ากิจกรรมสัมพันธ์เทียบเท่า 100% ในช่วงเวลา 5-6 วัน และการใช้บัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 7 และ 0.1 M Tris-HCl pH 8 พบว่า

เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีต่ำ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.03% แต่เมื่อใช้บัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 9 ไม่สามารถฟอกจางสี Reactive Orange 16 ได้ แสดงผลในรูปที่ 4.31 และ 4.32

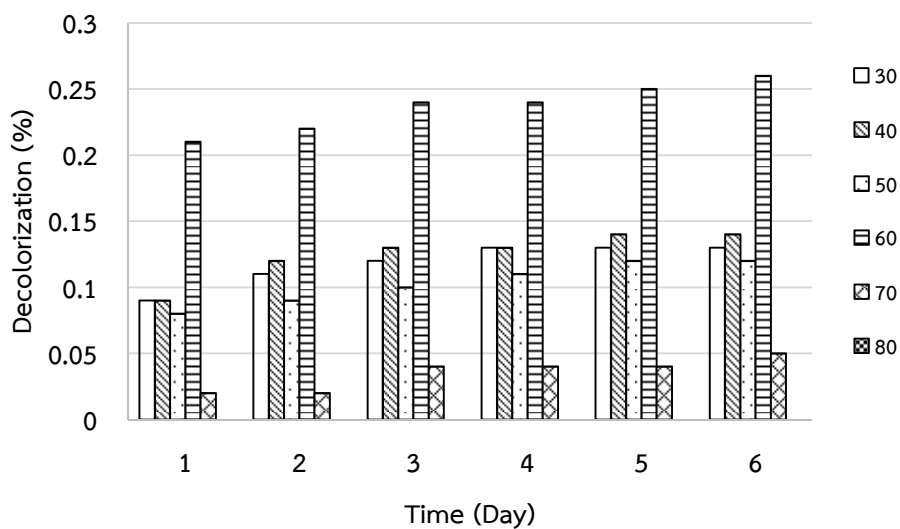
4.1.5 การทดสอบสภาวะการฟอกจางสี Acid Green 27 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส

4.1.5.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของสี Acid Green 27

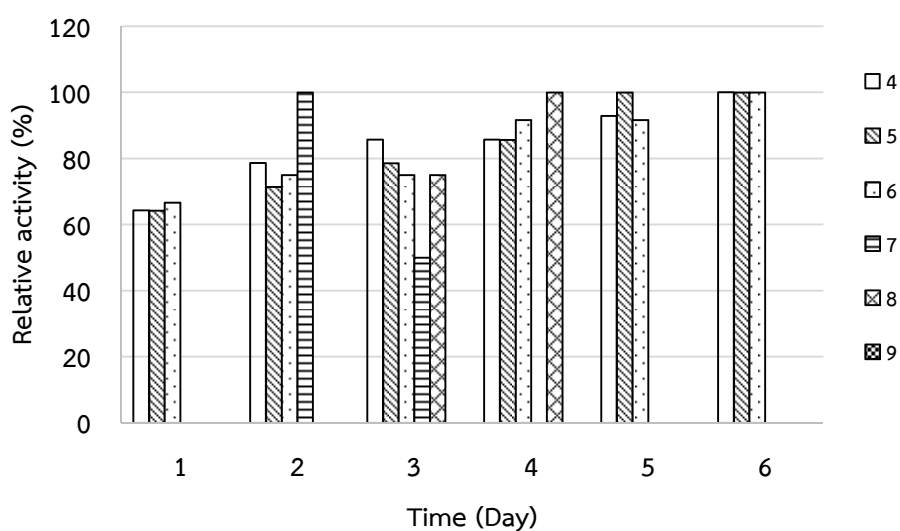
การศึกษาการฟอกจางสี Acid Green 27 ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยการปรับเปลี่ยนปริมาณ 20, 30, 40, 50 และ 60 μg ของสี Acid Green 27 โดยใช้เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 1 วัน เป็นระยะเวลา 6 วัน แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity)



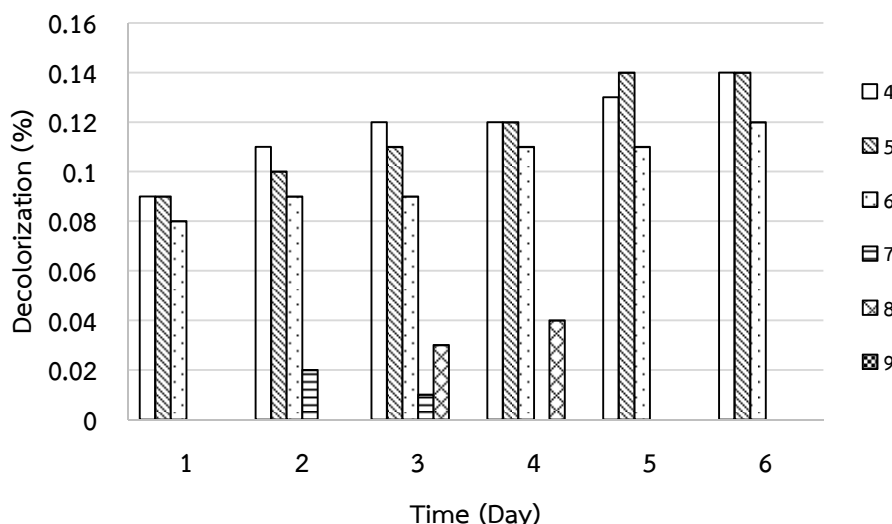
รูปที่ 4.29 กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Reactive Orange 16 ปริมาณ 80 μg ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียสในเวลา 6 วัน โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต และ 0.1 M sodium acetate pH 4.5



รูปที่ 4.30 เปอร์เซนต์การฟอกจางสี Reactive Orange 16 ปริมาณ 80 μg ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียสในเวลา 6 วัน โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต และ 0.1 M sodium acetate pH 4.5



รูปที่ 4.31 กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Reactive Orange 16 ปริมาณ 80 μg ในสารละลายฟิเอช 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 เวลา 6 วัน อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.32 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Orange 16 ปริมาณ 80 μg ในสารละลายพีเอช 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 เวลา 6 วัน อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

กับปริมาณของสี Acid Green 27 พบว่ากิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ 100 % เมื่อทำการฟอกจางสีในเวลา 6 วัน เมื่อใช้สีย้อม Acid Green 27 ปริมาณ 20, 30 และ 40 μg และเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 18.45%, 26.51% และ 17.25% ตามลำดับ เมื่อเพิ่มปริมาณสีย้อมเท่ากับ 50 และ 60 μg พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีลดลงเท่ากับ 11.94% และ 11.56% ตามลำดับ แสดงผลในรูปที่ 4.33 และ 4.34

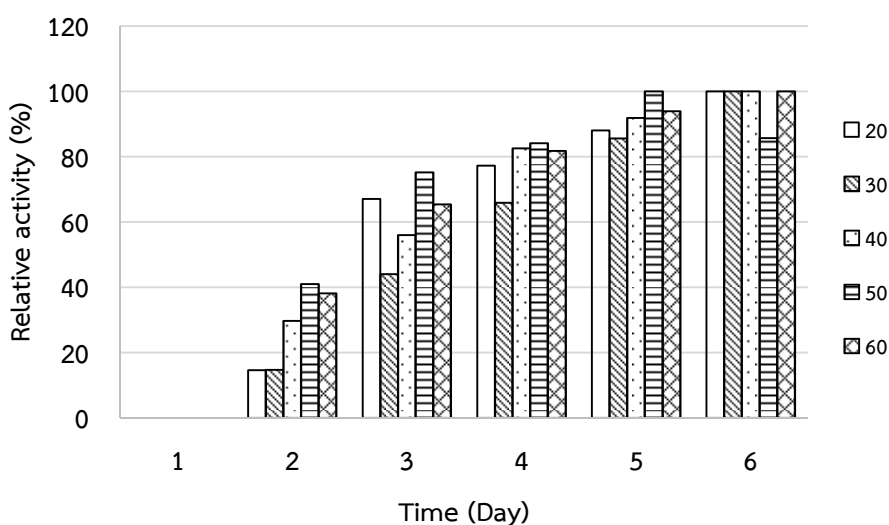
4.1.5.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอนไซม์หยาบแลคเคส

การศึกษาการฟอกจางสี Acid Green 27 ปริมาณ 30 μg โดยปรับเปลี่ยนปริมาณของเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 1 วัน เป็นระยะเวลา 6 วัน แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity) กับปริมาณของสี Acid Green 27 พบว่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์กับเท่ากับ 100 % เมื่อทำการฟอกจางสีในเวลา 6 วัน เมื่อใช้เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 8.12%, 24.12%, 24.98%, 12.41% และ 10.88% ตามลำดับ แสดงผลในรูปที่ 4.35 และ 4.36

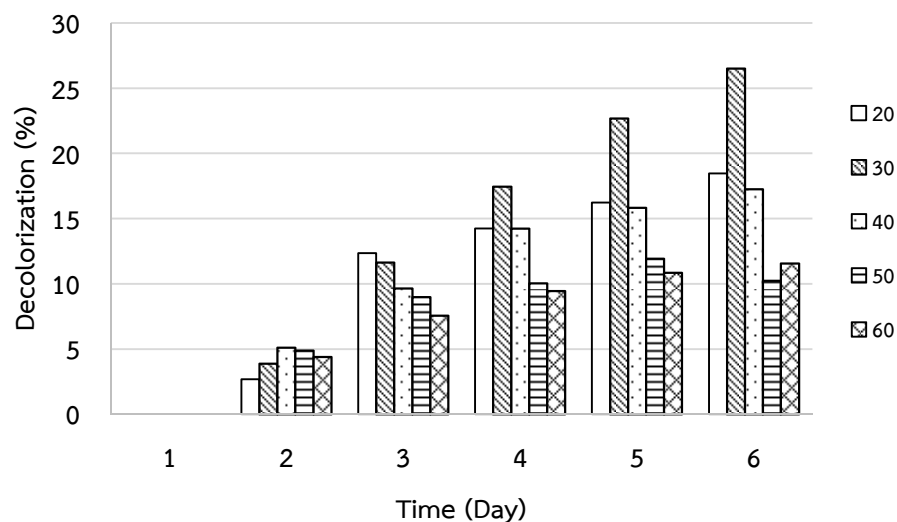
4.1.5.3 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วง 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส

การศึกษาการฟอกจางสี Acid Green 27 ปริมาณ 30 μg โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ที่สภาวะอุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 1 วัน เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่า Acid Green 27 ถูกฟอกจางสีได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 25.84% เมื่อใช้ระยะเวลาการฟอกจางสี 6 วัน เทียบเท่ากับกิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 100% ในขณะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 100% และมีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี 23.69% ในวันที่ 6 ของการฟอกจางสีซึ่งเป็น

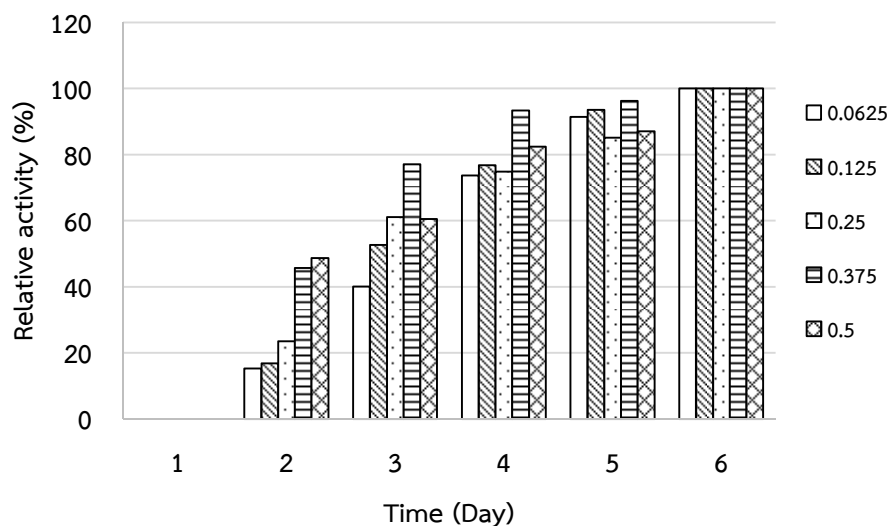
ค่าสูงสุด และเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้อุณหภูมิ 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส มีค่าเทียบเท่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 100% ในวันที่ 6 ของการฟอกจางสี และมีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงที่สุดในวันที่ 6 เท่ากับ 22.12%, 20.6%, 18.34% และ 12.76% ตามลำดับ พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นทำให้เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีมีค่าลดลง และเมื่อระยะเวลาการฟอกจางสีเพิ่มขึ้นส่งผลให้มีการฟอกจางสีได้ดีขึ้น การลดลงค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจากอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้น ทำให้โครงสร้างโปรตีนเกิดการเสียสภาพ ส่งผลให้กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์หยابแลคเคสลดลง แสดงผลในรูปที่ 4.37 และ 4.38



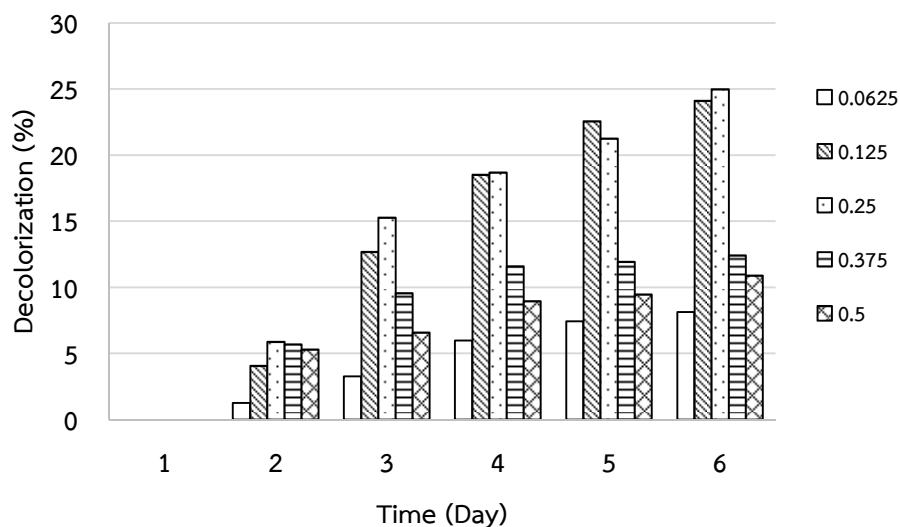
รูปที่ 4.33 กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Acid Green 27 ปริมาณ 20, 30, 40, 50 และ 60 µg ในสารละลายฟอสเฟต 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร



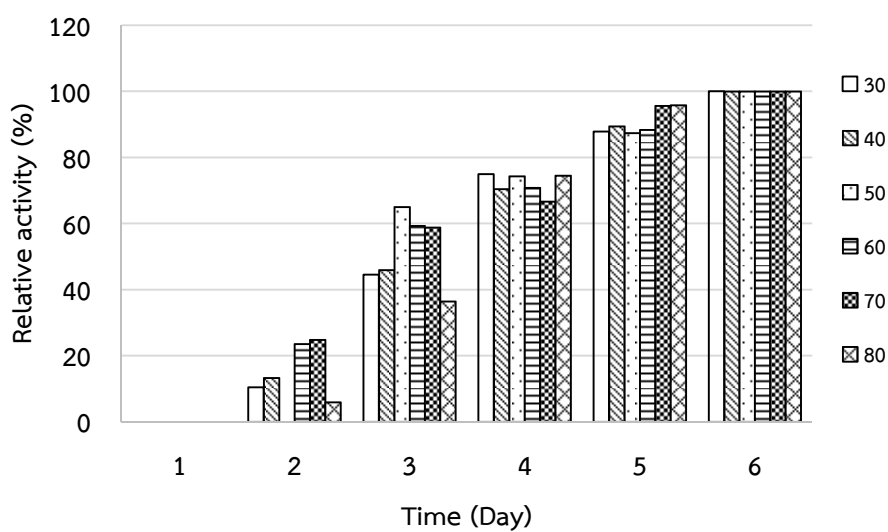
รูปที่ 4.34 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid Green 27 ปริมาณ 20, 30, 40, 50 และ 60 µg ในสารละลายฟิเอช 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร



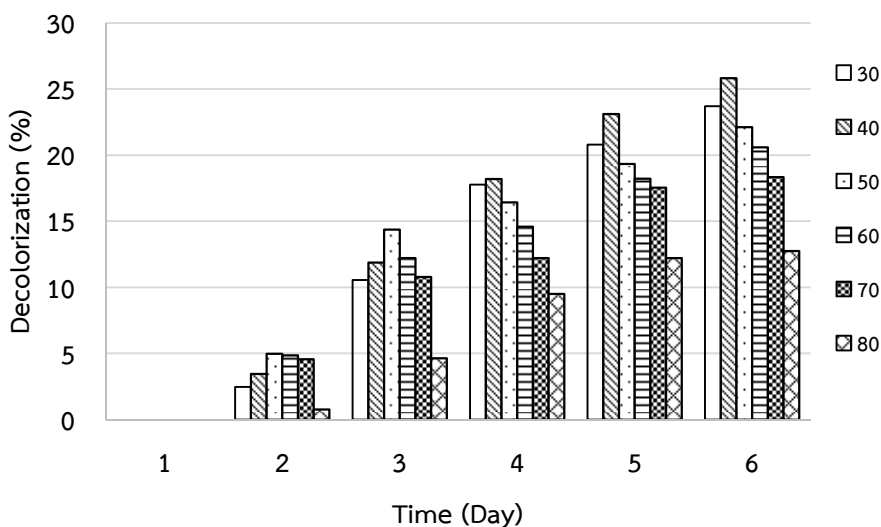
รูปที่ 4.35 กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Acid Green 27 ปริมาณ 30 µg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต เวลา 6 วัน อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.36 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid Green 27 ปริมาณ 30 μg ใน 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต เวลา 6 วัน อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.37 กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Acid Green 27 ปริมาณ 30 μg ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ในเวลา 6 วัน โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต และ 0.1 M sodium acetate pH 4.5



รูปที่ 4.38 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid Green 27 ปริมาณ 30 µg ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ในเวลา 6 วัน โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต และ 0.1 M sodium acetate pH 4.5

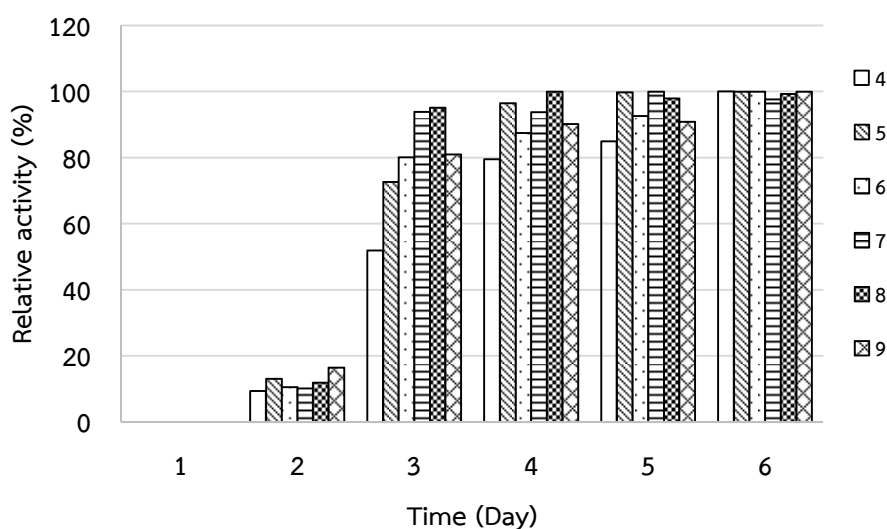
4.1.5.4 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่าง (พีเอช) 4, 5, 6, 7, 8 และ 9

ผลการศึกษาการฟอกจางสี Acid Green 27 ปริมาณ 80 µg และ เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 ที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 1 วัน เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่า Acid Green 27 ถูกฟอกจางได้ดีในบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH (4 และ 5) มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 24.45% และ 22.66% ตามลำดับ เมื่อใช้ระยะเวลาการฟอกจางสี 6 วัน เทียบเท่ากิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ 100% เมื่อทำการฟอกจางสีด้วยบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH (6 และ 7) มีค่ากิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ 100% เมื่อใช้ระยะเวลาการฟอกจางสี 6 วัน และมีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 18.78% และ 17.80% ตามลำดับ เมื่อทำการฟอกจางสีด้วยบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl (pH 8 และ 9) มีค่ากิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ 100% เมื่อใช้ระยะเวลาการฟอกจางสี 6 วัน และมีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 16.23% และ 11.32% ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้บัฟเฟอร์พีเอช 4-9 ในการฟอกจางสี พบว่าการเพิ่มของพีเอชในสารละลายบัฟเฟอร์ทำให้เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีมีค่าลดลง แสดงผลในรูปที่ 4.39 และ 4.40

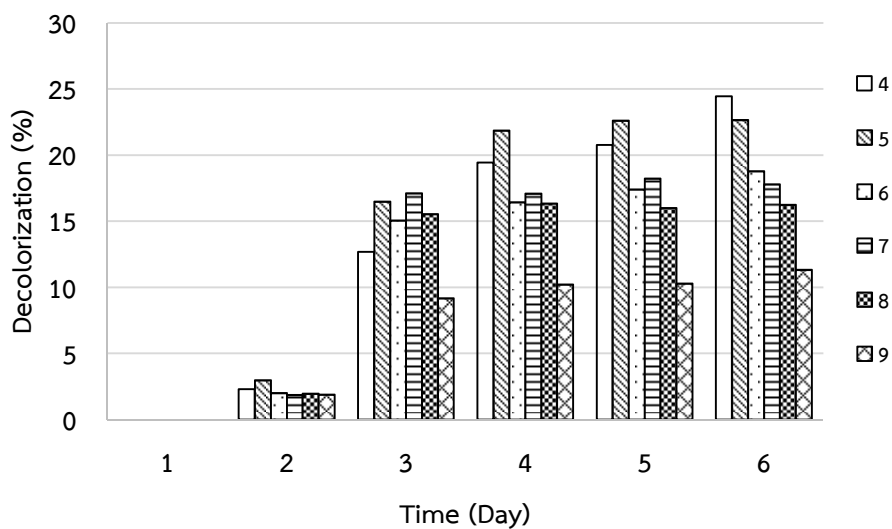
4.1.6 การทดสอบสภาวะการฟอกจางสี Alizarin Red ของเอนไซม์หยาบแลคเคส

4.1.6.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของสี Alizarin Red

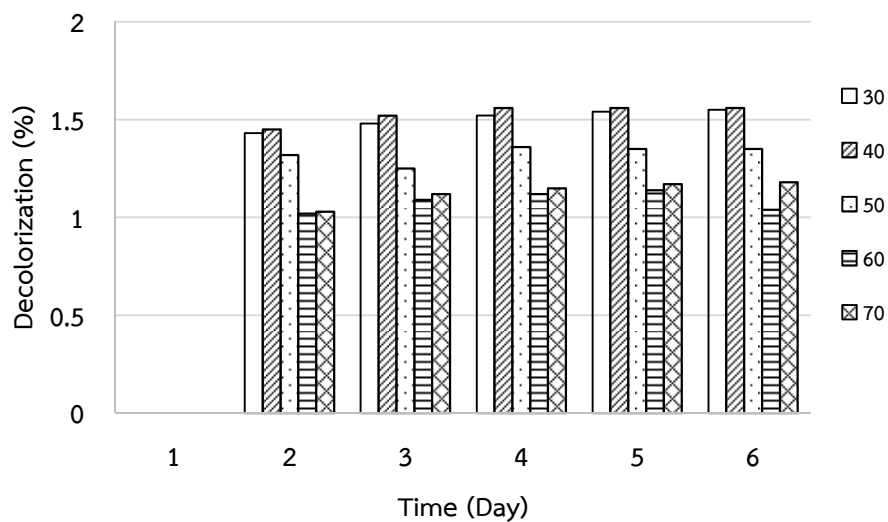
การศึกษาการฟอกจางสี Alizarin Red ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยการปรับเปลี่ยนปริมาณ 30, 40, 50, 60 และ 70 μg ของสี Alizarin Red โดยใช้เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 1 วัน เป็นระยะเวลา 6 วัน แล้วทำการวิเคราะห์หากิจกรรมสัมพันธ์ (relative activity) กับปริมาณของสี Alizarin Red พบว่าปริมาณสีย้อมที่มีกิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ 100 % เมื่อใช้สีย้อม Alizarin Red ปริมาณ 30, 40 และ 50 μg มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 1.55%, 1.56% และ 1.36% ตามลำดับ เมื่อทำการฟอกจางสีในเวลา 6 วัน เมื่อเพิ่มปริมาณสีย้อมเท่ากับ 60 และ 70 μg พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีลดลงเท่ากับ 1.14% และ 1.18% ตามลำดับ แสดงผลในรูปที่ 4.41 และ 4.42



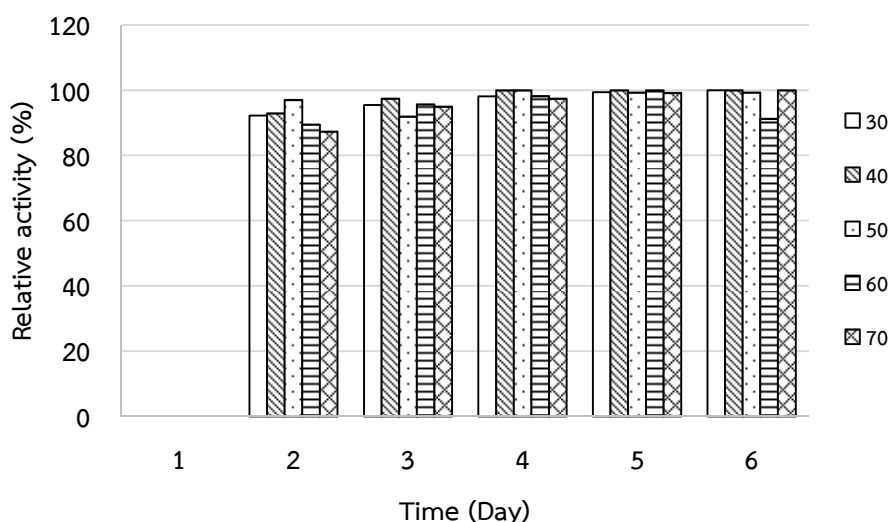
รูปที่ 4.39 กิจกรรมสัมพันธ์การฟอกจางสี Acid Green 27 ปริมาณ 30 μg ในสารละลาย 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.40 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid Green 27 ปริมาณ 30 μg ในสารละลาย 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลกเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.41 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Alizarin Red ปริมาณ 30, 40, 50, 60 และ 70 μg ในสารละลาย 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4.5 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลกเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.42 กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Alizarin Red ปริมาณ 30, 40, 50, 60 และ 70 µg ในสารละลาย 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4.5 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิ ตต่อมิลลิลิตร

4.1.6.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอนไซม์หยาบแลคเคส

การศึกษาการฟอกจางสี Alizarin Red ปริมาณ 50 µg โดยปรับเปลี่ยนปริมาณของเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิ ต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 1 วัน เป็นระยะเวลา 6 วัน แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity) กับปริมาณของสี Alizarin Red พบว่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์กับเท่ากับ 100 % เมื่อทำการฟอกจางสีในเวลา 6 วัน เมื่อใช้เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125, 0.25 และ 0.375 ยูนิ ต ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 1.44%, 2.58% และ 3.51% ตามลำดับ ในขณะที่การใช้เอนไซม์ 0.5 ยูนิ ต มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 4.25% เมื่อทำการฟอกจางสีในเวลา 2 วัน มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์กับเท่ากับ 100 % แสดงผลในรูปที่ 4.43 และ 4.44

