# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

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

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

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

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

ด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค คือสภาวะที่ใช้ของระบบดังกล่าวไม่รุนแรง มีน้ำเป็นส่วนประกอบในการแยก 70-90% ไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ ง่ายต่อการดำเนินการ ต้นทุนการดำเนินการไม่สูง เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และสามารถขยายขนาดสู่ระดับการผลิตเพื่อนำไปใช้งานจริงได้ง่าย เนื่องจากสภาวะที่ใช้ในการแยกระดับห้องปฏิบัติการไม่แตกต่างกัน

ดังนั้นในการศึกษานี้จะทำการสกัดเอนไซม์แลคเคสจากเชื้อเห็ดบดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค เอนไซม์จะถูกทำให้บริสุทธิ์และแยกจากโปรตีนอื่นในวัฏภาคต่างกัน และดูถึงลักษณะการแยกชั้นเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยที่เกี่ยวข้อง

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

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

## 1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1. แหล่งของเอนไซม์แลคเคสที่ใช้ ได้จากเชื้อเห็ดบด (*Lentinus polychrous* Lev.)
2. ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ใช้เตรียมจาก polyethylene glycol (PEG) และ phosphate salt
3. การทดสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ใช้ 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid); ABTS
4. ค่าพีเอช และอุณหภูมิที่ใช้ในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค คือ 7 และ 25 ± 2 $^{0}$C ตามลำดับ

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ จากการวิจัย

1. ทราบปัจจัยที่มีอิทธิพลและสภาวะที่เหมาะสมของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคสำหรับทำเอนไซม์แลคเคสให้บริสุทธิ์
2. เป็นอีกทางเลือกสำหรับวิธีการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ที่ส่งผลกระทบต่อค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์น้อย และง่ายต่อการประยุกต์ใช้ในระดับสเกลใหญ่
3. เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ สำหรับนำไปใช้บำบัดน้ำทิ้งที่มีสีย้อมสังเคราะห์เจือปน
4. เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีการอื่นๆในการทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น