4.1.6.3 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วง 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส

การศึกษาการฟอกจางสี Alizarin Red ปริมาณ 50 µg โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิ ต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ที่สภาวะอุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 1 วัน เป็นระยะเวลา 6 วัน แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity) กับปริมาณของสี Alizarin Red พบว่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์กับเท่ากับ 100 % เมื่อทำการฟอกจางสีในเวลา 5 วัน เมื่อใช้อุณหภูมิ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 1.24%, 1.32% และ 1.55% เมื่อทำการฟอกจางสีในระยะเวลา 6 วัน สภาวะอุณหภูมิ 60 และ 80 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดกิจกรรมสัมพัทธ์ 100% เทียบเท่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 1.55% และ 1.01% ในกรณีที่ใช้สภาวะอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 1.45% แสดงผลในรูปที่ 4.45 และ 4.46

4.1.6.4 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่าง (พีเอช) 4, 5, 6, 7, 8 และ 9

ผลการศึกษาการฟอกจางสี Alizarin Red ปริมาณ 50 μg และ แอนไอโซมัยยาบลาคเคส 0.125 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 ที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 1 วัน เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่า Alizarin Red ถูกฟอกจางได้ดีในบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH (4 และ 5) มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี 100% เมื่อใช้ระยะเวลาการฟอกจางสี 3 และ 1 วัน ตามลำดับ และมีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 3.65% และ 3.34% ตามลำดับ เมื่อใช้ระยะเวลาการฟอกจางสี 6 วัน เทียบเท่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 100% ในขณะที่การใช้บัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH (6 และ 7) มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 100% เมื่อใช้ระยะเวลาการฟอกจางสี 6 วัน และมีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 1.34% และ 0.45% ตามลำดับ เมื่อทำการฟอกจางสีด้วยบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl (pH 8 และ 9) มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 100% และมีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 0.67% และ 0.88% ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้บัฟเฟอร์พีเอช 4-9 ในการฟอกจางสี พบว่าการเพิ่มของพีเอชในสารละลายบัฟเฟอร์ทำให้เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีมีค่าลดลง แสดงผลในรูปที่ 4.47 และ 4.48

4.1.7 การทดสอบสภาวะการฟอกจางสี Direct Blue 71 ของแอนไอโซมัยยาบลาคเคส

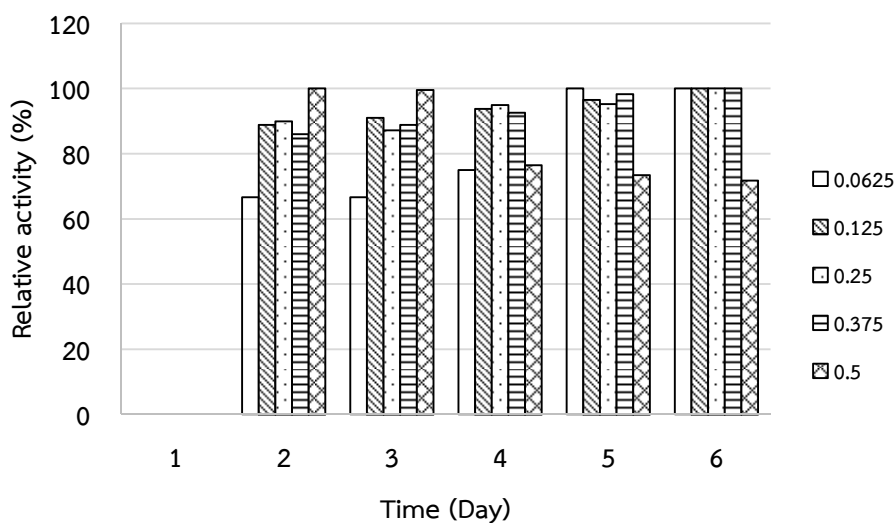
4.1.7.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของสี Direct Blue 71

การศึกษาการฟอกจางสี Direct Blue 71 ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยการปรับเปลี่ยนปริมาณ 60, 70, 80, 90 และ 100 μg ของสี Direct Blue 71 โดยใช้แอนไอโซมัยยาบลาคเคส 0.125 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 1 วัน เป็นระยะเวลา 6 วัน แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity) กับปริมาณของสี Direct Blue 71 พบว่าปริมาณสีย้อมที่มีกิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 100 % เมื่อใช้สีย้อม Direct Blue 71 ปริมาณ 70 และ 90 μg มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 0.14% และ 1.14% ตามลำดับ เมื่อทำการฟอกจางสีในเวลา 5 วัน เมื่อใช้สีย้อม Direct Blue 71 ปริมาณ 60 และ 80 μg พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 0.16% และ 0.15% ตามลำดับ และมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 100 % เมื่อทำการฟอกจางสีในเวลา 6 วัน เมื่อเพิ่มปริมาณสีย้อมเท่ากับ 100 μg พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีลดลงเท่ากับ 0.12% และมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 100 % เมื่อทำการฟอกจางสีในเวลา 3 วัน แสดงผลในรูปที่ 4.49 และ 4.50

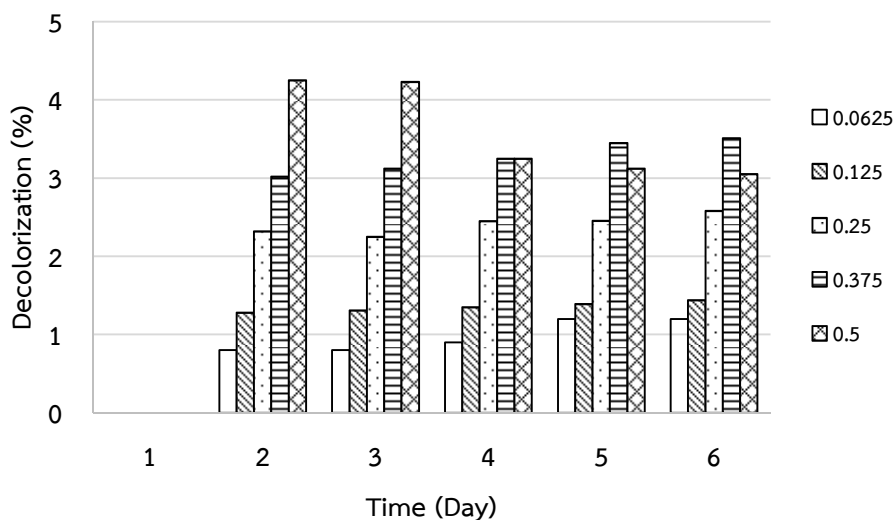
4.1.7.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอนไอโซมัยยาบลาคเคส

การศึกษาการฟอกจางสี Direct Blue 71 ปริมาณ 80 μg โดยปรับเปลี่ยนปริมาณของแอนไอโซมัยยาบลาคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 1 วัน เป็นระยะเวลา 6 วัน แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมสัมพัทธ์ (relative activity) กับปริมาณของสี Direct Blue 71 พบว่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของแอนไอโซมัยยาบลาคเคสเท่ากับ 100 % เมื่อทำการฟอกจางสีในเวลา 6 วัน เมื่อใช้แอนไอโซมัยยาบลาคเคส 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 0.14%, 0.15% และ

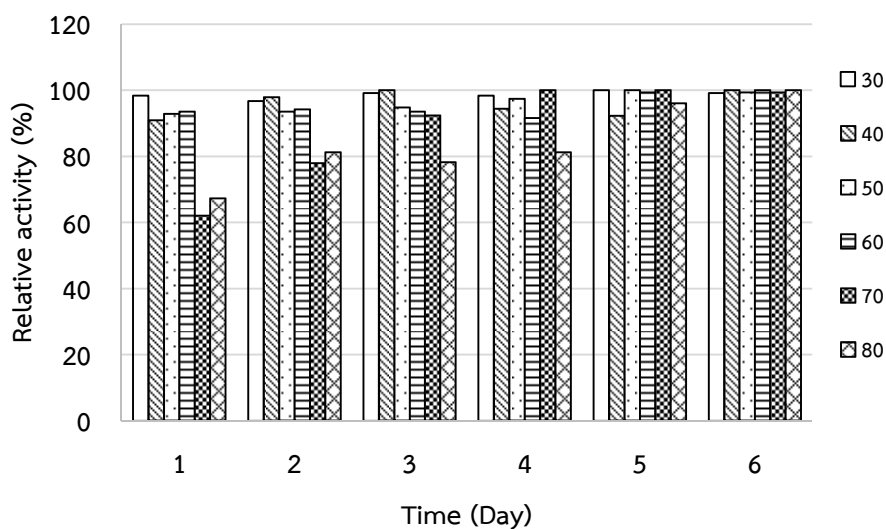
0.18% ตามลำดับ ในขณะที่การใช้เอนไซม์ 0.0625 ยูนิต มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 0.12% เมื่อทำการฟอกจางสีในเวลา 5 วัน มีค่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์กับเท่ากับ 100 % แสดงผลในรูปที่ 4.51 และ 4.52



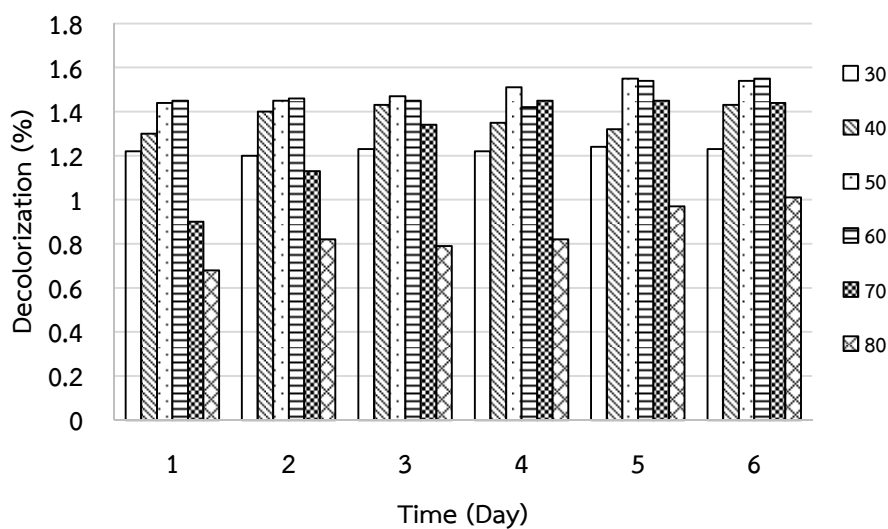
รูปที่ 4.43 กิจกรรมสัมพันธ์การฟอกจางสี Alizarin Red ปริมาณ 50 μg ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4.5 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต



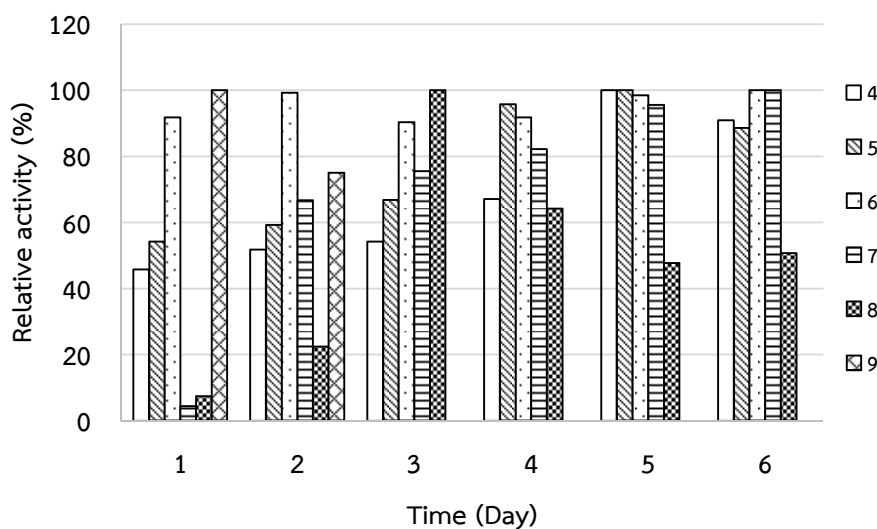
รูปที่ 4.44 เปอร์เซนต์การฟอกจางสี Alizarin Red ปริมาณ 50 μg ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4.5 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต



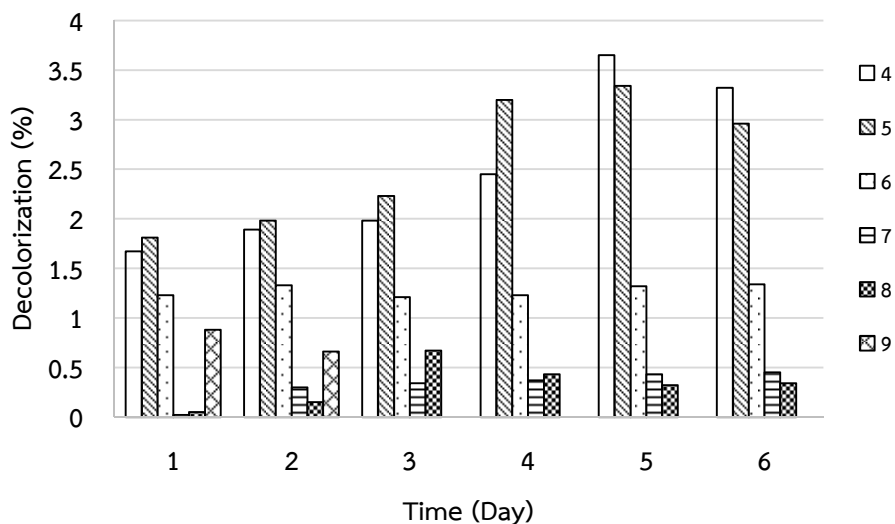
รูปที่ 4.45 กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Alizarin Red ปริมาณ 50 µg ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ในเวลา 6 วัน โดยเอนไซม์หยาบแลกเคส 0.125 ยูนิต และ 0.1 M sodium acetate pH 4.5



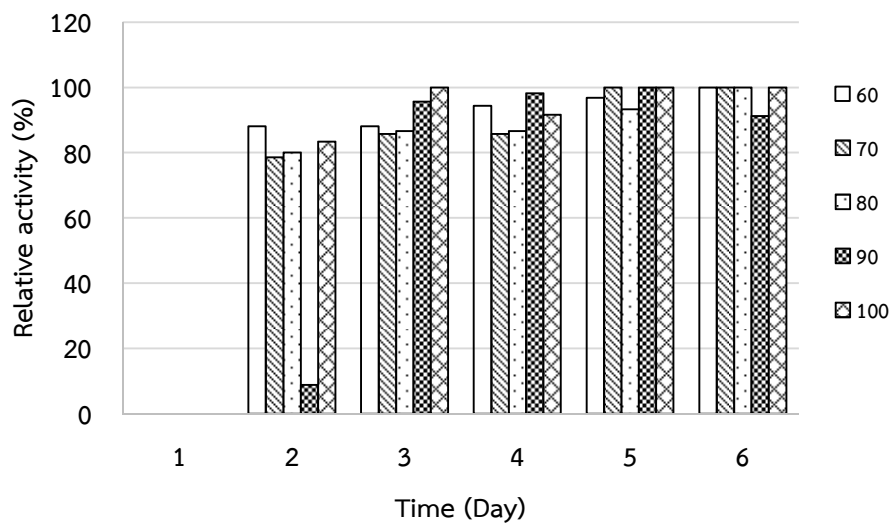
รูปที่ 4.46 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Alizarin Red ปริมาณ 50 µg ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ในเวลา 6 วัน โดยเอนไซม์หยาบแลกเคส 0.125 ยูนิต และ 0.1 M sodium acetate pH 4.5



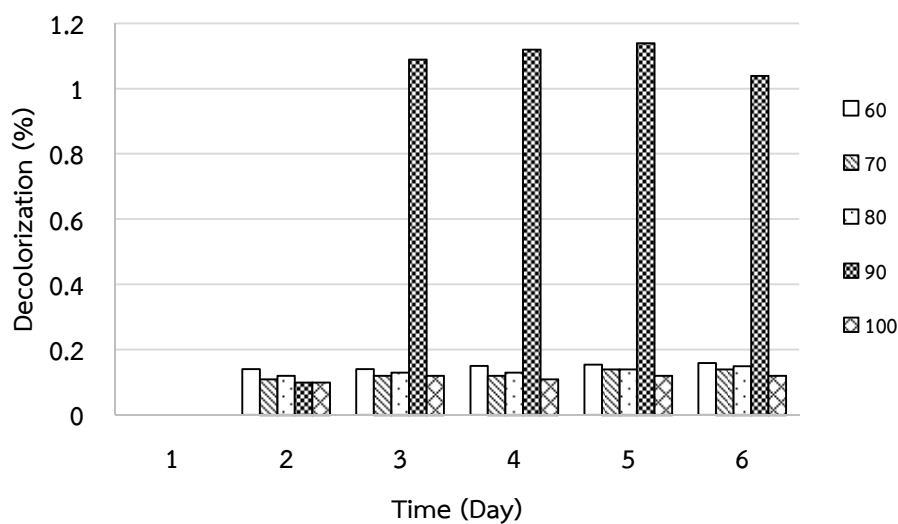
รูปที่ 4.47 กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Alizarin Red ปริมาณ 50 μg ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร



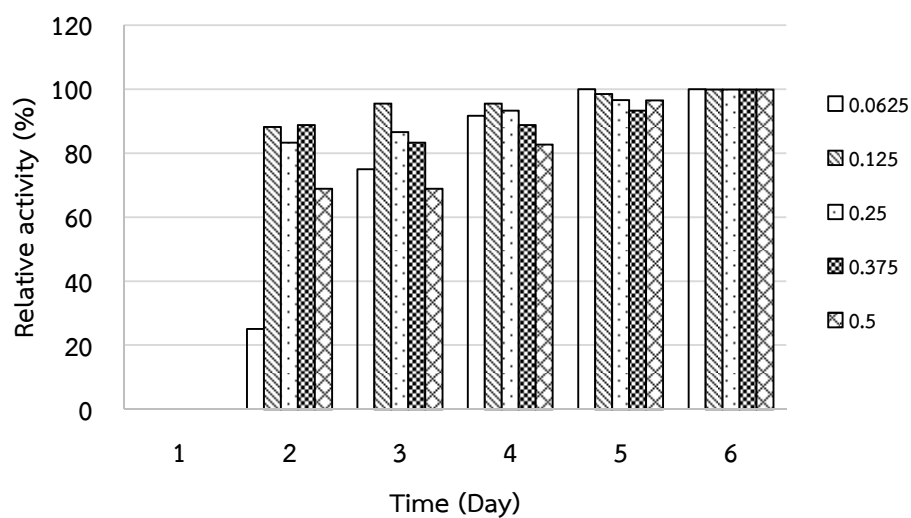
รูปที่ 4.48 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Alizarin Red ปริมาณ 50 μg ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร



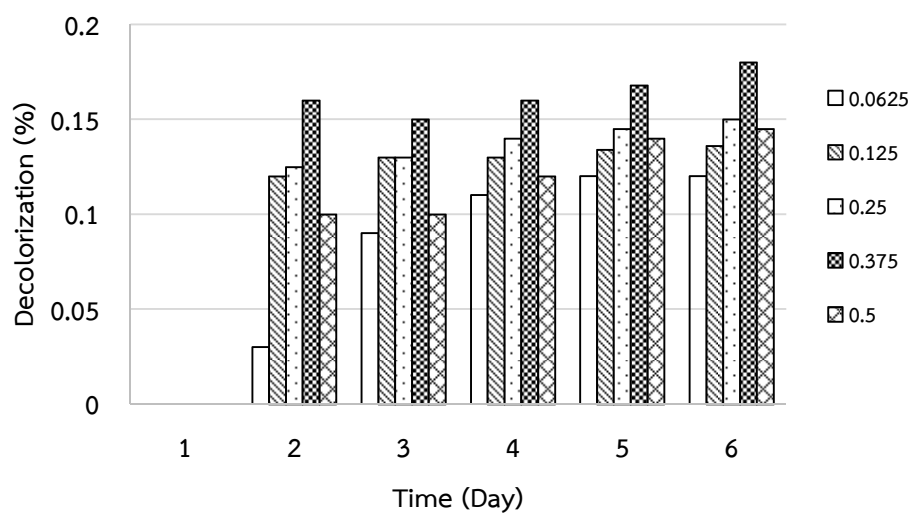
รูปที่ 4.49 กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Direct Blue 71 ปริมาณ 60, 70, 80, 90 และ 100 µg ในสารละลายฟีนอล 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4.5 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.50 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Direct Blue 71 ปริมาณ 60, 70, 80, 90 และ 100 µg ในสารละลายฟีนอล 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4.5 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.51 กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Direct Blue 71 ปริมาณ 80 μg ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4.5 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต



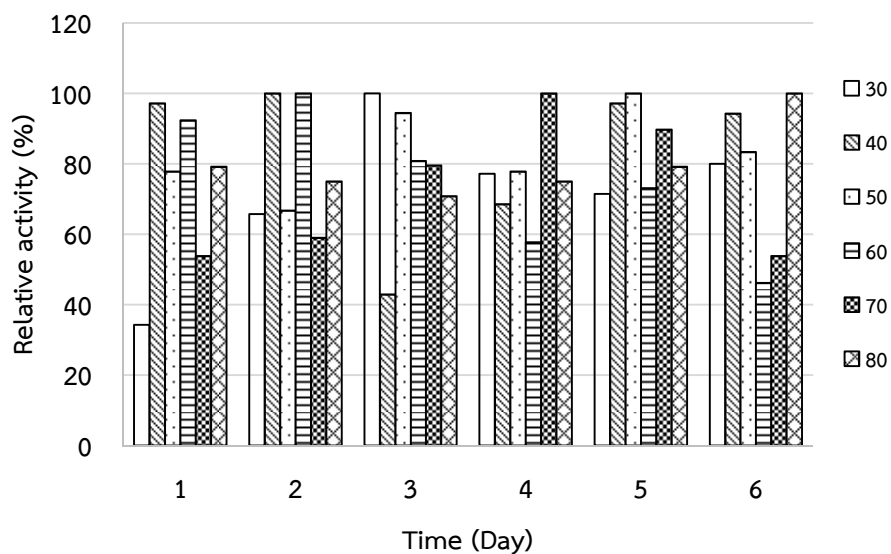
รูปที่ 4.52 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Direct Blue 71 ปริมาณ 80 μg ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4.5 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375 และ 0.5 ยูนิต

4.1.7.3 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วง 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส

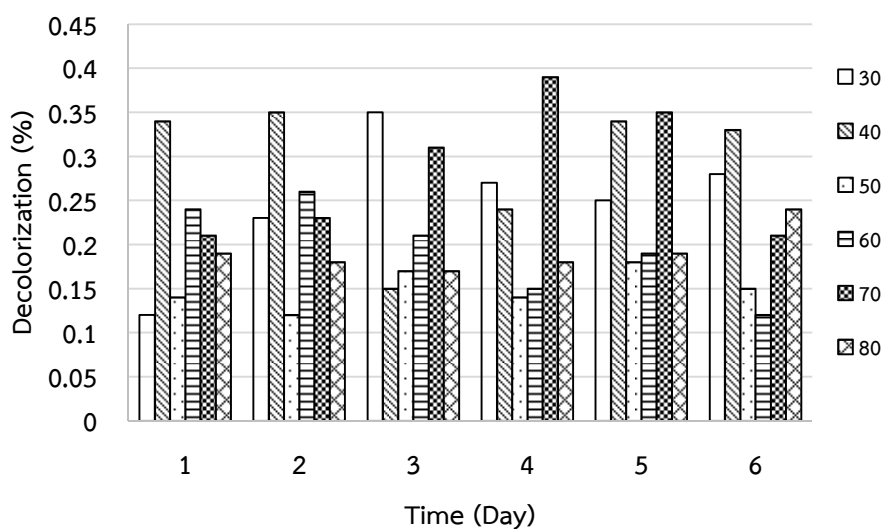
การศึกษาการฟอกจางสี Direct Blue 71 ปริมาณ 80 μg โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 ที่สภาวะอุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 1 วัน เป็นระยะเวลา 6 วัน แล้วทำการวิเคราะห์กิจกรรมสัมพันธ์ (relative activity) กับปริมาณของสี Direct Blue 71 พบว่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์กับเท่ากับ 100 % เมื่อทำการฟอกจางสีในเวลา 3 วัน เมื่อใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 0.34% เมื่อทำการฟอกจางสีในระยะเวลา 2 วัน สภาวะอุณหภูมิ 40 และ 60 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมสัมพันธ์ 100% เทียบเท่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 0.35% และ 0.26% ในกรณีที่ใช้สภาวะอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 0.39% มีค่ากิจกรรมสัมพันธ์ 100% ในช่วงเวลาการฟอกจางสี 4 วัน และสภาวะอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 0.24% แสดงผลในรูปที่ 4.53 และ 4.54

4.1.7.4 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่าง (พีเอช) 4, 5, 6, 7, 8 และ 9

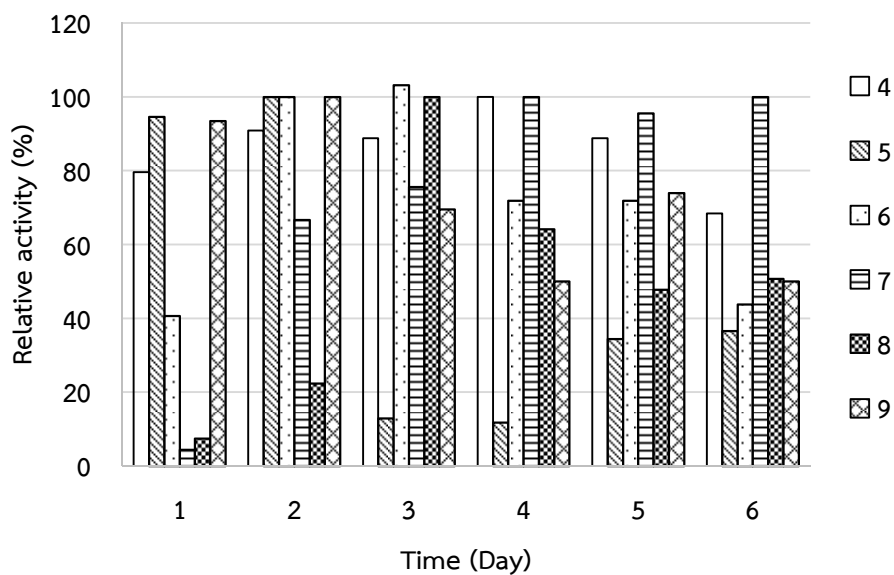
ผลการศึกษาการฟอกจางสี Direct Blue 71 ปริมาณ 80 μg และ เอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต ร่วมกับบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 ที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในช่วงเวลา 1 วัน เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่า Direct Blue 71 ทำการฟอกจางสีในบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH (4 และ 5) มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 0.98% และ 0.93% ตามลำดับ เมื่อใช้ระยะเวลาการฟอกจางสี 4 และ 2 วัน ตามลำดับ ในขณะที่การใช้บัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH (6 และ 7) มีค่ากิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ 100% และมีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 0.32% และ 0.45% ตามลำดับ เมื่อใช้ระยะเวลาการฟอกจางสี 2 และ 6 วัน เมื่อทำการฟอกจางสีด้วยบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl (pH 8 และ 9) มีค่ากิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ 100% เมื่อใช้ระยะเวลาการฟอกจางสี 3 และ 2 วัน ตามลำดับ และมีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 0.67% และ 0.88% ตามลำดับ แสดงผลในรูปที่ 4.55 และ 4.56



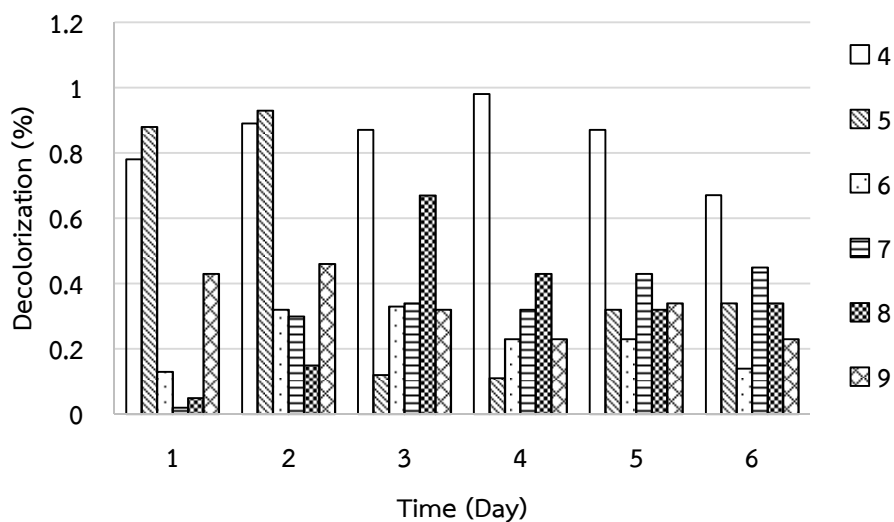
รูปที่ 4.53 กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Direct Blue 71 ปริมาณ 80 μg ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ในเวลา 6 วัน โดยเอนไซม์หยาบแลกเคส 0.125 ยูนิต และ 0.1 M sodium acetate pH 4.5



รูปที่ 4.54 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Direct Blue 71 ปริมาณ 100 μg ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ในเวลา 6 วัน โดยเอนไซม์หยาบแลกเคส 0.125 ยูนิต และ 0.1 M sodium acetate pH 4.5



รูปที่ 4.55 กิจกรรมสัมพัทธ์การฟอกจางสี Direct Blue 71 ปริมาณ 80 μg ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 4.56 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Direct Blue 71 ปริมาณ 80 μg ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Na_2HPO_4 pH 4, 5, 6 และ 7 และบัฟเฟอร์ 0.1 M Tris-HCl pH 8 และ 9 ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

4.2 การทดสอบสภาวะการฟอกจางสีของเอนไซม์หยาบแลคเคสโดยการเติมสารตัวกลาง NaN_3 , Na_2SO_4 , Na_2CO_3 และ NaCl

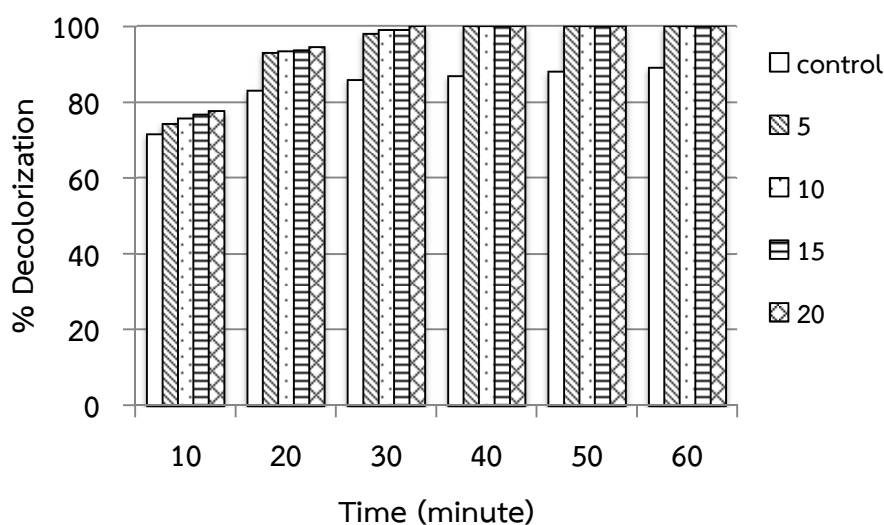
4.2.1 การฟอกจางสี Acid blue 80

การศึกษาการฟอกจางสี Acid blue 80 ปริมาณเริ่มต้น 30 μg ร่วมกับสารประกอบ NaN_3 , Na_2SO_4 , Na_2CO_3 และ NaCl ปริมาณ 5, 10, 15 และ 20 μmole และเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต แล้วทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่สารประกอบชนิดต่างๆ ผลการศึกษาพบว่าสารประกอบ NaN_3 สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หยาบแลคเคสในการฟอกจางสี Acid blue 80 ปริมาณ 30 μg เมื่อเริ่มทำการบ่มปฏิกิริยา (เวลา 10 นาที) เมื่อทดสอบการฟอกจางสี Acid blue 80 ร่วมกับสารประกอบ Na_2CO_3 พบว่าสามารถทำให้เกิดการฟอกสี 100% ที่ระดับความเข้มข้น 20 mM เมื่อบ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาที (แสดงดังรูปที่ 4.57) เช่นเดียวกับสารประกอบ Na_2SO_4 ที่ระดับความเข้มข้น 5 mM สามารถฟอกจางสีได้ 97% ในขณะที่ชุดควบคุมเกิดการฟอกจางสีเพียง 86% ในเวลา 30 นาที เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Na_2SO_4 พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเพิ่มสูงขึ้น ในช่วงเวลาการบ่มปฏิกิริยา 20 นาที (แสดงดังรูปที่ 4.58) ส่วนสารประกอบ NaCl ที่ผสมร่วมกับการฟอกจางสีที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 5 ถึง 20 mM พบว่าการเติม NaCl ความเข้มข้น 5 mM ทำให้เกิดการฟอกจางสีสูงกว่าชุดควบคุมเมื่อบ่มปฏิกิริยาได้ตั้งแต่บ่มปฏิกิริยาได้ 30 นาที และการเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl สูงขึ้น ที่ระดับความเข้มข้น 10, 15 และ 20 mM ทำให้เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีค่อนข้างคงที่ตั้งแต่เวลา 30 นาที แสดงดังรูปที่ 4.59

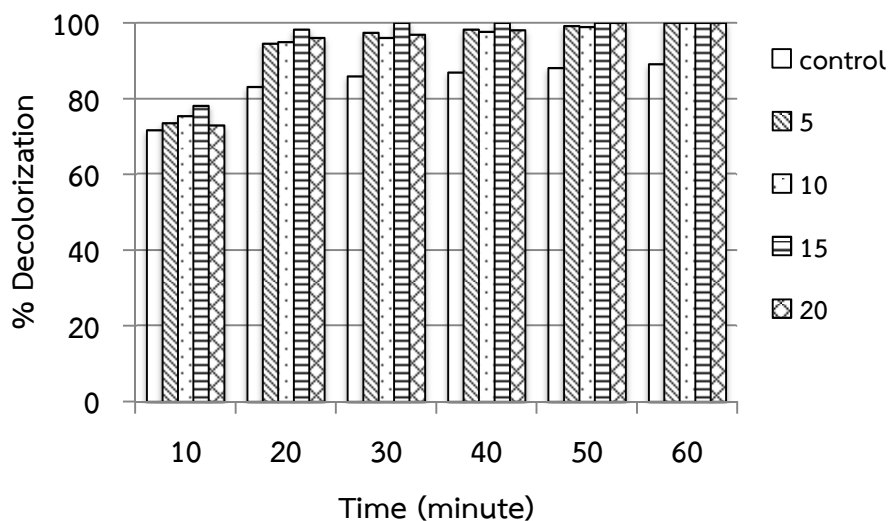
4.2.2 การฟอกจางสี Reactive Green 19

การศึกษาการฟอกจางสี Reactive Green 19 ปริมาณเริ่มต้น 40 μg ร่วมกับสารประกอบ NaN_3 , Na_2SO_4 , Na_2CO_3 และ NaCl ปริมาณ 5, 10, 15 และ 20 μmole และเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต แล้วทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่สารประกอบชนิดต่างๆ ผลการศึกษาพบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของสารประกอบ NaN_3 ในปฏิกิริยาทำให้เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงกว่าชุดควบคุม ระดับความเข้มข้นที่ทำให้เกิดเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงสุดเท่ากับ 5 mM ฟอกจางสีได้ 2.16% และความเข้มข้น 10 และ 20 mM สามารถทำให้เกิดการฟอกจางสีในช่วงเวลาการบ่มปฏิกิริยา 10 ถึง 40 นาที และเปอร์เซ็นต์การฟอกจางลดลงในเวลา 50 นาที (แสดงดังรูปที่ 4.60) ในการผสม Na_2CO_3 ร่วมกับการทำปฏิกิริยาฟอกจางสี พบว่าการเติม Na_2CO_3 ทำให้เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงกว่าชุดควบคุม โดยความเข้มข้น 5 mM ทำให้เกิดเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงสุดในนาที่ที่ 40 ของการบ่มปฏิกิริยา คือ 4.42% และความเข้มข้น 15 mM ทำให้เกิดการฟอกจางสีได้ลดลงมา และมีค่าสูงกว่าชุดควบคุมโดยมีเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีได้ดีที่สุดในเวลาที่ 40 นาที คือ 2.55% เมื่อเวลาบ่มปฏิกิริยาถึง 50 นาที พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีลดต่ำลงมาก (แสดงดังรูปที่ 4.61) ในการฟอกจางสีร่วมกับ Na_2SO_4 พบว่าความเข้มข้น 5 mM มีเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงกว่าความ

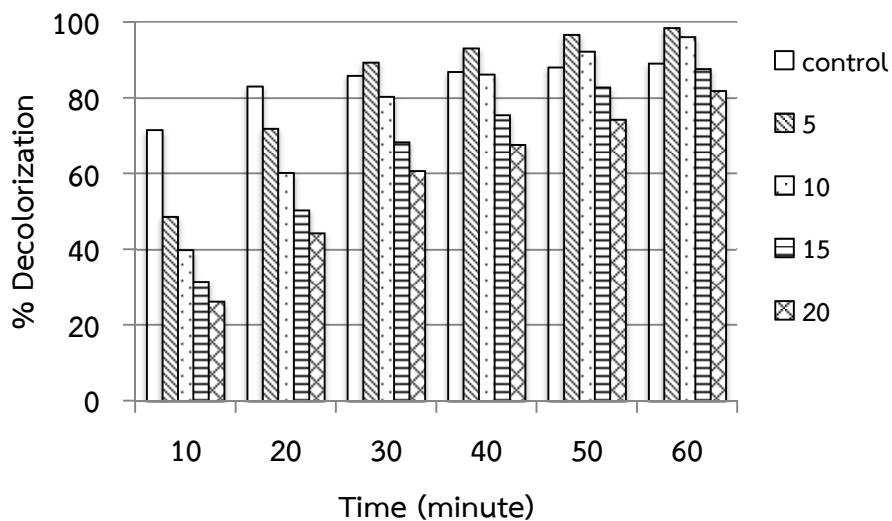
เข้มข้นอื่นๆ และชุดควบคุม โดยเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงสุดในนาที่ที่ 40 ของการบ่มปฏิกิริยา คำนวณได้ 24.13% เมื่อเวลาการบ่มปฏิกิริยาผ่านไป 50 นาที พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีลดต่ำลงใกล้เคียงศูนย์ในทุก ระดับความเข้มข้นของ Na_2SO_4 (แสดงดังรูปที่ 4.62) การเติม NaCl ร่วมในปฏิกิริยาการฟอกจางสี พบว่า เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม และเมื่อระยะเวลาการบ่มปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น พบว่าเปอร์เซ็นต์ การฟอกจางสีเพิ่มสูงขึ้น ในเวลาที่ 50 นาที เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับศูนย์ในขณะที่ชุดควบคุมมี เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี 0.5% (แสดงดังรูปที่ 4.63)



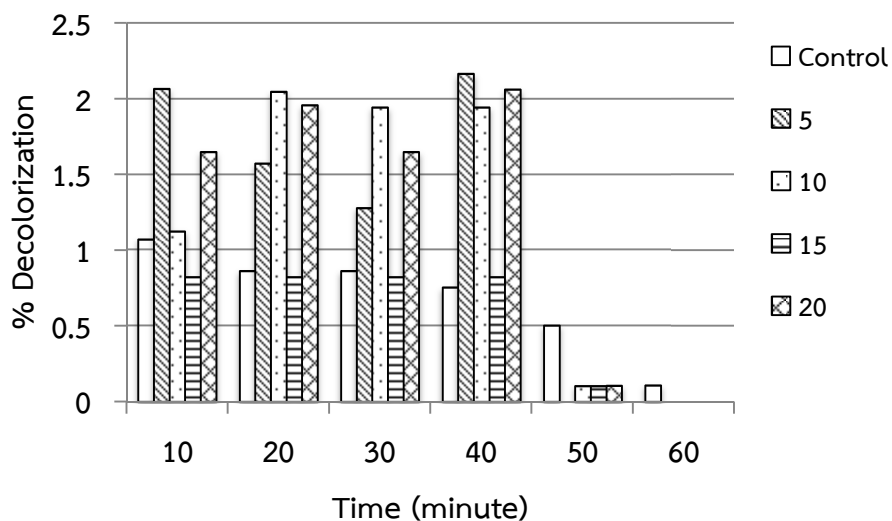
รูปที่ 4.57 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid blue 80 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับรวมกับการใช้ Na_2CO_3 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



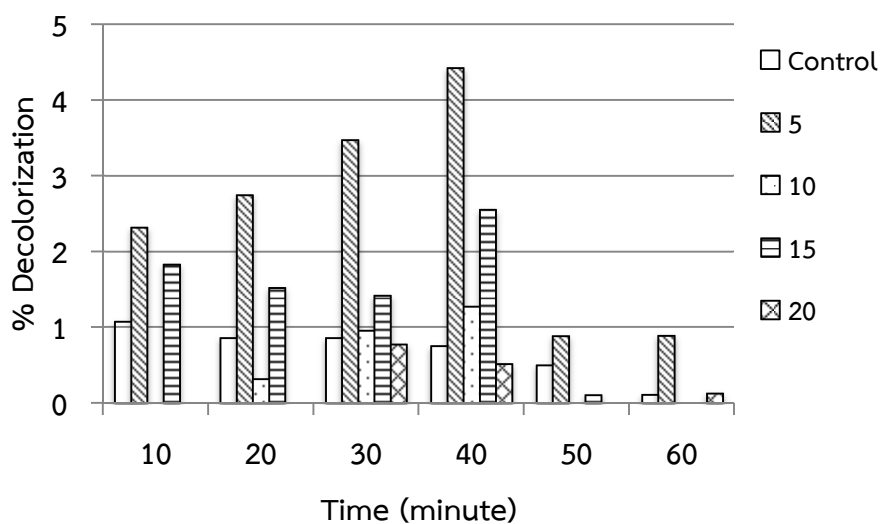
รูปที่ 4.58 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid blue 80 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับการใช้ Na_2SO_4 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



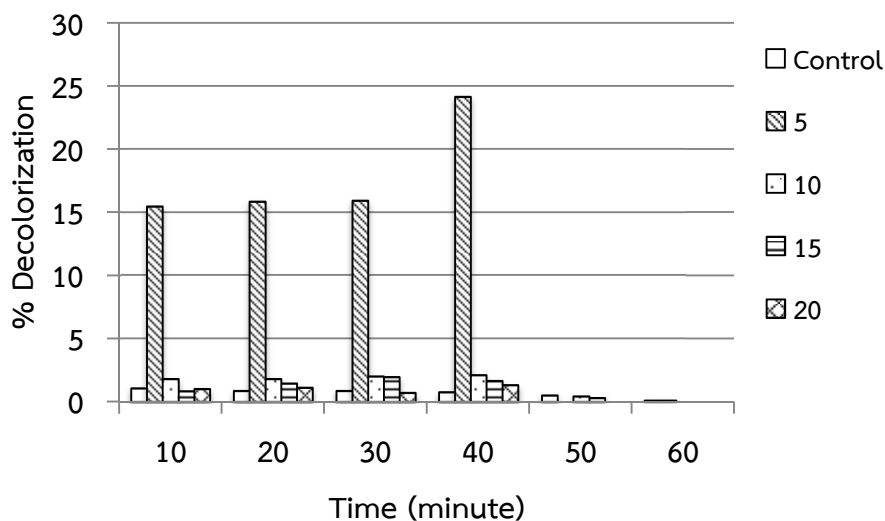
รูปที่ 4.59 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid blue 80 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับการใช้ NaCl ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



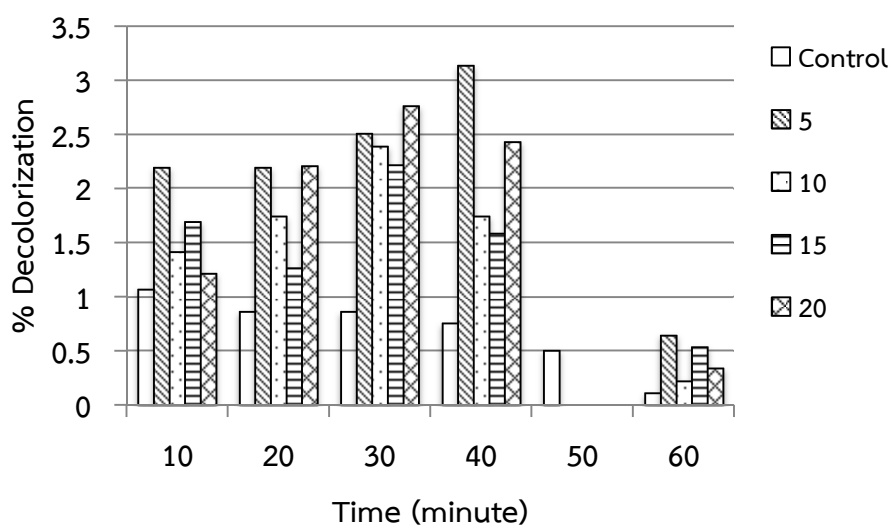
รูปที่ 4.60 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Green 19 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับการใช้ NaN_3 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.61 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Green 19 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับการใช้ Na_2CO_3 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.62 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Green 19 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับการใช้ Na_2SO_4 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.63 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Green 19 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับการใช้ NaCl ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

4.2.3 การฟอกจางสี Indigo carmine

การศึกษาการฟอกจางสี Indigo carmine ปริมาณเริ่มต้น 80 μg ร่วมกับสารประกอบ NaN_3 , Na_2SO_4 , Na_2CO_3 และ NaCl ปริมาณ 5, 10, 15 และ 20 μmole และเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต แล้วทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่สารประกอบชนิดต่างๆ ผลการศึกษาพบว่าสารประกอบ NaN_3 สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หยาบแลคเคสในการฟอกจางสี Indigo carmine ปริมาณ 80 μg เมื่อเริ่มทำการบ่มปฏิกิริยาจนกระทั่งเวลา 60 นาทีของการบ่มปฏิกิริยา คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีได้เท่ากับศูนย์ (แสดงดังรูปที่ 4.64) เมื่อทดสอบการฟอกจางสี Indigo carmine ร่วมกับสารประกอบ Na_2CO_3 พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีต่ำกว่าชุดควบคุม โดยระดับความเข้มข้นของ Na_2CO_3 ที่สูงขึ้น พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีต่ำลงเมื่อระยะเวลาในการบ่มปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น (แสดงดังรูปที่ 4.65) เมื่อทำการทดสอบการฟอกจางสีโดยผสม Na_2SO_4 ในปฏิกิริยา พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีของชุดควบคุมสูงกว่า ในขณะที่ทุกความเข้มข้นของ Na_2SO_4 มีเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับศูนย์เมื่อบ่มปฏิกิริยาที่ 50 นาที และที่ระดับความเข้มข้น 15 mM มีเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงกว่าความเข้มข้นระดับอื่นๆ แต่ยังมีเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีต่ำกว่าชุดควบคุม ที่มีเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 3.3% (แสดงดังรูปที่ 4.66) ในกรณีที่ผสมสารประกอบ NaCl ในการฟอกจางสี พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีต่ำกว่าชุดควบคุม โดยการเติม NaCl ความเข้มข้น 20 mM ทำให้เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับศูนย์เมื่อบ่มปฏิกิริยาได้ 10 นาที และการเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl สูงขึ้นทำให้เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีต่ำลง (แสดงดังรูปที่ 4.67)

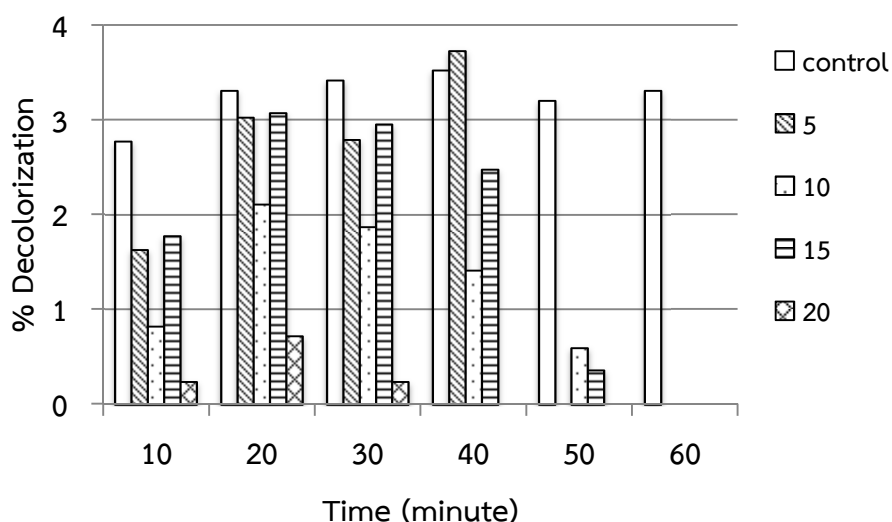
4.2.4 การฟอกจางสี Reactive Orange 16

การศึกษาการฟอกจางสี Reactive Orange 16 ปริมาณ 80 μg ร่วมกับสารประกอบ NaN_3 , Na_2SO_4 , Na_2CO_3 และ NaCl ปริมาณ 5, 10, 15 และ 20 μmole และเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต แล้วทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่สารประกอบชนิดต่างๆ ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้น 10 mM ของสารประกอบ NaN_3 ในปฏิกิริยาทำให้เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงกว่าชุดควบคุม ทำให้เกิดเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงสุดในเวลาที่ 50 นาที ฟอกจางสีได้ 8.58% แต่เมื่อบ่มปฏิกิริยาผ่านไป 60 นาที พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับศูนย์ รวมปฏิกิริยาชุดควบคุมและปฏิกิริยาที่มีการเติม NaN_3 (แสดงดังรูปที่ 4.68) ในการผสม Na_2CO_3 ร่วมกับการทำปฏิกิริยาฟอกจางสี พบว่าการเติม Na_2CO_3 ทำให้เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงกว่าชุดควบคุม โดยความเข้มข้น 5 และ 10 mM มีเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงสุดเท่ากับ 6.69% และ 7.83% ตามลำดับ ในเวลา 30 นาที ในขณะที่เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีใกล้ศูนย์ ในทุกความเข้มข้นของ Na_2CO_3 ในเวลา 40 ถึง 50 นาที (แสดงดังรูปที่ 4.69) ในการฟอกจางสีร่วมกับ Na_2SO_4 พบว่าในช่วงเวลา 10 นาทีของการบ่มปฏิกิริยา มีเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงกว่าชุดควบคุม และเริ่มมีเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีลดลงตั้งแต่วเวลา 20 นาทีเป็นต้นไป (แสดงดังรูปที่ 4.70) การเติม NaCl ร่วมในปฏิกิริยาการฟอกจางสี พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีในชุดควบคุมมีค่าสูงกว่าชุดที่มีการเติม NaCl และเมื่อระยะเวลาการบ่มปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น พบว่า

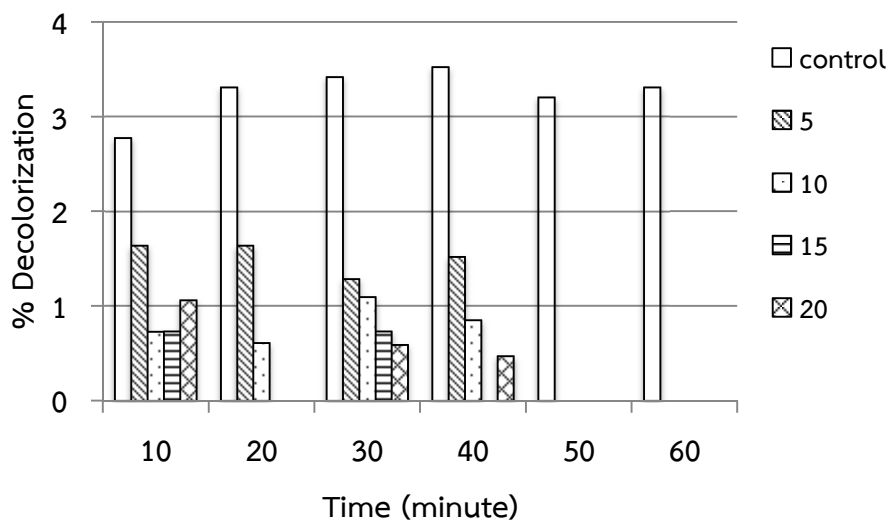
เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีในชุดควบคุมเพิ่มสูงขึ้น ในเวลาที่ 40 นาที เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 3.07% ในขณะที่ชุดทดสอบที่มีการเติม NaCl มีเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับศูนย์ (แสดงดังรูปที่ 4.71)

4.2.5 การฟอกจางสี Acid Green 27

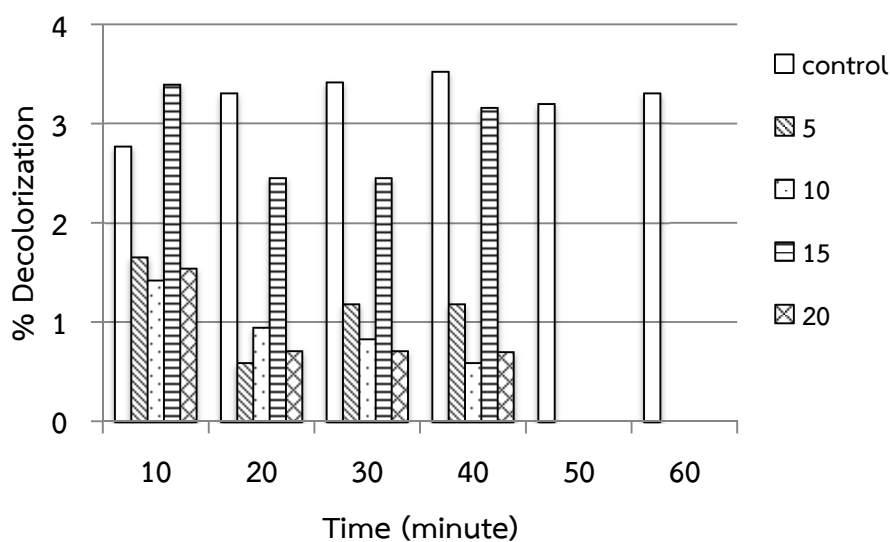
การศึกษาการฟอกจางสี Acid Green 27 ปริมาณ 80 μg ร่วมกับสารประกอบ NaN_3 , Na_2SO_4 , Na_2CO_3 และ NaCl ปริมาณ 5, 10, 15 และ 20 μmole และเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต แล้วทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่สารประกอบชนิดต่างๆ ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้น 20 mM ของสารประกอบ NaN_3 ในปฏิกิริยาไม่เกิดการฟอกจางสี Acid Green 27 ในขณะที่ความเข้มข้น 5 mM NaN_3 ทำให้เกิดการฟอกจางสีสูงสุดในวันที่ 6 พบเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับ 5.65% ซึ่งเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการฟอกจางสี (แสดงดังรูปที่ 4.72) ในการผสม NaCl ร่วมกับการทำปฏิกิริยาฟอกจางสี Acid Green 27 พบว่าการเติม NaCl ทำให้เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับศูนย์ในทุกความเข้มข้นต่างๆ (5, 10, 15, 20 mM) เมื่อทำการฟอกจางสีจนถึงวันที่ 5 โดยความเข้มข้น 5 mM NaCl มีเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงสุดเท่ากับ 3.13% ในวันที่ 5 ของการฟอกจางสี ในขณะที่เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับศูนย์เมื่อบ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 5 ถึง 6 วัน (แสดงดังรูปที่ 4.73) ในขณะที่ทำการผสม Na_2CO_3 ร่วมกับปฏิกิริยาการฟอกจางสี Acid Green 27 ความเข้มข้นต่างๆ (5, 10, 15, 20 mM) ในการบ่มปฏิกิริยาเป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่าระยะเวลาการบ่มปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นทำให้เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีลดลง และมีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงสุดเท่ากับ 4.42% ที่ระดับความเข้มข้น 5 mM Na_2CO_3 ในวันที่ 4 ของการทำปฏิกิริยา (แสดงดังรูปที่ 4.74) ในขณะที่การผสม Na_2SO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ (5, 10, 15, 20 mM) ร่วมกับปฏิกิริยาการฟอกจางสี แต่มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับศูนย์



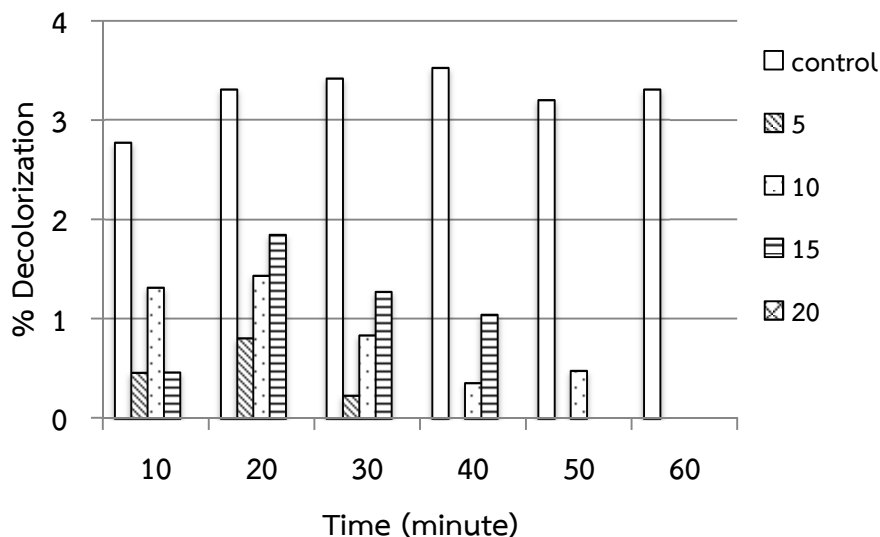
รูปที่ 4.64 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Indigo carmine ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับการใช้ NaN_3 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



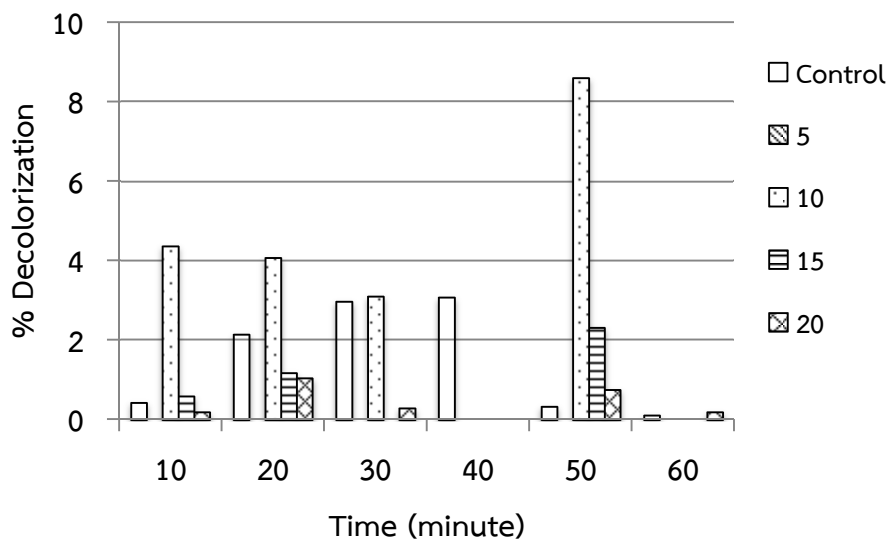
รูปที่ 4.65 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Indigo carmine ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับการใช้ Na_2CO_3 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



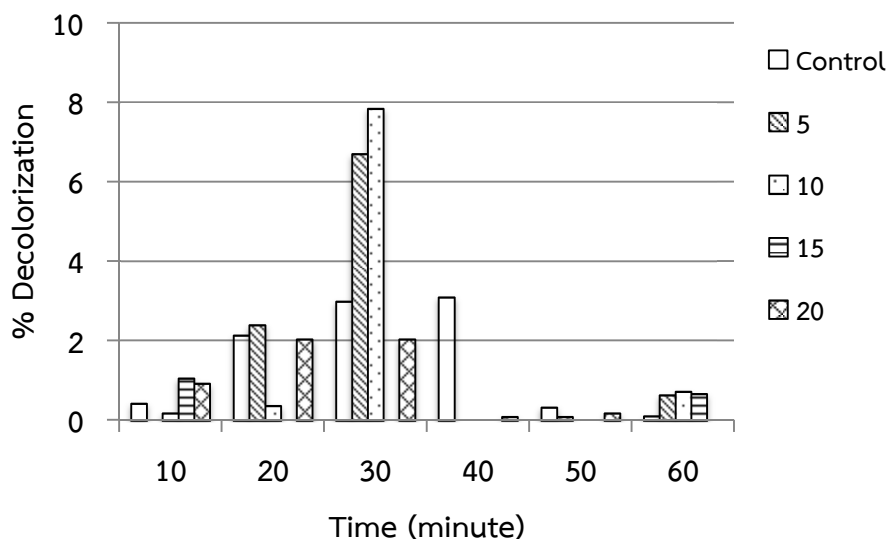
รูปที่ 4.66 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Indigo carmine ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับการใช้ Na_2SO_4 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



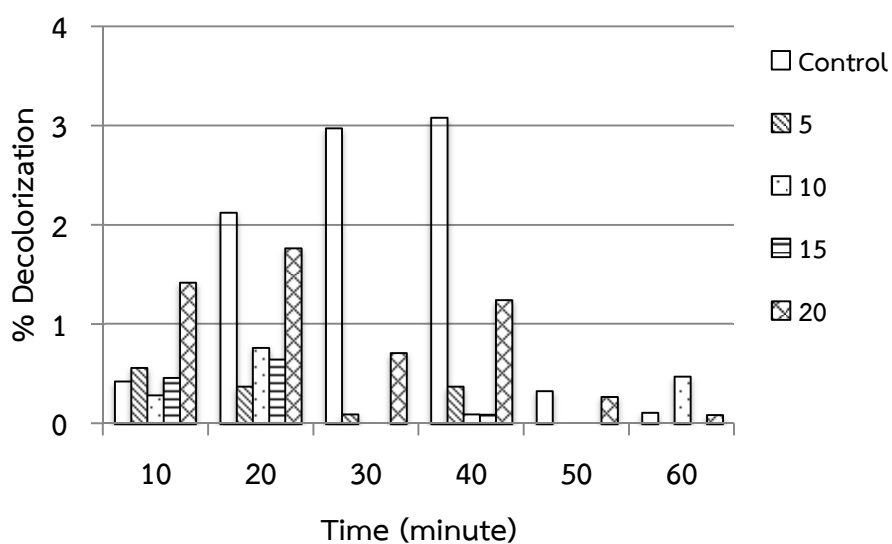
รูปที่ 4.67 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Indigo carmine ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับการใช้ NaCl ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



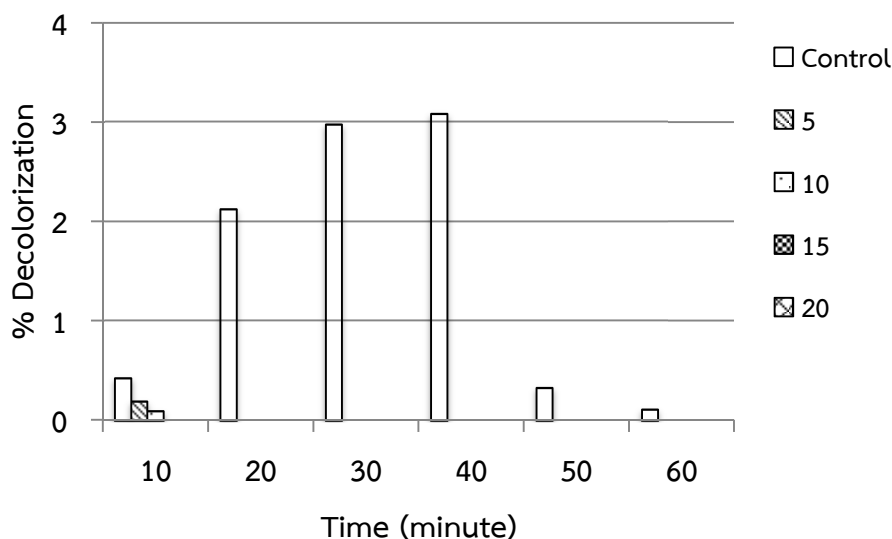
รูปที่ 4.68 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Orange 16 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับการใช้ NaN_3 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



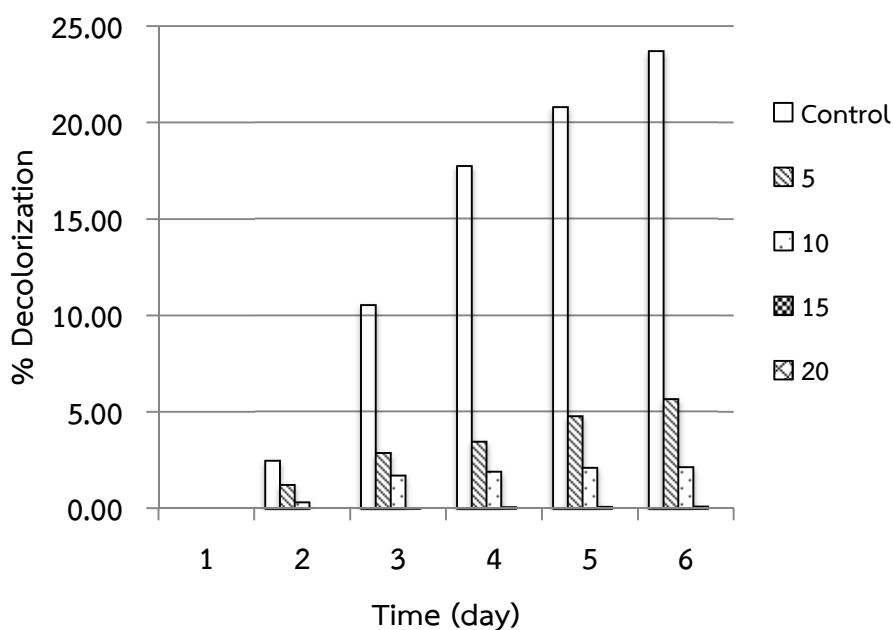
รูปที่ 4.69 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Orange 16 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับการใช้ Na_2CO_3 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



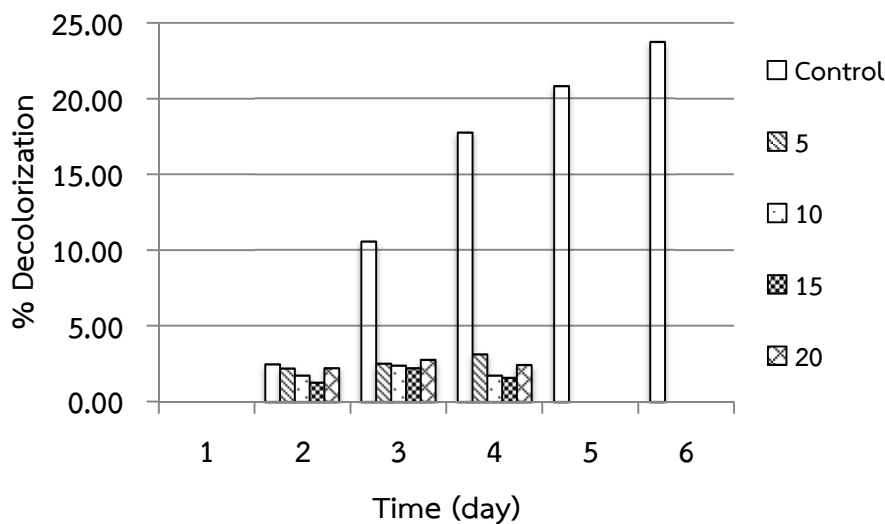
รูปที่ 4.70 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Reactive Orange 16 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับการใช้ Na_2SO_4 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



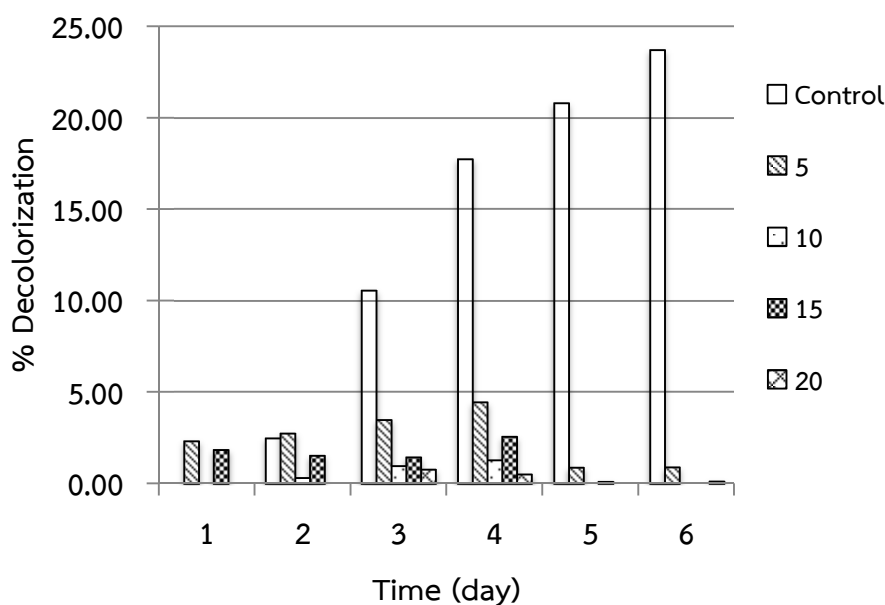
รูปที่ 4.71 เปรี่เซนต์การฟอกจางสี Reactive Orange 16 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบบร่วกับการใช้ NaCl ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.72 เปรี่เซนต์การฟอกจางสี Acid Green 27 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบบร่วกับการใช้ NaN_3 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.73 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid Green 27 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับการใช้ NaCl ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.74 เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสี Acid Green 27 ในชุดควบคุมเปรียบเทียบกับการใช้ Na_2CO_3 ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM ในบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

4.2.6 การฟอกจางสี Alizarin Red

การศึกษาการฟอกจางสี Alizarin Red ปริมาณ 50 μg ร่วมกับสารประกอบ NaN_3 , Na_2SO_4 , Na_2CO_3 และ NaCl ปริมาณ 5, 10, 15 และ 20 μmole และเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต แล้วทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่สารประกอบชนิดต่างๆ ผลการศึกษาพบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของสารประกอบทั้ง 4 ชนิด ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการฟอกจางสี Alizarin Red ได้ ถึงแม้จะทำการเพิ่มระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของสี Alizarin Red และเอนไซม์หยาบเป็นระยะเวลา 1 ถึง 6 วัน ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวอาจส่งผลจากปริมาณของสารประกอบในสารละลาย และชนิดของสารประกอบไม่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์หยาบแลคเคส ทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาการฟอกจางสี Alizarin Red

4.2.7 การฟอกจางสี Direct Blue 71

การศึกษาการฟอกจางสี Direct Blue 71 ปริมาณ 100 μg ร่วมกับสารประกอบ NaN_3 , Na_2SO_4 , Na_2CO_3 และ NaCl ปริมาณ 5, 10, 15 และ 20 μmole และเอนไซม์หยาบแลคเคส 0.125 ยูนิต แล้วทำการบ่มสารละลายที่สภาวะอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M sodium acetate pH 4.5 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่สารประกอบชนิดต่างๆ ผลการศึกษาพบว่า การเพิ่มสารประกอบร่วมกับการทำปฏิกิริยาฟอกสีด้วยเอนไซม์หยาบแลคเคส ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการฟอกจางสีได้ เช่นเดียวกับการเพิ่มความปริมาณของสารประกอบทั้ง 4 ชนิด ก็ยังไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการฟอกจางสี Direct Blue 71 ได้ ถึงแม้จะทำการเพิ่มระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาของสี Direct Blue 71 และเอนไซม์หยาบเป็นระยะเวลา 1 ถึง 6 วัน ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวอาจส่งผลจากชนิดของสีและปริมาณของสารประกอบในสารละลายไม่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา ทำให้ไม่เกิดการฟอกจางสี Direct Blue 71 ด้วยเอนไซม์หยาบแลคเคส

พบรายงานการศึกษาว่าสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แลคเคสของเชื้อ *T. versicolor* คือ NaN_3 เนื่องจากการหยุดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารตั้งต้นและลดการเกิดของ radical cation ทำให้ยับยั้งกิจกรรมของแลคเคสได้สมบูรณ์ (Johannes and Majcherczyk, 2000) อย่างไรก็ตามสารตัวกลางที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาฟอกจางสีมีข้อเสียหลายด้าน เช่น การทำให้เอนไซม์สูญเสียกิจกรรม และความเข้มข้นของสารตัวกลางที่ไม่เหมาะสม ส่งผลต่อการยับยั้งการฟอกจางสีข้าม (Daassi et al., 2012; Roriz et al., 2009)

4.3 การฟอกจางสีข้ามโดยเอนไซม์แลคเคสหยาบในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง

จากผลการทดสอบการฟอกจางสีข้ามในชุดทดลองแบบแบทช์พบว่าสีข้าม Acid blue 80 ถูกฟอกจางด้วยเอนไซม์แลคเคสหยาบได้ดี สีข้ามชนิดนี้จึงถูกเลือกมาใช้ทดสอบในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง ซึ่งเยื่อกรองที่ใช้ในการศึกษาเป็นเยื่อกรองอัลตราฟิวเตรชั่น ทำจากโพลีซัลโฟน (Polysulphone) พื้นที่หน้าตัด 1000 ตารางเซนติเมตร ขนาดคัดกรองน้ำหนักโมเลกุล (MWCO) 10 กิโลดาลตัน (kDa) ลักษณะโมดูลเป็นแบบเส้นใยกลวง (Hollow fiber membrane) โดยความสามารถในการกักเอนไซม์และการกำจัดสีข้ามด้วยระบบถังปฏิกรณ์เยื่อกรองถูกทดสอบก่อนการศึกษาการฟอกจางสีด้วยเอนไซม์แลคเคสในระบบถังปฏิกรณ์

ชีวภาพเยื่อกรอง เมื่อดำเนินระบบสารละลายตัวอย่างที่เก็บในแต่ละช่วงการทดลองจะถูกนำมาวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของสีย้อมเปรียบเทียบกับความเข้มข้นตั้งต้นและแสดงผลในรูปของเปอร์เซ็นต์การกำจัด ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ความเข้มข้นของสีย้อม ความเข้มข้นของเอนไซม์ อัตราการไหลของสาร และค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายสีย้อม การศึกษาครั้งนี้เป็นการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ ทำการศึกษาที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 3 องศาเซลเซียส) ผลการศึกษาเป็นดังนี้

4.3.1 การกักเอนไซม์ในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง

การนำเอนไซม์มาใช้ในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องเลือกใช้เยื่อกรองที่มีขนาดเหมาะสมกับขนาดของเอนไซม์ เยื่อกรองที่มีขนาดคัดกรองน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight cut-off) ใกล้เคียงหรือใหญ่กว่าขนาดของเอนไซม์จะทำให้ความสามารถในการกักเอนไซม์ลดลง เกิดการหลุดออกจากระบบได้ง่าย ในขณะที่เยื่อกรองที่มีขนาดคัดกรองน้ำหนักโมเลกุลเล็กกว่าขนาดของเอนไซม์มากเกินไปอาจก่อให้เกิดปัญหาการอุดตันบนแผ่นเยื่อกรองได้ง่าย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกเยื่อกรองชนิดอัลตราฟิวเตรชั่นที่มีขนาดคัดกรองน้ำหนักโมเลกุล 10 kDa มาใช้ร่วมกับเอนไซม์แลคเคสสกัดจาก *Lentinus polychrous* Lev. ซึ่งมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณ 45 kDa (Suwannawong et al., 2010) และทดสอบความสามารถของการกักเอนไซม์ในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองก่อนนำไปใช้กำจัดสีย้อม โดยอัตราการไหลของสารเข้าระบบเยื่อกรองถูกควบคุมที่ 300 มิลลิลิตรต่อนาที ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์มีค่ากิจกรรมการทำงานเหลือมากกว่า 80% ที่เวลา 60 นาที และมีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 240 นาที อย่างไรก็ตามค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ยังเหลือมากกว่า 60% ส่วนค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่พบในเฟอมีเอทมีน้อยกว่า 5% และลดลงเรื่อยๆจนกระทั่งไม่ปรากฏ

การที่ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในเฟอมีเอทมีแนวโน้มลดลงแสดงให้เห็นว่าเยื่อกรองสามารถกักเอนไซม์ได้ ในขณะที่ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์ยังลดลงอย่างต่อเนื่อง ปริมาณเอนไซม์ที่หายไปอาจเกิดจากการถูกดูดซับที่ผิวหน้าของแผ่นเยื่อกรอง นอกจากนี้ยังได้มีการวัดปริมาณโปรตีนทั้งในถังปฏิกรณ์และในเฟอมีเอทเพื่อยืนยันข้อสรุปดังกล่าว โดยพบว่าปริมาณโปรตีนในถังปฏิกรณ์มีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาในการเดินระบบมากขึ้น และที่เวลา 240 นาทีมีปริมาณโปรตีนเหลือ 60% ของปริมาณโปรตีนเริ่มต้น ส่วนปริมาณโปรตีนที่พบในเฟอมีเอทในช่วงแรกของการเดินระบบมีค่ามากกว่าค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่พบในเฟอมีเอทเนื่องจากอาจเป็นโปรตีนชนิดอื่นที่ไม่ใช่เอนไซม์แลคเคสและมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าขนาดของแผ่นเยื่อกรองจึงทำให้ผ่านแผ่นเยื่อกรองได้ และหลังจากเดินระบบไปแล้ว 180 นาทีจะไม่พบโปรตีนในเฟอมีเอท ดังนั้นผลต่างของปริมาณโปรตีนที่อยู่ในถังปฏิกรณ์และเฟอมีเอทซึ่งหายไปน่าจะถูกดูดซับอยู่ที่แผ่นเยื่อกรอง

ตารางที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์และโปรตีนในถังปฏิกิริยาและในเพอมีเอท

Time (min)	Reaction tank		Permeate	
	Retained activity (%)	Retained protein (%)	Activity (%)	Protein (%)
30	88.1	83.5	1.6	3.2
60	80.9	82.1	1.2	2.8
90	78.1	80.7	1.1	2.3
120	77.6	75.2	1.0	1.4
150	73.9	77.1	0.7	0.9
180	70.6	68.8	0.1	0.0
210	70.3	67.4	0.0	0.0
240	68.2	60.1	0.0	0.0

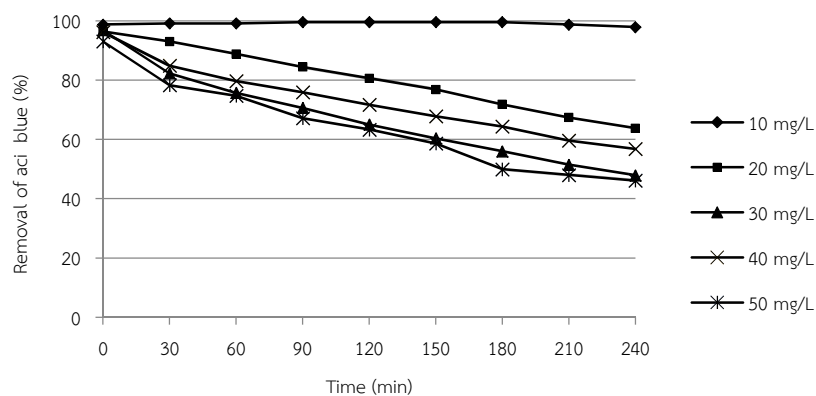
4.3.2 การกำจัดสีของ Acid blue 80 เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสี

การศึกษาการกำจัดสีของเอนไซม์ในถังปฏิกิริยาเยื่อกรองและถังปฏิกิริยาชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคส เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสีจาก 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัด โดยทำการควบคุมความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคสที่ 0.125 ยูนิตต่อ มิลลิตร ค่าความเป็นกรดของสารละลายสีของเอนไซม์เท่ากับ 7 อัตราการไหลของสารถูกควบคุมที่ 300 มิลลิตรต่อนาที่ ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 4.75

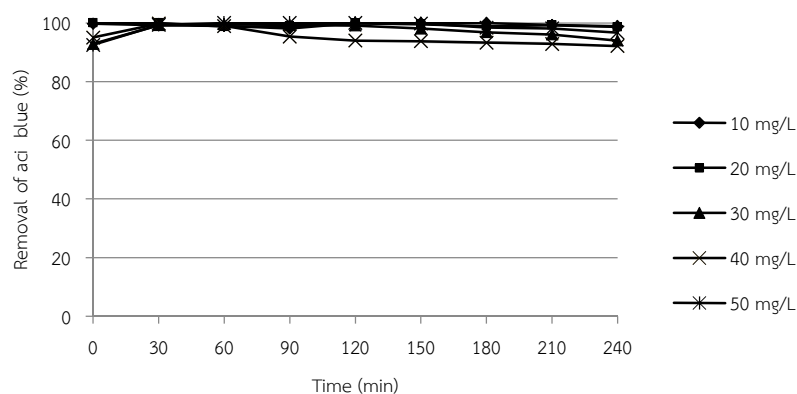
จากรูปที่ 4.75 (ก) เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีของ Acid blue 80 ด้วยถังปฏิกิริยาเยื่อกรองที่ เวลาต่างๆ พบว่าการกำจัดสีของสีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรค่อนข้างคงที่จนถึงนาที่ 180 และให้ ประสิทธิภาพการกำจัดสูงสุดเท่ากับ 99.57% และหลังจากเวลาผ่านไป 180 นาที่ ค่าการกำจัดสีของมี แนวโน้มลดลง สำหรับการกำจัดสีที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดสีของด้วยถัง ปฏิกิริยาเยื่อกรองลดลงอย่างชัดเจน โดยเมื่อเวลาดำเนินระบบผ่านไป 240 นาที่ พบว่าสีของถูกกำจัดไป 97.87%, 63.79% , 47.87%, 56.78% และ 46.12% ที่ความเข้มข้นของสีของเท่ากับ 10 , 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลการศึกษาอาจกล่าวได้ว่าความเข้มข้นของสีของที่สูงขึ้น ทำให้เกิดการ สะสมของสีของบริเวณผิวหน้าของแผ่นเยื่อกรอง เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นการสะสมของสีของบริเวณผิวหน้าของแผ่นเยื่อ กรองยิ่งเพิ่มขึ้น ส่งผลให้บริเวณดังกล่าวมีความเข้มข้นสูงขึ้นจึงเกิดการแพร่ของสีของ (Diffusion) จากบริเวณ ที่มีความเข้มข้นมากไปยังบริเวณที่มีความเข้มข้นน้อยทำให้สีของหลุดออกจากระบบเพิ่มมากขึ้น และเมื่อ เปรียบเทียบผลการศึกษาการกำจัดสีของด้วยถังปฏิกิริยาชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคส (รูปที่ 4.75 (ข)) พบว่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีของสีความเข้มข้นเดียวกันเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน และค่าการกำจัดสีของของแต่ละ ความเข้มข้นเมื่อระยะเวลาในการเดินระบบมากขึ้นมีการเปลี่ยนแปลงไม่มากแต่มีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลา เพิ่มขึ้น โดยเมื่อเวลาดำเนินระบบผ่านไป 240 นาที่ พบว่าสีของถูกกำจัดไป 98.90%, 98.60%, 94.00%, 92.12% และ 96.69% ที่ความเข้มข้นของสีของเท่ากับ 10 , 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าค่าการกำจัดสีของที่เพิ่มขึ้นเกิดจากการทำงานของเอนไซม์แลคเคส โดยทั่วไปแล้ว ถ้าในระบบที่มีเอนไซม์มากเกินไป การเพิ่มความเข้มข้นของสีของ(สารตั้งต้น) จะทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ดี

อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาจะเห็นว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสีย้อม ส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดลดลงเล็กน้อย ซึ่งอาจเกิดจากความเข้มข้นของเอนไซม์ที่มีอยู่ในระบบมีไม่มากพอต่อการเข้าทำปฏิกิริยากับสีย้อมที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น

(ก)



(ข)



รูปที่ 4.75 เปอร์เซ็นต์การกำจัดสี Acid blue 80 เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสีย้อม 10, 20, 30, 40 และ 50 mg/L ฟิเอช 7 เอนไซม์แลคเคส 0.125 U/ml อัตราการไหล 300 ml/min (ก) ถึงปฏิกิริยาเยื่อกรอง และ (ข) ถึงปฏิกิริยาชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคส

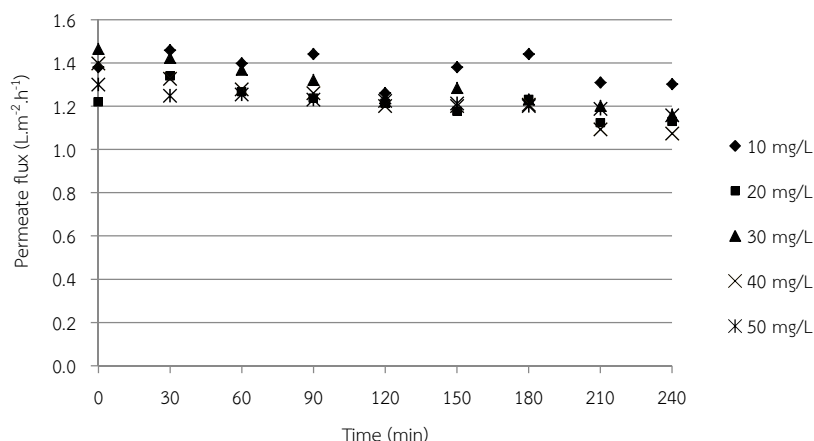
เมื่อพิจารณาถึงการรั่วไหลของเอนไซม์แลคเคสจากถังปฏิกิริยาชีวภาพเยื่อกรอง (ตารางที่ 4.2) ที่ความเข้มข้นของสีย้อม 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เปอร์เซ็นต์การรั่วไหลมีค่าแตกต่างกันไม่มาก และมีค่าน้อยกว่า 1% จะเห็นว่าค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่ตรวจวัดได้ในเพอมีเอทมีค่าน้อยมาก ซึ่งค่าที่วิเคราะห์ได้นี้อาจเกิดจากความคลาดเคลื่อนในการตรวจวิเคราะห์เนื่องจากสีย้อมที่หลุดออกมาในเพอมีเอทอาจส่งผลต่อการตรวจวัดค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการรั่วไหลของเอนไซม์จากระบบมีค่าน้อยมากจึงไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมที่ลดลงเมื่อความเข้มข้นของสีย้อมเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แลคเคสในเพอไมเอทจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่ใช้กำจัดสีย้อมความเข้มข้น 10-50 mg/L

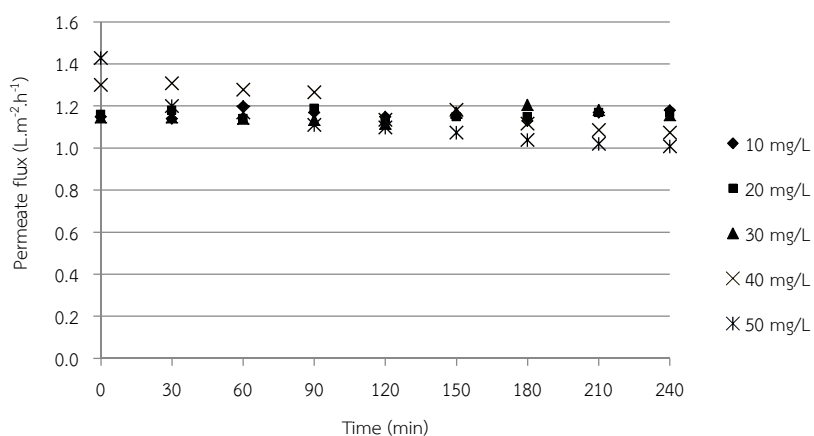
เวลา (นาทีก)	เอนไซม์แลคเคสในเพอไมเอท (%)				
	10 mg/L	20 mg/L	30 mg/L	40 mg/L	50mg/L
0	0.45	0.32	0.47	0.66	0.48
30	0.51	0.27	0.44	0.50	0.39
60	0.42	0.41	0.51	0.31	0.50
90	0.32	0.46	0.52	0.62	0.22
120	0.30	0.19	0.51	0.63	0.57
150	0.25	0.29	0.63	0.36	0.78
180	0.19	0.34	0.55	0.78	0.39
210	0.20	0.50	0.59	0.59	0.58
240	0.14	0.60	0.63	0.67	0.57

จากรูปที่ 4.76 (ก) เมื่อพิจารณาถึงค่าเพอไมเอทฟลักซ์กับเวลาในการดำเนินระบบของถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสีย้อมเป็น 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าฟลักซ์มีแนวโน้มลดลงแต่ไม่ชัดเจนเนื่องจากสีย้อมมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยมากเมื่อเทียบกับขนาดรูพรุนของแผ่นเยื่อกรองและความเข้มข้นของสีย้อมที่ใช้ทดสอบแตกต่างกันไม่มาก จึงทำให้ค่าเพอไมเอทฟลักซ์ที่วัดได้จากการใช้ความเข้มข้นของสีย้อมต่างๆเกิดการเปลี่ยนแปลงไม่มาก สำหรับเพอไมเอทฟลักซ์กับเวลาในการดำเนินระบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคส (รูปที่ 4.76 (ข)) ค่าฟลักซ์ลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับค่าฟลักซ์จากถังปฏิกรณ์เยื่อกรองที่ความเข้มข้นของสีย้อมเดียวกัน เนื่องจากมีเอนไซม์บางส่วนสะสมที่แผ่นเยื่อกรองและความเข้มข้นของสีย้อมที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ฟลักซ์มีค่าลดลง โดยความเข้มข้นของสีย้อมที่ 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าฟลักซ์ที่เวลา 240 นาทีเท่ากับ 1.18, 1.17, 1.16, 1.07 และ 1.01 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง และจากการศึกษาเพิ่มเติมพบว่าการอุดตันของแผ่นเยื่อกรองจะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อมีการสะสมของโมเลกุลหรืออนุภาคของตัวถูกละลายที่ไม่สามารถผ่านแผ่นเยื่อกรองได้ เมื่อความเข้มข้นในระบบมีมากขึ้น จะทำให้การสะสมอยู่บริเวณผิวหน้าของแผ่นเยื่อกรองหนาขึ้น และเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นการสะสมของอนุภาคก็เพิ่มขึ้นด้วย ส่งผลให้เกิดปรากฏการณ์ Concentration Polarization ในระบบ ซึ่งการเกิดปรากฏการณ์นี้จะไปเพิ่มความต้านทานการไหลของสารทำให้ฟลักซ์มีค่าลดลง

(ก)



(ข)

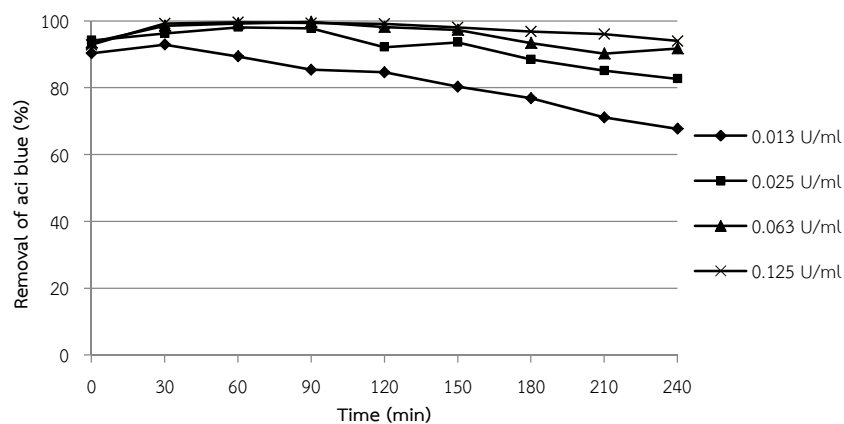


รูปที่ 4.76 เพลมิเอทฟลักซ์จาก (ก) ถึงปฏิกรณ์เยื่อกรอง และ (ข) ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคส เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสีย้อม 10, 20, 30, 40 และ 50 mg/l พีเอช 7 เอนไซม์แลคเคส 0.125 U/ml อัตราการไหล 300 mL/min

4.3.3 การกำจัดสีย้อม Acid blue 80 เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์

การศึกษาการกำจัดสีย้อมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคสเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ 0.013, 0.025, 0.063 และ 0.125 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัด โดยทำการควบคุมความเข้มข้นของสีย้อมที่ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายสีย้อมเท่ากับ 7 อัตราการไหลของสารถูกควบคุมที่ 300 มิลลิลิตรต่อนาที่ ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 4.77 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อมมีค่าเพิ่มขึ้น โดยความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ 0.063 และ 0.125 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร สามารถกำจัดสีย้อมสูงสุดมากกว่า 99% ที่ช่วงเวลา 30-90

นาที่ จากนั้นเปอร์เซ็นต์การกำจัดมีแนวโน้มลดลง สำหรับเอนไซม์ความเข้มข้น 0.013 หน่วยต่อมิลลิลิตรให้ค่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดต่ำสุด และเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อมที่เวลา 240 นาทีเท่ากับ 67.72%, 82.64%, 91.75% และ 94.00% ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.013, 0.025, 0.063 และ 0.125 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ผลการศึกษาอธิบายได้ว่าการกำจัดสีย้อมจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น เมื่อเอนไซม์มีความเข้มข้นมากเกินไปจะทำให้จับกับสีย้อมได้น้อยลงดังนั้นเปอร์เซ็นต์การกำจัดจึงสูง ส่วนกรณีที่เอนไซม์มีความเข้มข้นน้อยส่งผลให้จับกับสีย้อมได้น้อยลงดังนั้นเปอร์เซ็นต์การกำจัดจึงต่ำกว่า และเมื่อเวลาในการดำเนินระบบมากขึ้นเปอร์เซ็นต์การกำจัดมีแนวโน้มลดลงทุกความเข้มข้นเอนไซม์ เนื่องมาจากเอนไซม์ในระบบมีปริมาณจำกัดในขณะที่สารละลายสีย้อมถูกป้อนเข้าสู่ระบบอย่างต่อเนื่อง ความเข้มข้นของสีย้อมบางส่วนที่ถูกกักไม่ให้ออกจากกระบวนการร่วมกับสีย้อมที่เข้ามาระบบอย่างต่อเนื่องทำให้ความเข้มข้นสีย้อมเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง การทำงานของเอนไซม์ที่มีอยู่อย่างจำกัดจึงอาจไม่เพียงพอ สีย้อมบางส่วนที่เหลือจึงออกจากกระบวนการมากขึ้นเปอร์เซ็นต์การกำจัดจึงลดลง ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Asadgol et al., (2014) (Asadgol et al., 2014) ทำการศึกษาการกำจัดฟีนอลและบิสฟีนอลเอด้วยเอนไซม์แลคเคสจาก *Paraconiothyrium variabile* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคสที่ 1-20 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่งผลให้การกำจัดฟีนอลและบิสฟีนอลเอเพิ่มขึ้น



รูปที่ 4.77 เปอร์เซ็นต์การกำจัดสี Acid blue 80 เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคสที่ 0.013, 0.025, 0.063 และ 0.125 U/ml ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง ความเข้มข้นของสีย้อมเท่ากับ 30 mg/l พีเอช 7 อัตราการไหล 300 ml/min

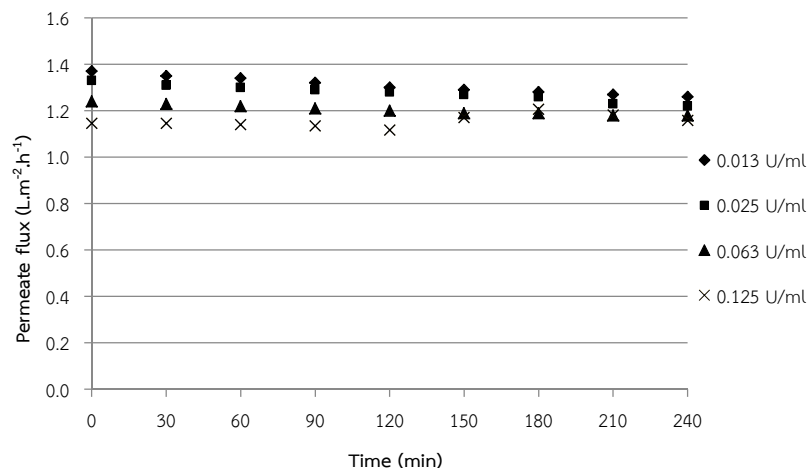
สำหรับการรั่วไหลของเอนไซม์แลคเคสจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง (ตารางที่ 4.3) ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.013, 0.025, 0.063 และ 0.125 หน่วยต่อมิลลิลิตร การรั่วไหลของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่รั่วไหลออกจากระบบพบว่ามีค่าน้อยกว่า 1% ซึ่งค่าที่วิเคราะห์ได้อาจเกิดจากความคลาดเคลื่อนในการตรวจวิเคราะห์เนื่องจากสีย้อมที่หลุดออกมาในเฟอมีเอทอาจส่งผลต่อการ

ตรวจวัดค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการรั่วไหลของเอนไซม์จากระบบมีค่าน้อยมากจึงไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมที่ลดลงเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์

เมื่อพิจารณาถึงค่าเพอมีเอทฟลักซ์กับเวลาในการดำเนินระบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง (รูปที่ 4.78) พบว่าค่าฟลักซ์มีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาในการดำเนินระบบเพิ่มขึ้น เนื่องจากการสะสมของโมเลกุลหรืออนุภาคของตัวถูกละลายที่ไม่สามารถผ่านแผ่นเยื่อกรองได้ เมื่อความเข้มข้นในระบบมีมากขึ้นทำให้เกิดการสะสมอยู่บริเวณผิวหน้าของแผ่นเยื่อกรองหนาขึ้น และเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นการสะสมของอนุภาคก็เพิ่มขึ้นด้วย ส่งผลให้เกิดปรากฏการณ์ Concentration Polarization ในระบบ ซึ่งการเกิดปรากฏการณ์นี้จะไปเพิ่มความต้านทานการไหลของสารทำให้ค่าฟลักซ์ลดลง และความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ฟลักซ์มีค่าลดลง โดยความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.013, 0.025, 0.063 และ 0.125 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร มีค่าฟลักซ์ที่เวลา 240 นาที เท่ากับ 1.26, 1.22, 1.18 และ 1.16 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง เพราะนอกจากการสะสมของอนุภาคสีย้อมที่ผิวเยื่อกรองส่งผลต่อค่าฟลักซ์แล้ว ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่มากขึ้นในระบบทำให้โอกาสที่เอนไซม์บางส่วนถูกสะสมที่แผ่นเยื่อกรองมีมากทำให้ความต้านทานการไหลของสารเพิ่มขึ้นส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าฟลักซ์

ตารางที่ 4.3 เพอร์เซ็นต์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แลคเคสในเพอมีเอทจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคส 0.013-0.125 U/ml

เวลา (นาที)	เอนไซม์แลคเคสในเพอมีเอท (%)			
	0.013 U/ml	0.025 U/ml	0.063 U/ml	0.125 U/ml
0	0.20	0.18	0.28	0.47
30	0.19	0.23	0.15	0.44
60	0.11	0.17	0.17	0.51
90	0.09	0.12	0.14	0.52
120	0.15	0.13	0.20	0.51
150	0.21	0.08	0.18	0.63
180	0.14	0.11	0.19	0.55
210	0.16	0.09	0.24	0.59
240	0.11	0.10	0.21	0.63



รูปที่ 4.78 เพอมีเอทฟลักซ์จากถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคสความเข้มข้น 0.013, 0.025, 0.063 และ 0.125 U/ml ความเข้มข้นของสีย้อม 30 mg/l พีเอช 7 อัตราการไหล 300 ml/min

4.3.4 การกำจัดสีย้อม Acid blue 80 เมื่อเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายสีย้อม

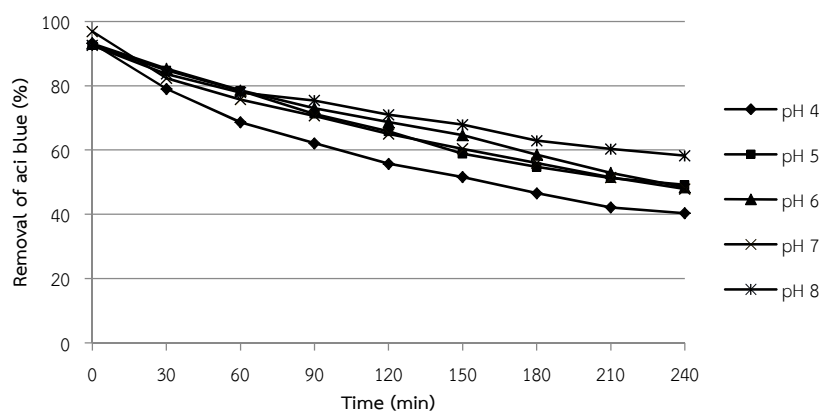
การศึกษาการกำจัดสีย้อมในถังปฏิกรณ์เยื่อกรองและถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคสเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายสีย้อมที่ 4, 5, 6, 7 และ 8 เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัด โดยทำการควบคุมความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคสที่ 0.125 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของสีย้อมที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร อัตราการไหลของสารถูกควบคุมที่ 300 มิลลิลิตร ต่อนาที ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 4.79

ในการกำจัดสีย้อม Acid blue 80 ด้วยถังปฏิกรณ์เยื่อกรองที่เวลาต่างๆ เมื่อเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายสีย้อมที่ 4-8 (รูปที่ 4.79 (ก)) พบว่าการกำจัดสีย้อมมีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น และค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายส่งผลต่อการกำจัดสีย้อมโดยเมื่อเวลาดำเนินระบบผ่านไป 240 นาที สีย้อมถูกกำจัดไป 40.35%, 49.18%, 48.45%, 47.87% และ 58.22% ที่ความเป็นกรดต่างของสารละลายสีย้อมเท่ากับ 4, 5, 6, 7 และ 8 ตามลำดับ จะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อมมีค่าแตกต่างกันไม่มาก อย่างไรก็ตามแนวโน้มของสารละลายสีย้อมที่มีสภาวะความเป็นกรด (พีเอช 4) ให้ค่าการกำจัดที่ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายสีย้อมที่มีสภาวะความเป็นด่าง (พีเอช 8) สาเหตุอาจเนื่องมาจากผิวหน้าแผ่นเยื่อกรองโพลีซัลโฟนมีความเป็นประจุลบ และเมื่อสีย้อมอยู่ในสารละลายที่มีสภาวะความเป็นกรดต่างกันส่งผลให้ประจุของสีย้อมเปลี่ยนแปลง เกิดแรงดึงดูดประจุระหว่างผิวหน้าเยื่อกรองและสีย้อม ส่งผลให้สีย้อมแพร่ผ่านเยื่อกรองออกมาในเพอมีเอทได้ต่างกัน และเมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาการกำจัดสีย้อมด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคส (รูปที่ 4.79 (ข)) พบว่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อมที่ความเป็นกรดต่างของสารละลายเดียวกันเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์แลคเคสร่วมกับเยื่อกรอง การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายยังส่งผลต่อการกำจัดสีย้อม โดยเมื่อเวลาดำเนินระบบผ่านไป 240 นาที พบว่าสีย้อมถูกกำจัดไป 89.22%, 90.97%, 92.51%, 94.00% และ 75.98% ที่ความเป็นกรดต่างของสารละลาย

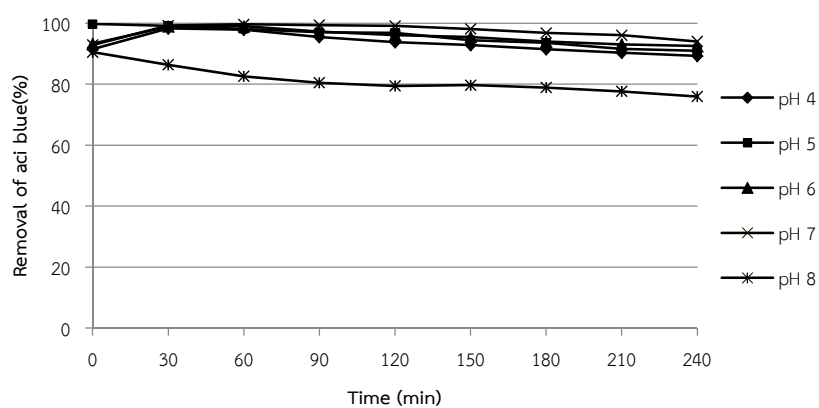
ย้อมเท่ากับ 4, 5, 6, 7 และ 8 ตามลำดับ จะเห็นว่าที่ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 ค่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดมีแนวโน้มลดลงกว่าทุกระดับความเป็นกรดต่าง และจากผลการทดลองฟอกจางสี Acid blue 80 ในชุดทดลองแบบแบทช์ (หัวข้อ 4.1.1.4) เอนไซม์แลคเคสทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรด 4-5 และเมื่อเอนไซม์อยู่ในสถานะที่เป็นต่างจะส่งผลให้เสถียรภาพและความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ลดลง เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่างส่งผลต่อประจุในโมเลกุลของเอนไซม์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง โดยเฉพาะบริเวณเร่งของเอนไซม์ การจับกันระหว่างเอนไซม์กับสีย้อมไม่สามารถจับกันได้หรือจับกันได้น้อยลง ส่งผลต่อการฟอกจางสีของเอนไซม์ นอกจากนี้ในการศึกษาของ Niladevi et al., (2008) (Niladevi and Prema, 2008) พบว่าจุดไอโซอิเล็กทริกของเอนไซม์แลคเคสบริสุทธิ์เท่ากับ 7.9 ซึ่งจุดดังกล่าวเป็นจุดที่ทำให้ประจุบวกและลบที่มีอยู่เท่ากัน ประจุรวมของเอนไซม์จึงเท่ากับศูนย์ เอนไซม์จะเกิดการสูญเสียสภาพและตกตะกอนส่งผลให้เหลือเอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยากับสีย้อมได้น้อยลง และเมื่อดำเนินระบบถึงปฏิกิริยชีวภาพเยื่อกรองนานขึ้นจะทำให้เกิดการสะสมของสีย้อมที่ผิวหน้าเยื่อกรองมากขึ้น สีย้อมที่สะสมบริเวณดังกล่าวสามารถแพร่ผ่านเยื่อกรองมากขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ดังนั้นเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อมที่ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 จึงต่ำกว่าทุกระดับ ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าสารละลายสีย้อมที่มีค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 6-7 เป็นสถานะที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดสีย้อมด้วยถังปฏิกิริยชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคส ผลดังกล่าวยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lante et al., (2000) (Lante et al., 2000) ที่รายงานการศึกษาการย่อยสลายฟีนอลโดยการตรึงเอนไซม์แลคเคสในถังปฏิกิริยชีวภาพเยื่อกรอง พบว่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมในการย่อยสลายสารฟีนอลเท่ากับ 6.6

เมื่อพิจารณาถึงการรั่วไหลของเอนไซม์แลคเคสจากถังปฏิกิริยชีวภาพเยื่อกรอง (ตารางที่ 4.4) ที่ความเป็นกรดต่างของสารละลายสีย้อมที่ 4-8 เปอร์เซ็นต์การรั่วไหลมีค่าแตกต่างกันไม่มาก และมีค่าน้อยกว่า 1% จะเห็นว่าค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่ตรวจวัดได้ในเพอมีเอทมีค่าน้อยมาก ซึ่งค่าที่วิเคราะห์ได้อาจเกิดจากความคลาดเคลื่อนในการตรวจวิเคราะห์เนื่องจากสีย้อมที่หลุดออกมาในเพอมีเอทอาจส่งผลต่อการตรวจวัดค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการรั่วไหลของเอนไซม์จากระบบมีค่าน้อยมากจึงไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมที่ลดลงเมื่อเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่างของสารละลาย

(ก)



(ข)



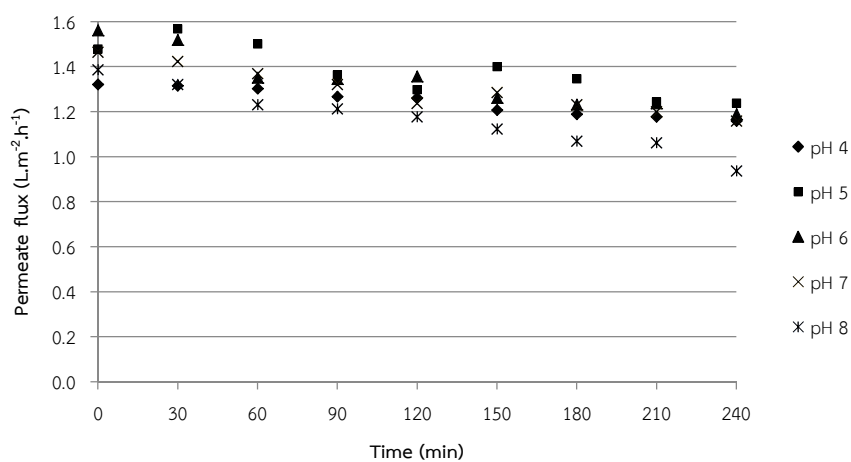
รูปที่ 4.79 เปรี่เซ็นต์การกำจัดสี Acid blue 80 เมื่อเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่างของสารละลายสีย้อมที่ 4, 5, 6, 7 และ 8 ความเข้มข้นของสีย้อมเท่ากับ 30 mg/L เอนไซม์แลคเคส 0.125 U/ml อัตราการไหล 300 ml/min (ก) ถึงปฏิกิริยเยื่อกรอง และ (ข) ถึงปฏิกิริยชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคส

ตารางที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แลคเคสในเพอไมเอทจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองเมื่อเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่างของสารละลายสีย้อมที่ 4-8

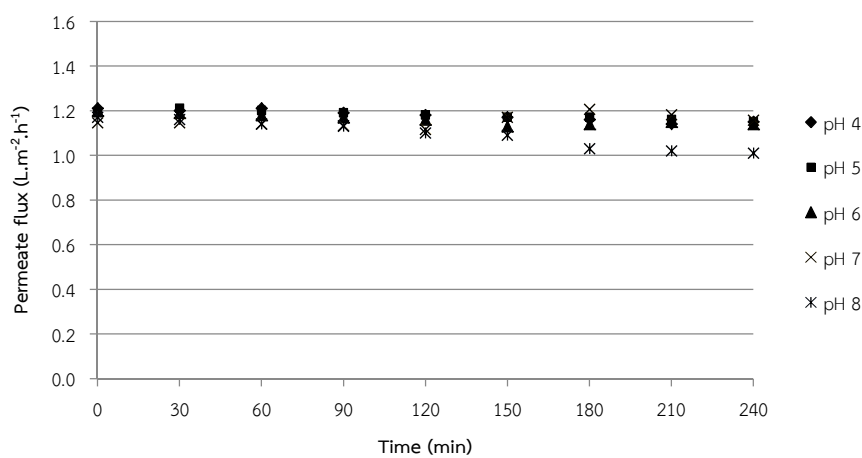
เวลา (นาท)	เอนไซม์แลคเคสในเพอไมเอท (%)				
	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
0	0.31	0.28	0.39	0.47	0.31
30	0.37	0.24	0.51	0.44	0.33
60	0.34	0.32	0.47	0.51	0.46
90	0.29	0.30	0.62	0.52	0.29
120	0.41	0.41	0.38	0.51	0.49
150	0.48	0.38	0.44	0.63	0.57
180	0.50	0.29	0.53	0.55	0.53
210	0.49	0.40	0.67	0.59	0.49
240	0.42	0.38	0.58	0.63	0.42

เมื่อพิจารณาเพอไมเอทพลั๊กซ์กับเวลาในการดำเนินระบบของถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง (รูปที่ 4.80 (ก)) พบว่าเมื่อเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่างของสารละลายสีย้อมที่ 4, 5, 6, 7 และ 8 เพอไมเอทพลั๊กซ์มีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น โดยค่าพลั๊กซ์ที่เวลา 240 นาทีเท่ากับ 1.16, 1.24, 1.19, 1.16 และ 0.94 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อนำพลั๊กซ์ที่เวลา 240 นาทีเปรียบเทียบกับพลั๊กซ์เริ่มต้นพบว่าค่าพลั๊กซ์ของความเป็นกรดต่างที่ 8 มีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด แสดงว่ามีการสะสมของสารบริเวณผิวหน้าของแผ่นเยื่อกรองมากกว่าที่ค่าความเป็นกรดต่างอื่น สำหรับเพอไมเอทพลั๊กซ์กับเวลาในการดำเนินระบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคส (รูปที่ 4.80 (ข)) ค่าพลั๊กซ์ลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับค่าพลั๊กซ์จากถังปฏิกรณ์เยื่อกรองที่ความเป็นกรดต่างของสารละลายเดียวกัน เนื่องจากอาจมีเอนไซม์บางส่วนสะสมที่แผ่นเยื่อกรอง และเพอไมเอทพลั๊กซ์มีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น โดยความเป็นกรดต่างของสารละลายสีย้อมที่ 4, 5, 6, 7 และ 8 ค่าพลั๊กซ์ที่เวลา 240 นาทีเท่ากับ 1.15, 1.15, 1.14, 1.16 และ 1.01 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับพลั๊กซ์เริ่มต้นพบว่าที่ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 มีการลดลงของพลั๊กซ์มากที่สุดเช่นเดียวกับในถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง

(ก)



(ข)

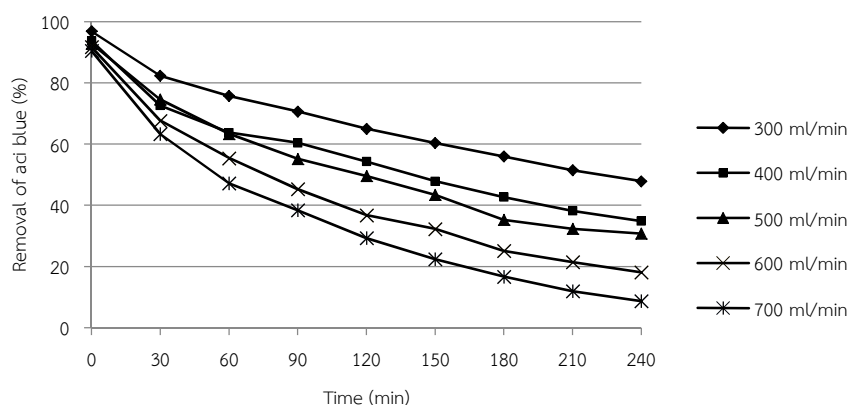


รูปที่ 4.80 เพอเมียวเทฟลักซ์จาก (ก) ถึงปฏิกรณ์เยื่อกรอง และ (ข) ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคส เมื่อเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่างของสารละลายสีย้อมที่ 4, 5, 6, 7 และ 8 ความเข้มข้นของสีย้อม 30 mg/l เอนไซม์แลคเคส 0.125 U/ml อัตราการไหล 300 ml/min

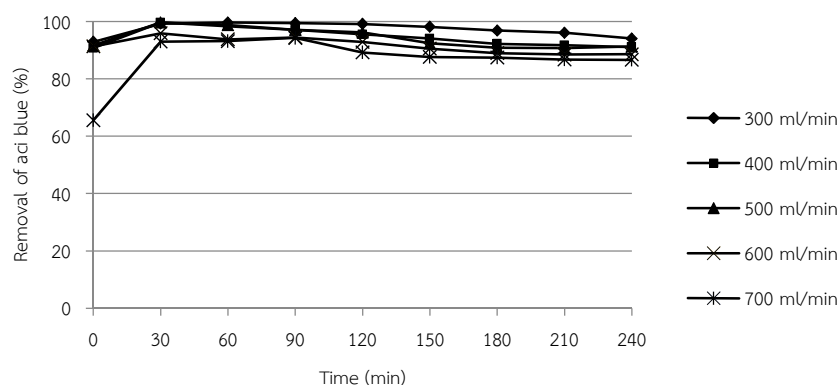
4.3.5 การกำจัดสีของ Acid blue 80 เมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของสารละลายในระบบ

การศึกษาการกำจัดสีของ Acid blue 80 ในถังปฏิกรณ์เยื่อกรองและถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคส เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของสารละลายที่ 300, 400, 500, 600 และ 700 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัด โดยทำการควบคุมความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคสที่ 0.125 ยูนิตต่อ มิลลิลิตร ความเข้มข้นของสี 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเป็นกรดต่างของสารละลายสีของเท่ากับ 7 ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 4.81

(ก)



(ข)



รูปที่ 4.81 เปอร์เซ็นต์การกำจัดสี Acid blue 80 เมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของสารละลายที่ 300, 400, 500, 600 และ 700 ml/min ความเข้มข้นของสีเท่ากับ 30 mg/L พีเอช 7 เอนไซม์แลคเคส 0.125 U/ml (ก) ถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง และ (ข) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคส

จากรูปที่ 4.81 (ก) พิจารณาเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อม Acid blue 80 ด้วยถังปฏิกรณ์เยื่อกรองที่เวลาต่างๆ เมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของสารเข้าระบบ พบว่าการกำจัดสีย้อมมีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น เนื่องจากเกิดการสะสมของอนุภาคสีย้อมที่ผิวหน้าเยื่อกรองส่งผลให้ความเข้มข้นของสีย้อมบริเวณดังกล่าวสูงขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสีย้อมที่ผิวหน้าเยื่อกรองและเพอมีเอทมีความแตกต่างกันมากจะส่งผลให้สีย้อมแพร่ผ่านเยื่อกรองได้มากขึ้นทำให้ค่าการกำจัดสีย้อมลดลง และผลการศึกษายังแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มอัตราการไหลของสารเข้าระบบส่งผลให้สีย้อมหลุดออกมาในเพอมีเอทมากขึ้น ทำให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อมมีแนวโน้มลดลง โดยเมื่อเวลาดำเนินระบบผ่านไป 240 นาที พบว่าสีย้อมถูกกำจัดไป 47.87%, 34.83%, 30.76%, 18.09%, และ 8.68% ที่อัตราการไหลของสารเข้าระบบเท่ากับ 300, 400, 500, 600 และ 700 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ ซึ่งอาจเกิดจากการเพิ่มอัตราการไหลทำให้ความดันในระบบเพิ่มขึ้นส่งผลให้แรงดันส่งผ่านเพอมีเอทเร็วขึ้น การสะสมสีย้อมที่ผิวหน้าเยื่อกรองมากขึ้นและแพร่ผ่านออกมาในเพอมีเอทเพิ่มขึ้น ทำให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อมลดลง และเมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาการกำจัดสีย้อมด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคส (รูปที่ 4.81 (ข)) พบว่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อมที่อัตราการไหลของสารเข้าระบบเดียวกันเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์แลคเคสร่วมกับเยื่อกรอง การเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของสารเข้าระบบยังส่งผลต่อการกำจัดสีย้อม โดยเมื่อเวลาดำเนินระบบผ่านไป 240 นาที พบว่าสีย้อมถูกกำจัดไป 94.00%, 91.04%, 91.20%, 88.57% และ 86.59% ที่อัตราการไหลของสารเข้าระบบเท่ากับ 300, 400, 500, 600 และ 700 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ จะเห็นว่าการเพิ่มอัตราการไหลของสารเข้าระบบทำให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อมลดลงซึ่งเป็นผลจากการเพิ่มอัตราการไหลทำให้ความดันในระบบเพิ่มขึ้นส่งผลให้แรงดันส่งผ่านเพอมีเอทเร็วขึ้น นอกจากนี้การเพิ่มอัตราการไหลทำให้ระยะเวลาสัมผัสระหว่างสีย้อมและเอนไซม์ลดลง การเกิดปฏิกิริยาจึงลดลงเหลือสีย้อมสะสมในระบบและบริเวณผิวหน้าเยื่อกรองมากขึ้น ส่งผลให้บริเวณดังกล่าวมีความเข้มข้นสูงขึ้นจึงเกิดการแพร่ของสีย้อมจากบริเวณที่มีความเข้มข้นมากไปยังบริเวณที่มีความเข้มข้นน้อย ทำให้สีย้อมหลุดออกจากระบบเพิ่มมากขึ้นเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อมจึงลดลง

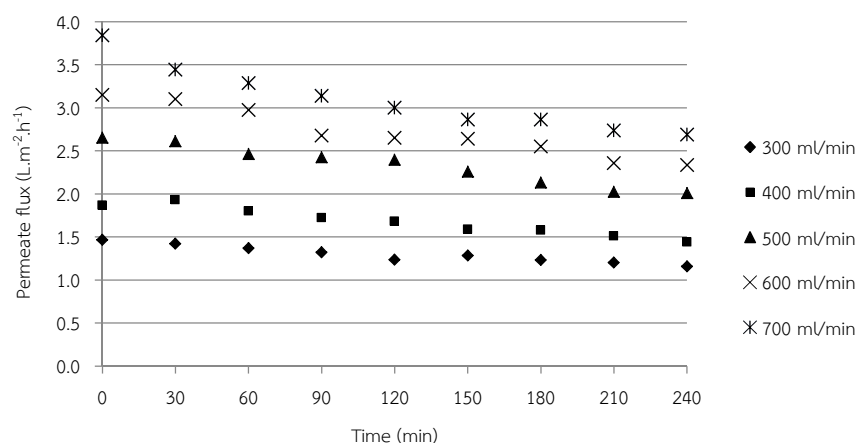
เมื่อพิจารณาถึงการรั่วไหลของเอนไซม์แลคเคสจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง (ตารางที่ 4.5) ที่อัตราการไหลของสารเข้าระบบ 300, 400, 500, 600 และ 700 มิลลิลิตรต่อนาที เปอร์เซ็นต์การรั่วไหลมีค่าแตกต่างกันไม่มาก และมีค่าน้อยกว่า 1% จะเห็นว่าค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่ตรวจวัดได้ในเพอมีเอทมีค่าน้อยมากซึ่งค่าที่วิเคราะห์ได้นี้อาจเกิดจากความคลาดเคลื่อนในการตรวจวิเคราะห์เนื่องจากสีย้อมที่หลุดออกมาในเพอมีเอทอาจส่งผลต่อการตรวจวัดค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการรั่วไหลของเอนไซม์จากระบบมีค่าน้อยมากจึงไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดสีย้อมที่ลดลงเมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของสารเข้าระบบ

ตารางที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แลคเคสในเพอมีเอทจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองเมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของสารเข้าระบบในช่วง 300-700 ml/min

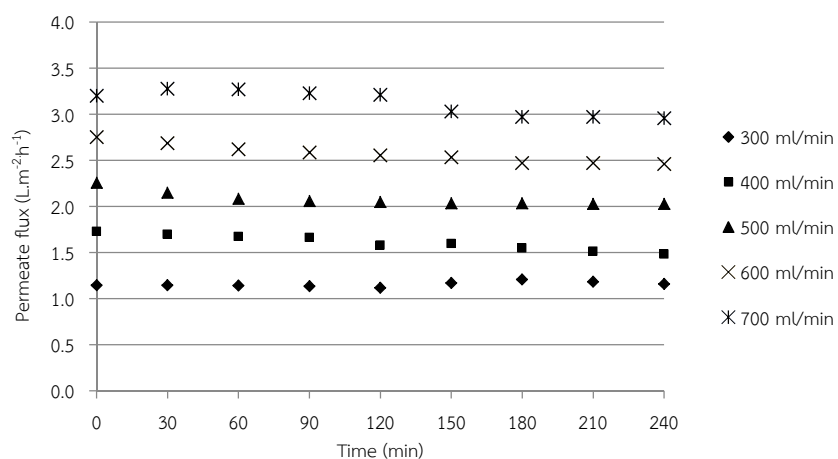
เวลา (นาท)	เอนไซม์แลคเคสในเพอมีเอท (%)				
	300 ml/min	400 ml/min	500 ml/min	600 ml/min	700 ml/min
0	0.61	0.66	0.58	0.62	0.54
30	0.48	0.42	0.60	0.60	0.48
60	0.63	0.38	0.57	0.63	0.41
90	0.61	0.42	0.57	0.57	0.51
120	0.51	0.41	0.59	0.56	0.51
150	0.60	0.56	0.61	0.58	0.31
180	0.59	0.60	0.61	0.60	0.46
210	0.48	0.54	0.48	0.63	0.48
240	0.52	0.50	0.54	0.59	0.52

เมื่อพิจารณาถึงค่าเพอมีเอทฟลักซ์กับเวลาในการดำเนินระบบของถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง (รูปที่ 4.82 (ก)) พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการไหลของสารเข้าระบบเป็น 300, 400, 500, 600 และ 700 มิลลิลิตรต่อนาที ค่าฟลักซ์มีแนวโน้มลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเวลาในการดำเนินระบบมากขึ้น โดยเฉพาะที่อัตราการไหลของสารเข้าระบบสูงขึ้น เนื่องจากการเพิ่มอัตราการไหลของสารส่งผลให้ปริมาณสารละลายสีย้อมไหลเข้ามาในระบบมากทำให้เกิดการไหลผ่านและสะสมบริเวณผิวหน้าเยื่อกรองมากขึ้น จึงทำให้ค่าเพอมีเอทฟลักซ์ลดลงมากเมื่ออัตราการไหลของสารเพิ่มสูงขึ้น สำหรับเพอมีเอทฟลักซ์กับเวลาในการดำเนินระบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคส (รูปที่ 4.82 (ข)) พบว่าค่าเพอมีเอทฟลักซ์จากระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่อัตราการไหลของสารเข้าระบบเท่ากันมีค่าน้อยกว่าเพอมีเอทฟลักซ์ที่ได้จากถังปฏิกรณ์เยื่อกรอง เนื่องจากมีเอนไซม์บางส่วนสะสมที่แผ่นเยื่อกรอง และสีย้อมมีการสะสมบริเวณผิวหน้าเยื่อกรองเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราการไหลของสารเข้าระบบสูงขึ้นส่งผลให้เพอมีเอทฟลักซ์ลดลง โดยอัตราการไหลของสารเข้าระบบที่ 300, 400, 500, 600 และ 700 มิลลิลิตรต่อนาที ให้ค่าเพอมีเอทฟลักซ์ที่เวลา 240 นาทีเท่ากับ 1.16, 1.48, 2.03, 2.46 และ 2.96 ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง

(ก)



(ข)



รูปที่ 4.82 เอมิเอทพลักซ์จาก (ก) ถึงปฏิกรณ์เยื่อกรอง และ (ข) ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคส เมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของสารเข้าระบบที่ 300, 400, 500, 600 และ 700 ml/min ความเข้มข้นของสีย้อม 30 mg/l พีเอช 7 เอนไซม์แลคเคส 0.125 U/ml

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เอนไซม์แลคเคสสกัดจาก *Lentinus polychrous* Lev. ที่เพาะเลี้ยงในอาหารจากวัสดุแกลบและรำเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นเอนไซม์แลคเคสในรูปเอนไซม์หยาบถูกนำมาใช้ในการฟอกจางสีย้อม โดยแบ่งการศึกษาเป็น 2 ส่วนหลักคือ 1) การฟอกจางสีย้อมด้วยเอนไซม์แลคเคสหยาบในชุดทดลองแบบแบทช์เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นของสีย้อม การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ และผลของสารเติมที่มีต่อการฟอกจางสีย้อมด้วยเอนไซม์แลคเคส และ 2) การฟอกจางสีย้อมด้วยแลคเคสในชุดทดลองในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง โดยจะศึกษาถึงการกักกันเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง การจัดสีย้อมด้วยถังปฏิกรณ์เยื่อกรองและถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคสเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นของสีย้อม การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่าง และอัตราการไหลของสารเข้าสู่ระบบ สามารถสรุปผลการศึกษาดังนี้

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 การฟอกจางสีย้อมด้วยเอนไซม์หยาบแลคเคสในชุดทดลองแบบแบทช์

เอนไซม์หยาบแลคเคสสามารถฟอกจางสี Acid blue 80 ได้ 100% ในเวลา 30 นาที เมื่อใช้ปริมาณสี 5-10 µg เมื่อทดสอบสี Acid Green 27 ปริมาณ 30 µg พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงสุดที่ระดับ 26.51% ในเวลา 6 วัน ในขณะที่การทดสอบสี Alizarin Red พบว่าเอนไซม์หยาบแลคเคสไม่สามารถฟอกจางสีได้ จากผลการศึกษากการฟอกจางสีกลุ่ม anthraquinone โดยใช้เอนไซม์หยาบแลคเคสพบว่าสามารถฟอกจางสี Acid blue 80 ได้ดีกว่าสี Acid Green 27 และ Alizarin Red เมื่อทดสอบการฟอกจางสี Indigo carmine ปริมาณ 20 µg พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงสุดที่ระดับ 8.55% ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ต่ำเช่นเดียวกับการฟอกจางสี Reactive Green 19 ปริมาณ 10 µg และ Reactive Orange 16 ปริมาณ 30 µg มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงสุดที่ระดับ 10.34% และ 0.12% ตามลำดับ ซึ่งสีกลุ่ม indigo และ azo ชนิด Indigo carmine, Reactive Green 19 และ Reactive Orange 16 ไม่สามารถฟอกจางสีด้วยเอนไซม์หยาบแลคเคสได้ดีในสภาวะที่ทำการทดสอบ เช่นเดียวกับผลการทดสอบฟอกจางสี diazo ชนิด Direct blue 71 มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงสุดที่ระดับ 0.16%

การทดสอบสภาวะการฟอกจางสีกลุ่มต่างๆ ด้วยเอนไซม์หยาบแลคเคส พบว่าสภาวะความเป็นกรดต่างในช่วง 4-5 มีความเหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาการฟอกจางสี ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัย พบว่าความเสถียรของเอนไซม์แลคเคสที่ได้จากเชื้อราส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วงค่าความเป็นกรด (Leonowicz et al., 1984) รายงานการศึกษาของ Michniewicz และคณะในปี 2008 (Michniewicz et al., 2008) พบว่าค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมของการฟอกจางสี azo และ anthraquinone ด้วยเอนไซม์หยาบแลคเคสจาก *Cerrena unicolor* มีค่าความเป็นกรดต่างประมาณ 3.5 รายงานการศึกษาการฟอกจางสีโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่างสูง พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสลดลง เนื่องจากการจับของแอนไอออนไฮดรอก

ไซต์กับคอปเปอร์ที่อยู่ในโมเลกุลของแลคเคสในบริเวณ T2/T3 ทำให้ขัดขวางการขนส่งอิเล็กตรอนภายในจาก T1 ไปยังส่วนกลางของ T2/T3 (Muñoz et al., 1997) ความเสถียรของเอนไซม์แลคเคสที่ได้จากเชื้อราส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วงค่าความเป็นกรด (Leonowicz et al., 1984)

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสจากสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน จะมีช่วงอุณหภูมิทำงานแตกต่างกัน นอกจากนี้ผลการศึกษายังพบว่าเอนไซม์แลคเคสสามารถฟอกจางสีย้อมต่างชนิดได้ดีในช่วงอุณหภูมิต่างกันในช่วง 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส เอนไซม์แลคเคสจากสิ่งมีชีวิตบางชนิดมีค่าอุณหภูมิการทำงานต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส และเอนไซม์แลคเคสที่มีค่ากิจกรรมการทำงานที่เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีค่าครึ่งชีวิต (half life) เป็นช่วงเวลานานที่ของเอนไซม์จากเชื้อ *Bacillus cinnerea* (Slomczynski et al., 1995) มีค่ามากกว่า 2-3 ชั่วโมง ของเอนไซม์จากเชื้อ *L. edodes* และ *Agaricus bisporus* (D'Annibale et al., 2000) มีค่ามากกว่า 50-70 ชั่วโมง ของเอนไซม์จากเชื้อ *Trametes* sp. (Smirnov et al., 2001) ในขณะที่ของเอนไซม์จากเชื้อ *Ganoderma lucidum* เสี่ยงสภาพแบบถาวรที่อุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญในการใช้เอนไซม์ฟอกจางสีย้อม (Murugesan et al., 2007; Zeng et al., 2011)

ผลการศึกษาการฟอกจางสีย้อมชนิดต่างๆ ร่วมกับสารที่มีโอกาสพบในน้ำเสียที่มีการเจือปนของสีย้อม ได้แก่ NaN_3 , Na_2SO_4 , Na_2CO_3 และ NaCl ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 mM พบว่าสารเหล่านี้ส่งผลต่อการฟอกจางสีย้อมชนิดต่างๆ แตกต่างกัน เช่นในปฏิกิริยาการฟอกจางสี Acid blue 80 สาร NaN_3 สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในการฟอกจางสีในเวลา 10 นาที เมื่อทดสอบสาร Na_2CO_3 พบว่าสามารถทำให้เกิดการฟอกสี 100% ที่ระดับความเข้มข้น 20 mM ในเวลา 30 นาที และสาร Na_2SO_4 ที่ระดับความเข้มข้น 5 mM สามารถฟอกจางสีได้ 97% ในเวลา 30 นาที สำหรับการเติม NaCl ทำให้เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีต่ำกว่าชุดควบคุมในช่วง 20 นาทีและเริ่มมีเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงกว่าชุดควบคุมในเวลา 30 นาที สำหรับการฟอกจางสี Indigo carmine ผลการศึกษาพบว่าสาร NaN_3 สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในการฟอกจางสี เช่นเดียวกับสาร Na_2CO_3 และเมื่อทดสอบการฟอกจางสีโดยเติม Na_2SO_4 พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับศูนย์เมื่อบ่มเป็นเวลา 50 นาที ในกรณีที่เติมสาร NaCl 20 mM พบว่าเปอร์เซ็นต์เท่ากับศูนย์ตั้งแต่เริ่มทำปฏิกิริยา ส่วนการฟอกจางสี Reactive Green 19 ผลการศึกษาพบว่าสารประกอบ NaN_3 ทำให้เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงกว่าชุดควบคุม เมื่อทำการเติม 5 mM Na_2CO_3 ไม่ทำให้เกิดการฟอกจางสีดีขึ้น และเมื่อทำการทดสอบสาร Na_2SO_4 พบว่าความเข้มข้น 5 mM ทำให้เกิดการฟอกจางสีสูงกว่าชุดควบคุม เมื่อบ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 40 นาที คำนวณได้ 24.13% แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาการบ่มปฏิกิริยาการฟอกจางสีลดต่ำลงใกล้เคียงศูนย์ในทุกๆระดับความเข้มข้นของ Na_2SO_4 ส่วนการเติม NaCl พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีมีค่าสูงกว่าชุดควบคุมในช่วง 0.5-3.5%

ในการฟอกจางสี Reactive Orange 16 พบว่าสาร NaN_3 10 mM ให้เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงกว่าชุดควบคุม เมื่อบ่มเป็นเวลา 50 นาที คำนวณเปอร์เซ็นต์ได้ 8.58% แต่การบ่มเป็นเวลา 60 นาที เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเป็นศูนย์ การทดสอบ Na_2CO_3 พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงกว่าชุดควบคุม โดยความเข้มข้น 5 และ 10 mM มีเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงสุดเท่ากับ 6.69% และ 7.83% ตามลำดับ เมื่อบ่มเป็นเวลา 30 นาที แต่ในเวลาที่ 40 ถึง 50 นาทีเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีใกล้ศูนย์ ในทุกความเข้มข้นของ Na_2CO_3 สำหรับการทดสอบ Na_2SO_4 พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีลดลงตั้งแต่เวลา 20 นาทีเป็นต้นไป และการทดสอบ NaCl พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับศูนย์เมื่อระยะเวลาการบ่มปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ส่วนการฟอกจางสี Acid Green 27 เมื่อเติม NaN_3 ในปฏิกิริยาไม่เกิดการฟอกจางสี เมื่อทำการเติม 5 mM NaCl ร่วมกับ

การทำปฏิกิริยาฟอกจางสี มีเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงสุดเท่ากับ 3.13% ในวันที่ 5 ส่วนการเติม 5 mM Na_2CO_3 ร่วมกับปฏิกิริยาการฟอกจางสี Acid Green 27 มีค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีสูงสุดเท่ากับ 4.42% ในขณะที่การผสม Na_2SO_4 พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีเท่ากับศูนย์ ส่วนการฟอกจางสี Alizarin Red และ Direct Blue 71 พบว่าการเติมสารตัวกลางชนิดต่างๆ ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการฟอกจางสีได้ ถึงแม้จะทำการบ่มปฏิกิริยาในระยะเวลา 6 พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีต่ำกว่า 1% จากผลการศึกษาสรุปได้ว่า สารตัวกลางที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาฟอกจางสีมีข้อเสียหลายด้าน เช่น การทำให้เอนไซม์สูญเสียกิจกรรม และความเข้มข้นของสารตัวกลางที่ไม่เหมาะสมส่งผลต่อการยับยั้งการฟอกจางสีข้าม

5.1.2 การฟอกจางสีข้ามโดยเอนไซม์แลคเคสหยาบในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรอง

การทดสอบความสามารถของการกักเอนไซม์ในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองก่อนนำไปใช้กำจัดสีข้าม เมื่ออัตราการไหลของสารเข้าระบบเยื่อกรองถูกควบคุมที่ 300 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์มีค่ากิจกรรมการทำงานเหลือมากกว่า 60% ที่เวลา 240 นาที ส่วนค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่พบในเพอมีอเทที่เวลาเริ่มต้นมีค่าน้อยกว่า 5% และลดลงเรื่อยๆจนกระทั่งไม่ปรากฏแสดงให้เห็นว่าเยื่อกรองสามารถกักเอนไซม์ได้และปริมาณเอนไซม์ที่หายไปจากถังปฏิกรณ์อาจเกิดจากเอนไซม์ถูกดูดซับที่ผิวหน้าของแผ่นเยื่อกรอง

เมื่อนำถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคสมากำจัดสีข้ามชนิด Acid blue 80 โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นของสีข้าม ค่าความเป็นกรดต่างของสารละลาย และอัตราการไหลของสารเข้าระบบ สรุปได้ดังนี้ คือ

การกำจัดสีข้ามในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคสเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์และความเข้มข้นของสีข้ามเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัด โดยทำการควบคุมค่าความเป็นกรดต่างของสารละลายสีข้ามเท่ากับ 7 อัตราการไหลของสารที่ 300 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีข้ามที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตรมีค่าเพิ่มขึ้นโดยที่เวลา 240 นาทีเท่ากับ 67.72%, 82.64%, 91.75% และ 94.00% ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.013, 0.025, 0.063 และ 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับการใช้สีข้ามที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นเมื่อควบคุมความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จะส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดสีข้ามมีแนวโน้มลดลง โดยเมื่อเวลาดำเนินระบบผ่านไป 240 นาที พบว่าสีข้ามถูกกำจัดไป 98.90%, 98.60%, 94.00%, 92.12% และ 96.69% ที่ความเข้มข้นของสีข้ามเท่ากับ 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการกำจัดสีข้ามจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น

การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดต่างของสารละลายส่งผลต่อการกำจัดสีข้าม โดยเมื่อเวลาดำเนินระบบผ่านไป 240 นาที พบว่าสีข้ามถูกกำจัดไป 89.22%, 90.97%, 92.51%, 94.00% และ 75.98% ที่ความเป็นกรดต่างของสารละลายสีข้ามเท่ากับ 4, 5, 6, 7 และ 8 ตามลำดับ ในขณะที่ผลการทดลองฟอกจางสี Acid blue 80 ในชุดทดลองแบบแบทช์ เอนไซม์แลคเคสทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรด 4-5 และเมื่อเอนไซม์อยู่ในสภาวะที่เป็นด่างจะส่งผลให้เสถียรภาพและความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ลดลง ทำปฏิกิริยากับสี

ย้อมได้น้อยลง และเมื่อดำเนินระบบถึงปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองนานขึ้นจะทำให้เกิดการสะสมของสีย้อมที่ผิวหน้าเยื่อกรองมากขึ้น สีย้อมที่สะสมบริเวณดังกล่าวสามารถแพร่ผ่านเยื่อกรองมากขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ดังนั้นเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อมที่ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 จึงต่ำกว่าทุกระดับ ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าสารละลายสีย้อมที่มีค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 6-7 เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการกำจัดสีย้อมด้วยถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคส

การเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลของสารเข้าระบบส่งผลต่อการกำจัดสีย้อม โดยเมื่อเวลาดำเนินระบบผ่านไป 240 นาที พบว่าสีย้อมถูกกำจัดไป 94.00%, 91.04%, 91.20%, 88.57% และ 86.59% ที่อัตราการไหลของสารเข้าระบบเท่ากับ 300, 400, 500, 600 และ 700 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ การเพิ่มอัตราการไหลของสารเข้าระบบทำให้เปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อมลดลงเป็นผลจากการเพิ่มอัตราการไหลทำให้ความดันในระบบเพิ่มขึ้นส่งผลให้แรงดันส่งผ่านเพอมีเอทเร็วขึ้น และการเพิ่มอัตราการไหลทำให้ระยะเวลาสัมผัสระหว่างสีย้อมและเอนไซม์ลดลง การเกิดปฏิกิริยาจึงลดลงเหลือสีย้อมสะสมในระบบและบริเวณผิวหน้าเยื่อกรองมากขึ้น ส่งผลให้บริเวณดังกล่าวมีความเข้มข้นสูง สีย้อมจึงหลุดออกจากระบบเพิ่มขึ้น

สำหรับการกำจัดสีย้อม Acid blue 80 ด้วยถังปฏิกรณ์เยื่อกรองที่ปราศจากเอนไซม์แลคเคส เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสีย้อม ค่าความเป็นกรดต่างของสารละลาย และอัตราการไหลของสารเข้าระบบ พบว่าการเปลี่ยนแปลงปัจจัยดังกล่าวส่งผลต่อการกำจัดสีย้อมของระบบ และแนวโน้มการกำจัดสีย้อมมีการลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อเวลาในการดำเนินระบบเพิ่มขึ้น เนื่องจากอนุภาคของสีย้อม Acid blue 80 มีขนาดเล็กกว่าขนาดรูพรุนของแผ่นเยื่อกรอง สีย้อมจึงผ่านเยื่อกรองได้อย่างต่อเนื่อง และเมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การกำจัดสีย้อมกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคสในสภาวะดำเนินระบบที่เหมาะสมสามารถที่จะกำจัดสีย้อมได้มากกว่า 90% แสดงให้เห็นว่าระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีเอนไซม์แลคเคสมีประสิทธิภาพช่วยกำจัดสีย้อม Acid blue 80 ได้เป็นอย่างดี

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 เพื่อประสิทธิภาพการฟอกจางสีย้อมที่ดีขึ้น อาจจำเป็นต้องมีการแยกเอนไซม์แลคเคสให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น เพื่อลดปัญหาในการทำงานของเอนไซม์ และกลุ่มสีย้อมที่ใช้จะต้องมีการทดสอบชนิดที่แตกต่างกันมากกว่านี้ ซึ่งสีย้อมในกลุ่มเดียวกันที่มีโครงสร้างต่างกัน ก็มีความจำเพาะต่อเอนไซม์แลคเคสไม่เหมือนกัน ดังนั้น การศึกษาผลของโครงสร้างของสีย้อมจึงมีแนวโน้มนำไปสู่การเลือกใช้เอนไซม์ที่เหมาะสมในการกำจัดสีย้อมที่ปนเปื้อนได้ดีที่สุด เนื่องจากเอนไซม์แลคเคสมีความจำเพาะเจาะจงน้อยจึงสามารถใช้สารตั้งต้นได้หลายชนิด

5.2.2 การใช้แผ่นเยื่อกรองอัลตราขนาดคัดกรองน้ำหนักโมเลกุล (MWCO) 10 kDa ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แลคเคสทำให้เอนไซม์ถูกกักในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองได้ดี อย่างไรก็ตาม การใช้แผ่นเยื่อกรองอัลตราขนาดคัดกรองน้ำหนักโมเลกุลที่เล็กเกินไปอาจส่งผลต่อการลดลงของเพอมีเอทลักซ์ ทำให้เกิดปัญหาอุดตันได้ง่าย และประสิทธิภาพในการกำจัดสีย้อมที่ได้จะต่างกัน

5.2.3 ผลการกำจัดสีย้อม Acid blue 80 ในระบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพเยื่อกรองที่มีแลคเคสให้ค่าการกำจัดสีย้อมสูง ดังนั้นจึงควรมีการทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดสีย้อมโดยใช้น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีองค์ประกอบเสมือนน้ำเสียที่มาจากกระบวนการฟอกย้อมจริง เพื่อจะได้นำไปประยุกต์ใช้จริงต่อไป

5.2.4 ควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากเอนไซม์แลคเคสย่อยสลายสีย้อมว่ามีโครงสร้างเป็นสารชนิดใด มีลักษณะที่เป็นอันตรายหรือไม่

เอกสารอ้างอิง

- Abadulla, E., Robra, K.-H., Gübitz, G.M., Silva, L.M. and Cavaco-Paulo, A., 2000. Enzymatic decolorization of textile dyeing effluents *Textile Research Journal*, 70(5): 409-414.
- Al-Bastaki, N. and Banat, F., 2004. Combining ultrafiltration and adsorption on bentonite in a one-step process for the treatment of colored waters. *Resources, Conservation and Recycling*, 41(2): 103-113.
- Asadgol, Z., Forootanfar, H., Rezaei, S., Mahvi, A.H. and Faramarzi, M.A., 2014. Removal of phenol and bisphenol-A catalyzed by laccase in aqueous solution. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 12(1): 1-5.
- Barrios-Martinez, A., Barbot, E., Marrot, B., Moulin, P. and Roche, N., 2006. Degradation of synthetic phenol-containing wastewaters by MBR. *Journal of Membrane Science*, 281(1-2): 288-296.
- Belafi-Bako, K., Eszterle, M., Kiss, K., Nemestothy, N. and Gubicza, L., 2007. Hydrolysis of pectin by *Aspergillus niger* polygalacturonase in a membrane bioreactor. *Journal of Food Engineering*, 78(2): 438-442.
- Belfort, G., Davis, R.H. and Zydney, A.L., 1994. The behavior of suspensions and macromolecular solutions in crossflow microfiltration. *Journal of Membrane Science*, 96(1-2): 1-58.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
- Bryjak, J., Bryjak, M. and Noworyta, A., 1996. Membrane reactor with soluble forms of penicillin acylase. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(3): 196-201.
- Chhabra, M., Mishra, S. and Sreekrishnan, T.R., 2009. Laccase/mediator assisted degradation of triarylmethane dyes in a continuous membrane reactor. *Journal of Biotechnology*, 143(1): 69-78.
- Ciardelli, G. and Ranieri, N., 2001. The treatment and reuse of wastewater in the textile industry by means of ozonation and electroflocculation. *Water Research*, 35(2): 567-572.
- Claus, H., 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*, 35(1-2): 93-96.
- Couto, S.R. and Toca-Herrera, J.L., 2007. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*, 25(6): 558-569.
- D'Annibale, A., Stazi, S.R., Vinciguerra, V. and Giovannozzi Sermanni, G., 2000. Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *Journal of Biotechnology*, 77(2-3): 265-273.
- Daâssi, D., Frikha, F., Zouari-Mechichi, H., Belbahri, L., Woodward, S. and Mechichi, T., 2012. Application of response surface methodology to optimize decolourization of dyes by the laccase-mediator system. *Journal of Environmental Management*, 108: 84-91.

- Dina Afonso, M., Ferrer, J. and Borquez, R., 2004. An economic assessment of proteins recovery from fish meal effluents by ultrafiltration. *Trends in Food Science & Technology*, 15(10): 506-512.
- Enayatzamir, K., Alikhani, H.A. and Rodríguez Couto, S., 2009. Simultaneous production of laccase and decolouration of the diazo dye Reactive Black 5 in a fixed-bed bioreactor. *Journal of Hazardous Materials*, 164(1): 296-300.
- Gaouar, O., Zakhia, N., Aymard, C. and Rios, G.M., 1998. Production of maltose syrup by bioconversion of cassava starch in an ultrafiltration reactor. *Industrial Crops and Products*, 7(2-3): 159-167.
- Gómez, J., Pazos, M., Rodríguez Couto, S. and Sanromán, M.Á., 2005. Chestnut shell and barley bran as potential substrates for laccase production by *Coriolopsis rigida* under solid-state conditions. *Journal of Food Engineering*, 68(3): 315-319.
- Howell, J.A., Wu, D. and Field, R.W., 1999. Transmission of bovine albumin under controlled flux ultrafiltration. *Journal of Membrane Science*, 152(1): 117-127.
- Johannes, C. and Majcherczyk, A., 2000. Laccase activity tests and laccase inhibitors. *Journal of Biotechnology*, 78(2): 193-199.
- Kalme, S., Jadhav, S., Jadhav, M. and Govindwar, S., 2009. Textile dye degrading laccase from *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112. *Enzyme and Microbial Technology*, 44(2): 65-71.
- Kariminiaae-Hamedani, H.-R., Sakurai, A. and Sakakibara, M., 2007. Decolorization of synthetic dyes by a new manganese peroxidase-producing white rot fungus. *Dyes and Pigments*, 72(2): 157-162.
- Katuri, K.P., Venkata Mohan, S., Sridhar, S., Pati, B.R. and Sarma, P.N., 2009. Laccase-membrane reactors for decolorization of an acid azo dye in aqueous phase: Process optimization. *Water Research*, 43(15): 3647-3658.
- Khammuang, S. and Sarnthima, R., 2007. Laccase from spent mushroom compost of *Lentinus polychrous* Lev. and its potential for remazol brilliant blue R decolourisation. *Biotechnology* (6): 408-413.
- Kim, T.-H., Park, C. and Kim, S., 2005. Water recycling from desalination and purification process of reactive dye manufacturing industry by combined membrane filtration. *Journal of Cleaner Production*, 13(8): 779-786.
- Kimura, K., Hara, H. and Watanabe, Y., 2005. Removal of pharmaceutical compounds by submerged membrane bioreactors (MBRs). *Desalination*, 178(1-3): 135-140.
- Konsowa, A.H., 2003. Decolorization of wastewater containing direct dye by ozonation in a batch bubble column reactor. *Desalination*, 158(1-3): 233-240.
- Kunamneni, A., Ghazi, I., Camarero, S., Ballesteros, A., Plou, F.J. and Alcalde, M., 2008. Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers. *Process Biochemistry*, 43(2): 169-178.

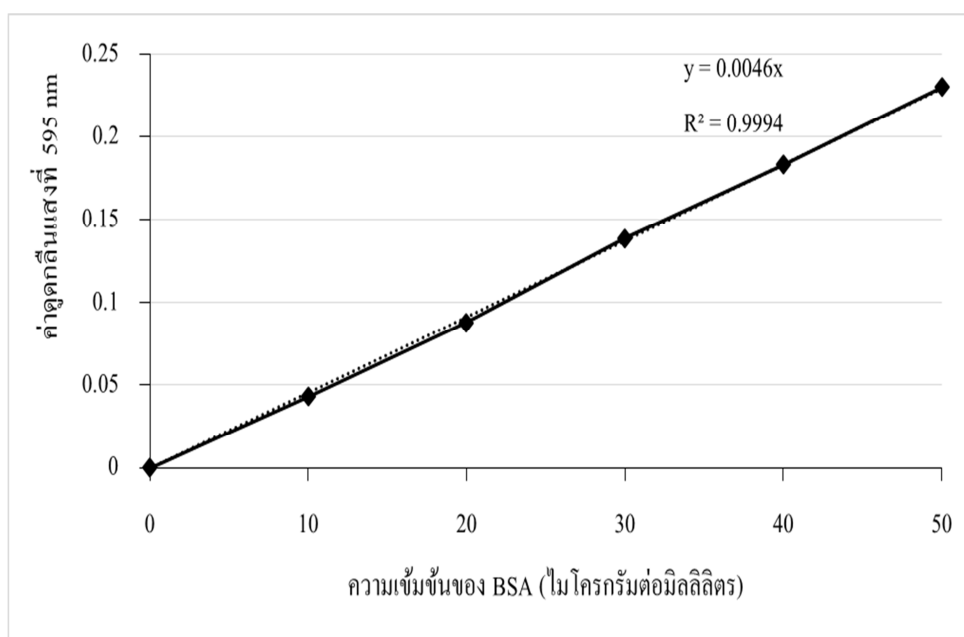
- Lante, A., Crapisi, A., Krastanov, A. and Spettoli, P., 2000. Biodegradation of phenols by laccase immobilised in a membrane reactor. *Process Biochemistry*, 36(1–2): 51-58.
- Leonowicz, A., Edgehill, R.U. and Bollag, J.M., 1984. The effect of pH on the transformation of syringic and vanillic acids by the laccases of *Rhizoctonia praticola* and *Trametes versicolor*. *Archives of Microbiology*, 137(2): 89-96.
- Lin, S.H. and Peng, C.F., 1996. Continuous treatment of textile wastewater by combined coagulation, electrochemical oxidation and activated sludge. *Water Research*, 30(3): 587-592.
- Liu, G., Zhou, J., Meng, X., Fu, S., Wang, J., Jin, R. and Lv, H., 2013. Decolorization of azo dyes by marine *Shewanella* strains under saline conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(9): 4187-4197.
- Lopez, C., Mielgo, I., Moreira, M.T., Feijoo, G. and Lema, J.M., 2002. Enzymatic membrane reactors for biodegradation of recalcitrant compounds. Application to dye decolourisation. *Journal of Biotechnology*, 99(3): 249-257.
- Mayer, A.M. and Staples, R.C., 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 60(6): 551-565.
- Michniewicz, A., Ledakowicz, S., Ullrich, R. and Hofrichter, M., 2008. Kinetics of the enzymatic decolorization of textile dyes by laccase from *Cerrena unicolor*. *Dyes and Pigments*, 77(2): 295-302.
- Muller, C.H., Agarwal, G.P., Melin, T. and Wintgens, T., 2003. Study of ultrafiltration of a single and binary protein solution in a thin spiral channel module. *Journal of Membrane Science*, 227(1-2): 51-69.
- Muñoz, C., Guillén, F., Martínez, A.T. and Martínez, M.J., 1997. Induction and Characterization of Laccase in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus eryngii*. *Current Microbiology*, 34(1): 1-5.
- Murugesan, K., Nam, I.-H., Kim, Y.-M. and Chang, Y.-S., 2007. Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(7): 1662-1672.
- Niladevi, K.N. and Prema, P., 2008. Effect of inducers and process parameters on laccase production by *Streptomyces psammotus* and its application in dye decolourization. *Bioresource Technology*, 99(11): 4583-4589.
- Nyanhongo, G.S., Gomes, J., Gübitz, G.M., Zvauya, R., Read, J. and Steiner, W., 2002. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Research*, 36(6): 1449-1456.
- Ong, S.T., Lee, C.K. and Zainal, Z., 2007. Removal of basic and reactive dyes using ethylenediamine modified rice hull. *Bioresource Technology*, 98(15): 2792-2799.
- Riva, S., 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*, 24(5): 219-226.

- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. and Nigam, P., 2001. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*, 77(3): 247-255.
- Rodríguez Couto, S., 2009. Dye removal by immobilised fungi. *Biotechnology Advances*, 27(3): 227-235.
- Rodríguez Couto, S. and Toca Herrera, J.L., 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*, 24(5): 500-513.
- Roriz, M.S., Osma, J.F., Teixeira, J.A. and Rodríguez Couto, S., 2009. Application of response surface methodological approach to optimise Reactive Black 5 decolouration by crude laccase from *Trametes pubescens*. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1-3): 691-696.
- Rosconi, F., Fraguas, L.F., Martínez-Drets, G. and Castro-Sowinski, S., 2005. Purification and characterization of a periplasmic laccase produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(5-6): 800-807.
- Sadhasivam, S., Savitha, S., Swaminathan, K. and Lin, F.-H., 2008. Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1. *Process Biochemistry*, 43(7): 736-742.
- Saito, T., Hong, P., Kato, K., Okazaki, M., Inagaki, H., Maeda, S. and Yokogawa, Y., 2003. Purification and characterization of an extracellular laccase of a fungus (family Chaetomiaceae) isolated from soil. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(4): 520-526.
- Sarnthima, R., Khammuang, S. and Svasti, J., 2009. Extracellular ligninolytic enzymes by *Lentinus polychrous* Lev. under solid-state fermentation of potential agro-industrial wastes and their effectiveness in decolorizing indigo carmine. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*(14): 513-522.
- Scholz, W. and Fuchs, W., 2000. Treatment of oil contaminated wastewater in a membrane bioreactor. *Water Research*, 34(14): 3621-3629.
- Siddiqui, M.F., Andleeb, S., Ali, N., Ghumro, P.B. and Ahmed, S., 2010. Biotreatment of anthraquinone dye Drimarene Blue K2RL. *African Journal of Environmental Science and Technology* 4(1): 045-050.
- Smirnov, S.A., Koroleva, O.V., Gavrilova, V.P., Belova, A.B. and Klyachko, N.L., 2001. Laccases from basidiomycetes: physicochemical characteristics and substrate specificity towards methoxyphenolic compounds. *Biochemistry*, 66(7): 774-779.
- Suwannawong, P., Khammuang, S. and Sarnthima, R., 2010. Decolorization of rhodamine B and congo red by partial purified laccase from *Lentinus polychrous* Lév. *Journal of Biochemical Technology* 2(3): 182-186.
- Tang, C. and Chen, V., 2002. Nanofiltration of textile wastewater for water reuse. *Desalination*, 143(1): 11-20.

- Tatarko, M. and Bumpus, J.A., 1998. Biodegradation of congo red by *Phanerochaete chrysosporium*. *Water Research*, 32(5): 1713-1717.
- Tauber, M.M., Gübitz, G.M. and Rehorek, A., 2008. Degradation of azo dyes by oxidative processes – Laccase and ultrasound treatment. *Bioresource Technology*, 99(10): 4213-4220.
- Thomas, H. and Murrer, J., 2001. Fouling characteristics of membrane filtration in membrane bioreactors. *Membrane Technology*, 122: 10-13.
- Wang, C., Wei, X. and Zhao, M., 2008. Isolation and characterization of spore-bound laccase from *Bacillus subtilis* WW0723. *Journal of Biotechnology*, 136(Supplement 1): S326-S326.
- Wesenberg, D., Kyriakides, I. and Agathos, S.N., 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*, 22(1-2): 161-187.
- Wong, P.K. and Yuen, P.Y., 1996. Decolorization and biodegradation of methyl red by *Klebsiella pneumoniae* RS-13. *Water Research*, 30(7): 1736-1744.
- Zeng, X., Cai, Y., Liao, X., Zeng, X., Li, W. and Zhang, D., 2011. Decolorization of synthetic dyes by crude laccase from a newly isolated *Trametes trogii* strain cultivated on solid agro-industrial residue. *Journal of Hazardous Materials*, 187(1-3): 517-525.
- Zhang, M., Wu, F., Wei, Z., Xiao, Y. and Gong, W., 2006. Characterization and decolorization ability of a laccase from *Panus rudis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(1): 92-97.
- Zouari-Mechichi, H., Mechichi, T., Dhouib, A., Sayadi, S., Martínez, A.T. and Martínez, M.J., 2006. Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(1): 141-148.

1. กราฟมาตรฐานของโปรตีน

เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (Stock solution) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยชั่งสาร BSA (Bovine Serum Albumin) มา 0.1 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เตรียมสารละลาย BSA จาก Stock solution ที่ความเข้มข้น 0 – 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารละลายโปรตีนมา 100 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Bradford reagent 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่น 700 ไมโครลิตร แล้วนำไว้วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ผลแสดงดังรูปที่ ก.1



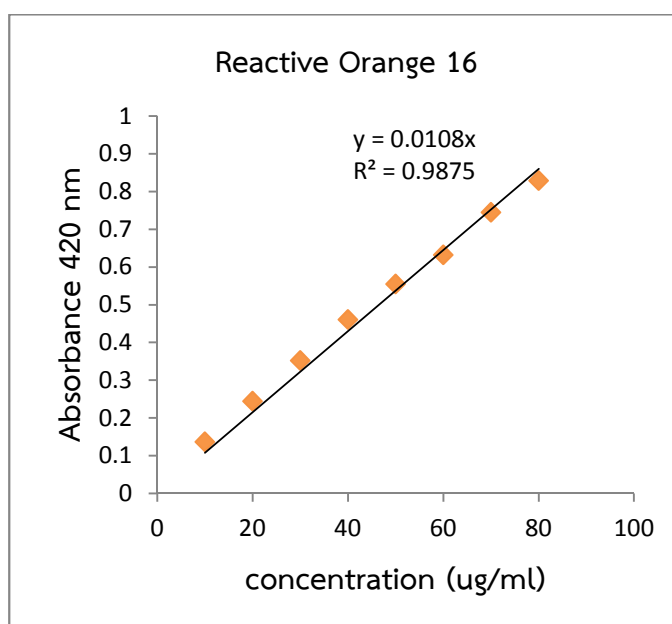
รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานโปรตีน

2. กราฟมาตรฐานของสีย้อม Reactive Orange 16

การวิเคราะห์สีย้อมชนิด Reactive Orange 16 ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ผลแสดงดังตารางที่ ก.1 และรูปที่ ก.2

ตารางที่ ก.1 ความเข้มข้นของสีย้อม Reactive Orange 16 และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm

Concentration (ug/ml)	OD 420 nm
10	0.137
20	0.245
30	0.352
40	0.461
50	0.555
60	0.632
70	0.745
80	0.829



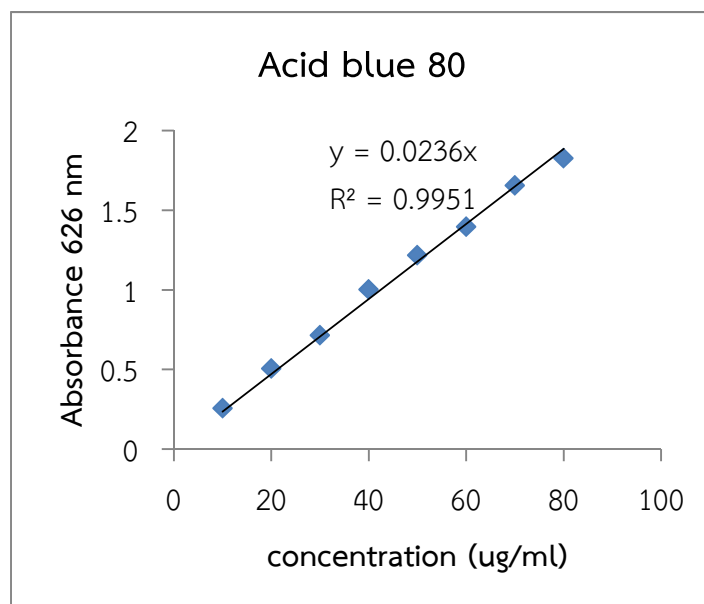
รูปที่ ก.2 การดูดกลืนแสงของสีย้อม Reactive Orange 16 ที่ความยาวคลื่น 420 nm

3. กราฟมาตรฐานของสีย้อม Acid blue 80

การวิเคราะห์สีย้อมชนิด Acid blue 80 ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 626 นาโนเมตร ผลแสดงดังตารางที่ ก.2 และรูปที่ ก.3

ตารางที่ ก.2 ความเข้มข้นของสีย้อม Acid blue 80 และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 626 nm

Concentration (ug/ml)	OD 626 nm
10	0.256
20	0.505
30	0.715
40	1.002
50	1.217
60	1.396
70	1.656
80	1.825



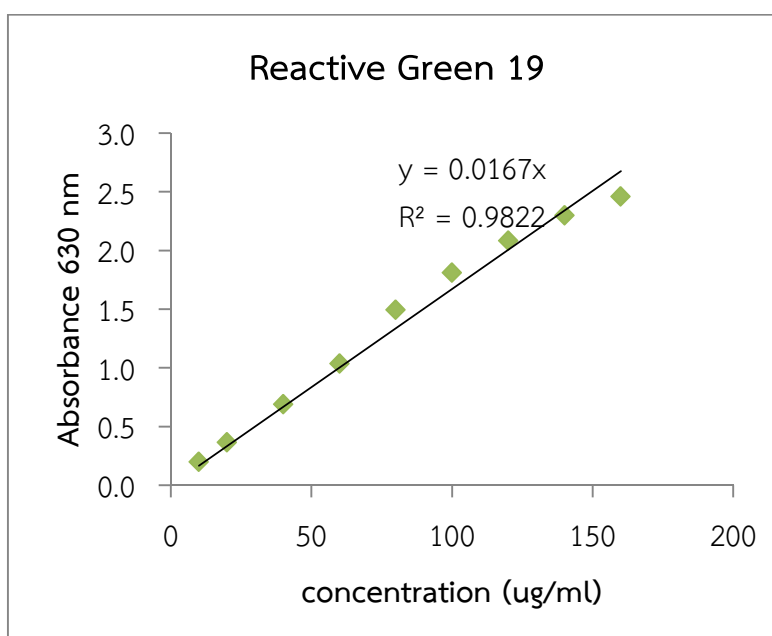
รูปที่ ก.3 การดูดกลืนแสงของสีย้อม Acid blue 80 ที่ความยาวคลื่น 626 nm

4. กราฟมาตรฐานของสีย้อม Reactive Green 19

การวิเคราะห์สีย้อมชนิด Reactive Green 19 ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร ผลแสดงดังตารางที่ ก.3 และรูปที่ ก.4

ตารางที่ ก.3 ความเข้มข้นของสีย้อม Reactive Green 19 และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 nm

Concentration (ug/ml)	OD 630 nm
10	0.200
20	0.368
40	0.693
60	1.037
80	1.495
100	1.812
120	2.085
140	2.302
160	2.461



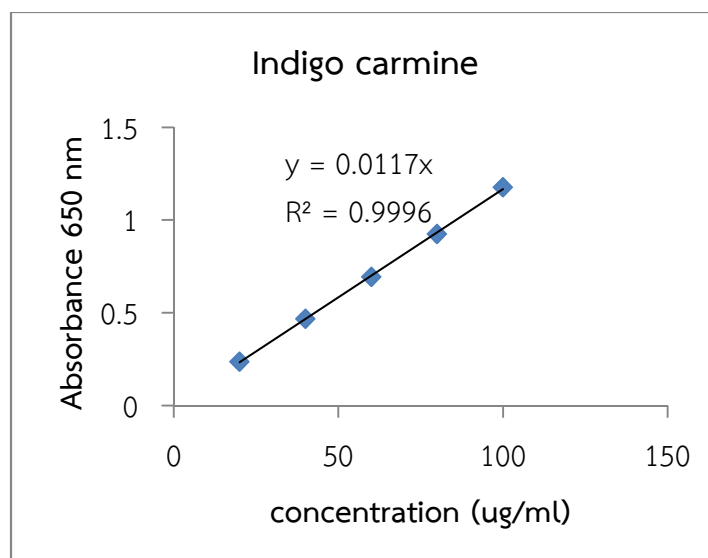
รูปที่ ก.4 การดูดกลืนแสงของสีย้อม Reactive Green 19 ที่ความยาวคลื่น 630 nm

5. กราฟมาตรฐานของสีย้อม Indigo carmine

การวิเคราะห์สีย้อมชนิด Indigo carmine ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ผลแสดงดังตารางที่ ก.4 และรูปที่ ก.5

ตารางที่ ก.4 ความเข้มข้นของสีย้อม Indigo carmine และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 nm

Concentration (ug/ml)	OD 650 nm
20	0.235
40	0.467
60	0.692
80	0.924
100	1.176



รูปที่ ก.5 การดูดกลืนแสงของสีย้อม Indigo carmine ที่ความยาวคลื่น 650 nm

Decolorization of Synthetic Dyes by Crude Laccase from *Lentinus Polychrous* Lev.

Karnika Ratanapongleka and Jirapa Phetsom

Abstract—In the present study, the addition of copper (2mM) to the fungus *L. polychrous* cultivated in solid media influenced the laccase activity. Laccase production was increased in the presence of copper and reached a maximum activity of 145 U/ml on 12th day. Crude laccase was capable to decolorize different dye structures. The enzyme showed great decolorization efficiency toward Acid Blue 80 (85% decolorization in 120 min). Reaction kinetics of the enzyme on Acid Blue 80 followed Michaelis-Menten behavior and the initial rate of decolorization depended on the dye concentration. The kinetic parameters of the enzyme were determined and calculated from Lineweaver-Burk plots. The results indicated that the K_m value was 0.36 mM and V_{max} value was 0.0017 mM/min. The pH value for maximum decolorization of Acid Blue 80 was 5.0.

Index Terms—Decolorization, laccase, *Lentinus polychrous*.

I. INTRODUCTION

Synthetic dyes have been broadly used in many industries, especially in textiles. Large amounts of chemically different dyes generated by the textile industry are discharged to the environment and they become a major concern in wastewater treatment, since most synthetic dyes have complex aromatic structure which are largely toxic, mutagenic, carcinogenic and biodegradable difficulty [1]. Furthermore, they damage the esthetic nature of water and reduce light penetration through the water's surface, and also the photosynthetic activity of aquatic lives. Among these dyes, azo, anthraquinone and indigo are the major chromophores which are found in commercial dyes [2]. Decolorization by conventional wastewater treatment is inefficient. The physical and chemical treatments such as precipitation, photo degradation, adsorption and chemical degradation are costly, time-consuming and often methodologically demanding [3].

At present, a number of studies have focused on white rot fungi which have the capability to degrade various xenobiotic compounds including dyes since they produce some of the extracellular ligninolytic enzymes such as lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase [4]. The enzymatic treatment is simple and more flexible than the use of fungi cultures. Laccases have been received a great attention due to their efficiency and low cost degradation of

the organic pollutants including synthetic dyes [1].

Laccase is a multi copper oxidase and be capable of catalyzing the oxidation of a wide range of phenolic compounds and aromatic amines through the reduction of molecular di-oxygen to water [5]. Due to their ability to oxidize broad substrates, laccases have been extensively applied in several fields, such as decolorization of dyes, degradation of xenobiotics, pulp and paper industry, denim bleaching, food industry and organic synthesis. The capability of many microorganisms (fungi, insects and bacteria) on laccase production has been reported. The recent studies indicate that most fungi, especially white rot fungi, produce high yields of extracellular laccase [6]. Laccase production can be considerably stimulated by the presence of a wide variety of inducing substances, mainly aromatic or phenolic compounds related to lignin or lignin derivatives. In addition the effect of copper on stimulating laccase production has been reported especially in several *Trametes* spp [7].

In this study, the enzyme laccase was extracted from white-rot fungus *Lentinus polychrous*. The production of laccase stimulated by copper was explored. In particular, this work aimed to study the capability of crude laccase on decolorizing different dye groups. Seven synthetic dyes (i.e. Reactive Black 5, Reactive Orange 16, Reactive Green 19, Methyl Orange, Indigo Carmine, Acid Blue 80 and Water Blue) were tested. Although the capabilities of laccase from *L. polychrous* on decolorization have been reported for a number of dyes such as RBBR, Bromophenol Blue, Methyl Red, and Congo Red [8,9], no kinetics analysis has been presented. In this paper, kinetics of crude laccase on Acid Blue 80 and optimum pH for decolorization were then investigated.

II. EXPERIMENTAL

A. Fungi and Culture Conditions

The fungus *L. polychrous* was obtained from Rujira Farm, Kalasin, Thailand. The strain was maintained on potato dextrose agar (PDA) plates at 4 °C and sub-cultured at least every 3 months.

Corn husk, rice bran and rice husk were used as mixed solid media for laccase production. The ratio of corn husk, rice bran and rice husk was 1:1:1 and the moisture content were controlled at 65% (w/w). 2 mM of CuSO₄ were added to the media in order to stimulate the production of laccase. Culture media were then sterilized at 121°C for 15 min. Five agar plugs of an active fungus on PDA were aseptically cut and inoculated into the production media. The fungi were cultivated at 28 °C in the dark for 20 days.

Manuscript received September 8, 2013; revised November 10, 2013. This work was financial supported by Ubon Ratchathani University, Thailand.

K. Ratanapongleka is with the Chemical Engineering Department, Faculty of Engineering, Ubon Ratchathani University, Ubonratchathani 34190, Thailand (e-mail: k_ratanapongleka@ubu.ac.th).

J. Phetsom is with the Biology Department, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, Maha Sarakham 44150, Thailand (e-mail: phetsom2000@yahoo.com).

B. Crude Laccase Extraction and Laccase Activity

Crude laccase enzyme was prepared using water extraction. A 3:1 ratio of water and media was used for extraction. The mixed solution was filtered through miracloth and centrifuged at 4,000g for 10 minutes. The supernatant was defined as crude laccase and kept at 4 °C for further study.

Laccase activity was determined following the change in optical density at 420 nm using 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate (ABTS) as a substrate ($\epsilon = 36,000 \text{ M cm}$). Briefly, the assay mixture consisted of 0.1 M acetate buffer pH 4.5, 10 mM ABTS and enzyme. The mixture was incubated at 32 °C for 10 min and stopped the reaction with 50% (w/v) TCA. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to oxidize 1 μmol ABTS per minute. All assays were carried out in triplicate.

C. Effect of Salts and EDTA on Laccase Activity

The effect of salts on laccase activity was tested with NaCl, Na_2SO_4 and Na_2CO_3 . All salts including EDTA were used at a final concentration of 5, 10 and 50 mM. The reaction mixture consisted of 100 mM acetate buffer pH 4.5, 10 mM ABTS and 0.125 U/ml of crude laccase.

D. Decolorization Assay

Three structural groups of dyes (azo, indigoid and anthraquinone) were selected in this study. All dyes (Reactive Black 5, Reactive Orange 16, Reactive Green 19, Methyl Orange, Indigo Carmine, Acid Blue 80 and Water Blue) were purchased from Sigma-Aldrich. The stock solution of dye was prepared by dissolving in distilled water. The desired dye concentration was prepared from the stock solution by dilution.

The reactions were carried out directly in the spectrophotometer cuvette. The reaction mixture consisted of crude laccase and an aqueous solution of dye in phosphate buffer pH 7.0 in a total final volume of 3 ml. The cuvette was then inverted using paraffin as a cover, in order to achieve the homogeneity of the mixture prior to the measurement. Decolorized activity was determined by monitoring the decrease in absorbance on a spectrophotometer at a maximal absorbance of each dye (360-630 nm) and expressed in terms of percentage. All experiments were done in triplicate. Controls contained the individual dyes solution with inactive enzyme.

E. Effect of Initial Dye and Laccase Concentration on Acid Blue 80 Decolorization

The effect of Acid Blue 80 concentration on the enzymatic decolorization was monitored with different concentrations ranging from 20 to 140 mg/l in acetate buffer pH 5.0. The crude enzyme was used at 0.125 U/ml. To test the effect of enzyme quantity, reaction was started with different quantities of enzyme (0.003, 0.006, 0.012, 0.025, 0.062 and 0.125 U/ml). The dye concentration was fixed at 20 mg/l in buffer pH 5.0. The reaction was carried out at room temperature.

F. Effect of pH and Temperature on Acid Blue 80 Decolorization

The effect of pH on decolorization was tested at different pHs ranging from 2 to 9. The pH of reaction mixture was

adjusted by citrate-phosphate and Tris-HCl buffer. To determine the effect of temperature on Acid Blue 80 decolorization, the reaction mixture (pH 5.0) was incubated under a temperature range between 30 and 60 °C. The concentration of crude enzyme was controlled at 0.125 U/ml.

III. RESULTS AND DISCUSSION

A. Laccase Production

The production of extracellular laccase from *L. polychrous* in the presence of Cu^{2+} was studied (Fig. 1). *L. polychrous* cultured in natural medium with and without copper was able to produce laccase. During the first week of cultivation, small amounts of laccase were produced (data not shown). The enzyme activity increased obviously after 7 days of cultivation. The presence of Cu^{2+} in the medium slightly increased the level of laccase activity. The highest laccase activity (145 U/L) was obtained in medium with copper. Laccase production in the absence of Cu^{2+} gave maximum on 14th day (103 U/L) while in the presence of Cu^{2+} was on 12th day. It is found that in the presence of inducers many white rot fungi can produce high amounts of laccase into the medium. This study shows that copper induces laccase production of *L. polychrous*. Similar inductive effect of Cu^{2+} on laccase production has been reported earlier in *P. ostreatus* [10] and *T. troglia* [2], [11]. Zheng *et al.* [12] indicated that copper could act as an inducer of enzyme activity by affecting the genetic transcription levels in which along with more copper involved in McoA-laccase synthesis. However, copper requirements are usually satisfied at very low concentrations. The presence of 4 mM CuSO_4 inhibited the growth of *P. hauseri* and the cells were almost killed at 4.5 mM CuSO_4 [12].

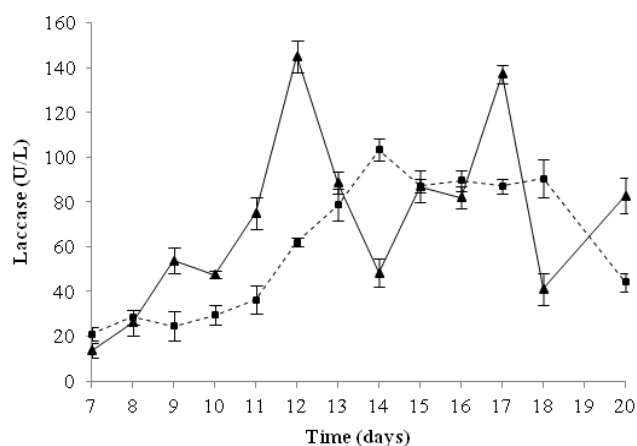


Fig. 1. Production of laccase as a function of time in the (■) absence and (▲) presence of Cu^{2+} .

B. Effect of Salts and EDTA on Laccase Activity

In addition to dyes, high concentrations of salts have been found in textile industrial effluents and their presence can affect enzyme activity. In this study, the effect of salts and EDTA on laccase activity was tested at various concentrations, namely 5, 10 and 50 mM. It can be seen in Table 1 that laccase activity was significantly inhibited when high amounts of sodium chloride were added. While in the presences of 50 mM of both Na_2SO_4 and Na_2CO_3 enhanced the activity. A similar behavior of NaCl on laccase activity

was mentioned in laccase from *Ganoderma lucidum* [13].

EDTA, an organic compound used in many manufacturing processes, decreased laccase activity at high concentration. An inhibition by EDTA was also reported in the laccase from *Trametes versicolor* [14] and *Pseudomonas desmolyticum* [15], *Bacillus* sp. ADR [16].

TABLE I: EFFECT OF SALTS AND EDTA ON LACCASE ACTIVITY

Chemicals	Relative activity (%)		
	5 mM	10 mM	50 mM
NaCl	95.1	80.7	40.3
Na ₂ SO ₄	93.3	98.0	125.9
Na ₂ CO ₃	71.3	57.8	125.1
EDTA	78.2	75.7	65.4

C. Dye Decolorization by Crude Laccase

In general, the efficiency of decolorization depends on the structure of dye and the redox-potential of the enzyme [17]. The ability of crude laccase from *L. polychrous* to decolorize various structural dyes was examined. Several azo (Reactive Black 5, Reactive Orange 16, Reactive Green 19, Methyl Orange) indigoid (Indigo Carmine) and anthraquinonic dyes (Acid Blue 80, Water Blue) were used in this experiments. These dyes were tested at pH 5.0 where the enzyme performed a great activity to ABTS (acidic condition). The decolorization obtained at 120 min showed different percentages in each case. The anthraquinonic Acid Blue 80 and Water Blue were largely decolorized (up to 85% and 30% respectively) comparing to other dye groups. Indigo Carmine was decolorized only 20% whereas less than 10% decolorization of all the azo dyes was achieved. These results indicate that crude laccase decolorizes anthraquinonic dye more efficiently than other dye groups. Similar trends of dye decolorization on three structural groups were observed for crude laccase from *Trametes trogii* [2] and immobilized laccase from *Trametes versicolor* [18]. Ciullini *et al.* [2] explained that laccases show substrate specificities and the chemical structures of the dyes due to the differences in electron distribution, charge density and steric hindrances. Azo dyes are very recalcitrant as they have been developed to withstand bleaching by UV-light and detergents. Therefore, decolorization rate of azo dyes can be improved by the addition of some soluble redox mediators.

D. Effect of Initial Dye and Laccase Concentration on Acid Blue 80 Decolorization

The effect of Acid Blue concentration on decolorization was investigated by increasing the dye concentration from 20 to 140 mg/l. The enzyme decolorized dye up to 85% in 180 min when the concentration used was below 50 mg/l. The percent of decolorization decreased at higher dye concentrations (data not shown). The correlation between decolorization rate and dye concentration followed the Michaelis-Menten behavior. Good linearity was observed by Lineweaver-Burke plot, with regression values of 0.97 (Fig. 2). The apparent K_m and V_{max} values of crude laccase were 0.36 mM and 0.0017 mM/min respectively. The V_{max} shows the maximum rate of reaction, which occurs when laccase is completely saturated with dye. The K_m value indicates a

measure of the dissociation of laccase-dye complex. Michniewicz *et al.* [19] reported that the K_m values for dye oxidation varied depending on dyes and these K_m values of purified laccase were lower than of the crude laccase, which indicated a higher affinity of the purified enzyme to the dye.

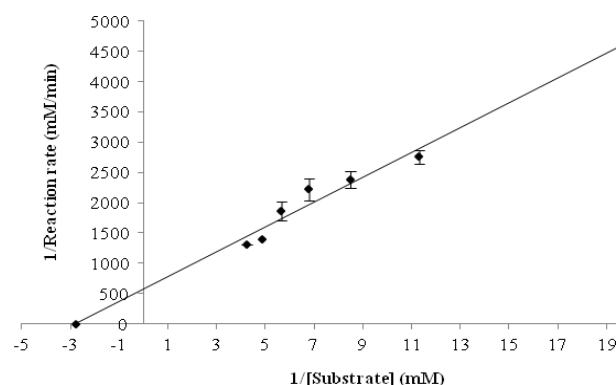


Fig. 2. Lineweaver-Burk plot for crude laccase activity with varying Acid Blue 80 concentrations.

The effect of enzyme concentration on decolorization was determined by increasing laccase activity from 0.003 U/ml to 0.125 U/ml with dye concentration of 20 mg/l. The ability of dye decolorization increased with enzyme concentration. Plotting of initial rate versus enzyme concentration indicated that rate of decolorization within 10 min reaction seemed to be linearly proportional to the enzyme concentration when using enzyme up to 0.025 U/ml (Fig. 3). The reaction rate slowly increased at enzyme concentration of 0.062-0.125 U/ml. The progress curve shows a hyperbolic form. The reaction rate tends to almost reach a maximum rate when higher enzyme concentration is used.

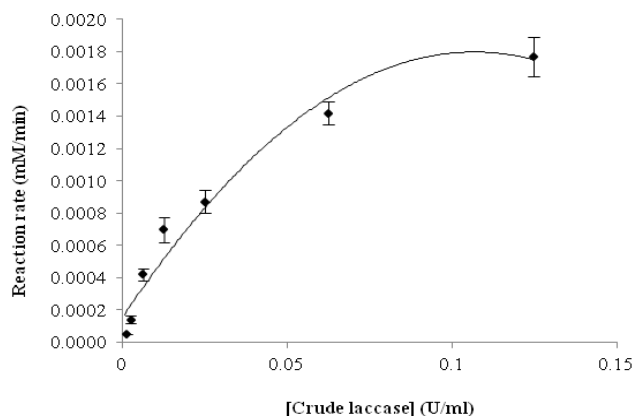


Fig. 3. Effect of crude laccase concentration on initial reaction rate of decolorization.

E. Effect of pH and Temperature on Acid Blue 80 Decolorization

The effect of pH on decolorization of Acid Blue 80 was monitored at pH ranging from 2 to 9 at 30 °C (Fig. 4). The pH has a major effect on the efficiency of dye decolorization. The profile showed maximum decolorization efficiency around pH 5.0. Then laccase decolorization activity started to decrease sharply and less than 5% decolorization was observed at pH above 8. In general, laccase enzyme tends to react differently to pH with different types of dyes. Other

studies reported [8], [9], [18] optimum pH of laccase from *L. polychrous* on decolorization of RBBR, Bromophenol Blue, Methyl Red, and Congo Red were at pH 3.0, 4.0, 4.0-5.0 and 6.0-7.0, respectively. These results show that laccase from *L. polychrous* prefers acidic condition for dyes decolorization and laccases from other whit-rot fungi for example *Ganoderma lucidum* [13] and *Trametes trogii* [1] exhibit great activity at acidic condition as well. Grassi *et al.* [1] mentioned that the limitation for the use of white-rot fungal enzymes for dye decolorization was their acidic pH range of activity.

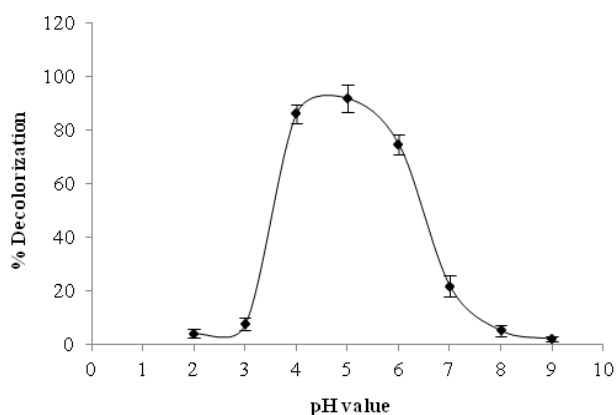


Fig. 4. Effect of pH on decolorization of acid blue 80 by crude laccase from *L. polychrous*.

The effect of temperature was examined by incubating the reaction mixture at temperatures between 30 and 60 °C. The initial reaction rate increased with increasing the temperature. However, enzyme deactivation occurred when the temperature was further increased. The effect of temperature on enzyme kinetics is often described by the Arrhenius equation. Then Arrhenius plot between Log of initial reaction rate and $1/T$ was established. Activation energy was calculated from a slope equal to $-E_a/2.303R$. The correlation of the data provided a straight line. Therefore, activation energy for crude laccase on decolorization of Acid Blue 80 was 14.25kJ/mol.

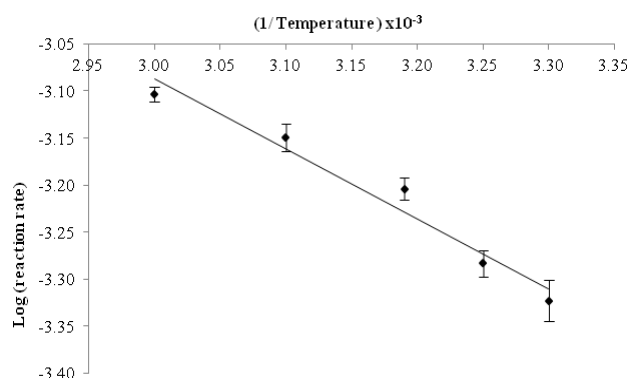


Fig. 5. Effect of temperature on initial reaction rate of decolorization by crude laccase from *L. polychrous*.

IV. CONCLUSION

Laccase production was increased in the presence of copper and reached a maximum activity of 145 U/ml on 12th day of cultivation. The decolorization of several dyes by

crude laccase from *L. polychrous* was determined. Among the seven dyes, crude laccase had an obvious potential to decolorize anthraquinonic dye. Acid Blue 80 was decolorized about 85% in 120 min. In addition laccase activity and initial Acid Blue 80 concentration affect the performance of decolorization and the reaction kinetics can be satisfactorily followed Michaelis-Menten model. The most suitable pH for Acid Blue 80 decolorization was at pH 5.0. The initial decolorized rate increased with temperature (30-60 °C). The activation energy of crude laccase was 14.25kJ/mol. It can be concluded that crude laccase from *L. polychrous* is an effective enzyme for decolorization especially anthraquinonic dye. The application of this enzyme on real treatment of textile effluents should be further study.

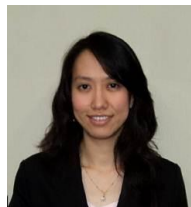
ACKNOWLEDGMENT

This work was financially supported by a research grant of the Ubon Ratchathani University, Thailand. The authors also thank to Chemical Engineering Department, Faculty of Engineering, Ubon Ratchathani University and Biology Department, Faculty of Science, Mahasarakham University for supported equipment and work place.

REFERENCES

- [1] E. Grassi, P. Scodeller, N. Filiel, R. Carballo, and L. Levin, "Potential of *Trametes trogii* culture fluids and its purified laccase for the decolorization of different types of recalcitrant dyes without the addition of redox mediators," *International Biodeterioration and Biodegradation*, vol. 65, pp. 635-643, 2011.
- [2] I. Ciullini, S. Tilli, A. Scozzafava, and F. Briganti, "Fungal laccase, cellobiose dehydrogenase, and chemical mediators: Combined actions for the decolorization of different classes of textile dyes," *Bioresource Technology*, vol. 99, pp. 7003-7010, 2008.
- [3] T. Mechichi, N. Mhiri, and S. Sayadi, "Remazol Brilliant Blue R decolorization by the laccase from *Trametes trogii*," *Chemosphere*, vol. 64, pp. 998-1005, 2006.
- [4] H. R. K. Hamedani, A. Sakurai, and M. Sakakibara, "Decolorization of synthetic dyes by a new manganese peroxidase-producing white rot fungus," *Dyes and Pigments*, vol. 72, pp. 157-162, 2007.
- [5] S. Georgieva, T. Godjevargova, D. G. Mita, N. Diano, C. Menale, C. Nicolucci, C. R. Carratelli, L. Mita, and E. Golovinsky, "Non-isothermal bioremediation of waters polluted by phenol and some of its derivatives by laccase covalently immobilized on polypropylene membranes," *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 66, pp. 210-218, 2010.
- [6] S. S. Kahraman and I. H. Gurdal, "Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi," *Bioresource Technology*, vol. 82, pp. 215-217, 2002.
- [7] C. Galhaup, H. Wagner, B. Hinterstoisser, and D. Haltrich, "Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 30, pp. 529-536, 2002.
- [8] R. Sarnthima, S. Khammuang, and J. Svasti, "Extracellular ligninolytic enzymes by *Lentinus polychrous* L é. under solid-state fermentation of potential agro-industrial wastes and their effectiveness in decolorization of synthetic dyes," *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 14, pp. 513-522, 2009.
- [9] P. Suwannawong, S. Khammuang, and R. Sarnthima, "Decolorization of rhodamine B and congo red by partial purified laccase from *Lentinus polychrous* L é.," *Journal of Biochemical Technology*, vol. 2, pp. 182-186, 2010.
- [10] P. Baldrian and J. Gabriel, "Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 206, pp. 69-74, 2002.
- [11] H. Z. Mechichi, T. Mechichi, A. Dhoubi, S. Sayadi, A. T. Mart íez, and M. J. Mart íez, "Laccase purification and characterization from *Trametes trogii* isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 39, pp. 141-148, 2006.

- [12] X. Zheng, I. S. Ng, C. Ye, B.-Y. Chen, and Y. Lu, "Copper ion-stimulated McoA-laccase production and enzyme characterization in *Proteus hauseri* ZMd44," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 115, pp. 388-393, 2013.
- [13] K. Murugesan, Y.-M. Kim, J.-R. Jeon, and Y.-S. Chang, "Effect of metal ions on reactive dye decolorization by laccase from *Ganoderma lucidum*," *Journal of Hazardous Materials*, vol. 168, pp. 523-529, 2009.
- [14] M. Lorenzo, D. Moldes, S. R. Couto, and M. Sanromán, "Inhibition of laccase activity from *Trametes versicolor* by heavy metals and organic compounds," *Chemosphere*, vol. 60, pp. 1124-1128, 2005.
- [15] S. Kalme, S. Jadhav, M. Jadhav, and S. Govindwar, "Textile dye degrading laccase from *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 44, pp. 65-71, 2009.
- [16] A. A. Telke, G. S. Ghodake, D. C. Kalyani, R. S. Dhanve, and S. P. Govindwar, "Biochemical characteristics of a textile dye degrading extracellular laccase from a *Bacillus* sp. ADR," *Bioresource Technology*, vol. 102, pp. 1752-1756, 2011.
- [17] M. Zhang, F. Wu, Z. Wei, Y. Xiao, and W. Gong, "Characterization and decolorization ability of a laccase from *Panus rudis*," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 39, pp. 92-97, 2006.
- [18] P. P. Champagne and J. A. Ramsay, "Dye decolorization and detoxification by laccase immobilized on porous glass beads," *Bioresource Technology*, vol. 101, 2010, pp. 2230-2235.
- [19] A. Michniewicz, S. Ledakowicz, R. Ullrich, and M. Hofrichter, "Kinetics of the enzymatic decolorization of textile dyes by laccase from *Cerrena unicolor*," *Dyes and Pigments*, vol. 77, pp. 295-302, 2008.



Karnika Ratanapongleka received her B.Sc. in Biotechnology from Khon Kaen University (Thailand), M.Sc. in Biotechnology from University of Western Sydney (Australia), and Ph.D. in Chemical Engineering from University of Wales Swansea (U.K.). She is currently an assistant professor in the Department of Chemical Engineering, Ubon Ratchathani University, Thailand. Her research interests include enzyme

technology, membrane separation, membrane reactor, and fermentation technology.