ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม)

ปริญญา

เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม — **สาขา**

วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม — **ภาควิชา**

เรื่อง การบำบัดสีย้อมในน้ำเสียอุตสาหกรรมสิ่งทอด้วยเอนไซม์ลิกนิโนไลติกที่สกัดจากวัสดุเหลือใช้จากการเพาะเห็ด

Decolorization of Dyes in Textile Wastewater by Ligninolytic Enzymes Extracted from Mushroom Culture Waste

นามผู้วิจัย นายอภิญญา บรรลือทรัพย์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(อาจารย์ประไพพิศ ชัยรัตนมโนกร, Doc.Eng.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(รองศาสตราจารย์พัฒนา อนุรักษ์พงศธร, D.Tech.Sc.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จักรกฤษณ์ มหัจฉริยวงศ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การบำบัดสีย้อมในน้ำเสียอุตสาหกรรมสิ่งทอด้วยเอนไซม์ลิกนิโนไลติกที่สกัดจากวัสดุเหลือใช้จากการเพาะเห็ด

Decolorization of Dyes in Textile Wastewater by Ligninolytic Enzymes Extracted from Mushroom Culture Waste

โดย

นายอภิญญา บรรลือทรัพย์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม)
พ.ศ. 2551

วิทยานิพนธ์

การบำบัดสีย้อมในน้ำเสียอุตสาหกรรมสิ่งทอด้วยเอนไซม์ลิกนิโนไลติกที่สกัดจากวัสดุเหลือใช้จากการเพาะเห็ด

DECOLORIZATION OF DYES IN TEXTILE WASTEWATER BY LIGNINOLYTIC ENZYMES EXTRACTED FROM MUSHROOM CULTURE WASTE

นายอภิญญา บรรลือทรัพย์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551

อภิญญา บรรลือทรัพย์ 2551: การบำบัดสีย้อมในน้ำเสียอุตสาหกรรมสิ่งทอด้วยเอนไซม์ลิกนิโนไลติกที่สกัดจากวัสดุเหลือใช้จากการเพาะเห็ด ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม) สาขาวิชาเทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ประไพพิศ ชัยรัตนมโนกร, Doc.Eng. 70 หน้า

เห็ดรากลุ่มไวท์รอทผลิตเอนไซม์ลิกนิโนไลติกในช่วงที่มีปริมาณอาหารน้อย การใช้ประโยชน์จากก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดที่หมดระยะเวลาการเก็บผลผลิตเป็นทางเลือกหนึ่งในการสกัดเอนไซม์เพื่อบำบัดสีย้อมในน้ำเสียเนื่องจากก้อนอาหารเหล่านี้มีเอนไซม์ประเภทนี้อยู่ งานวิจัยนี้ศึกษาการสกัดเอนไซม์ลิกนิโนไลติกจากก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดที่หมดระยะเวลาเก็บผลผลิต 5 ชนิด คือ เห็ดนางฟ้าภูฏาน (*Pleurotus sajor-caju*) เห็ดนางรมฮังการี (*Pleurotus ostreatus*) เห็ดยานางิ (*Agrocybe cylindracea*) เห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus*) และเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) พบว่าการใช้สารละลายสกัด 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 7 สกัดก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดที่อัตราส่วนของน้ำหนักก้อนอาหารกับสารละลายสกัด 15: 30 (กรัม/มิลลิลิตร) ที่ระยะเวลาการสกัด 3 ชั่วโมง สามารถสกัดเอนไซม์แลคเคสได้ปริมาณสูงที่สุด จาก *P. ostreatus* (367.04 $\pm$ 1.26 mU/g) และ *P. sajor-caju* (210.73 $\pm$ 0.90 mU/g) นำเอนไซม์แลคเคสที่สกัดได้บำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ที่ความเข้มข้น 50 ppm ในน้ำเสียสังเคราะห์ 100 มิลลิลิตร ในระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์แลคเคสจากการสกัดก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. ostreatus* บำบัดสีย้อมได้ 68.86 $\pm$ 0.27 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ *P. sajor-caju* บำบัดได้ 48.48 $\pm$ 0.39 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 750 mU จากนั้นใช้เอนไซม์แลคเคส 750 mU ที่สกัดจาก *P. ostreatus* บำบัดสีย้อม Reactive Red 198 และ Reactive Yellow 176 พบว่าบำบัดได้ 19.63 $\pm$ 1.66 และ 9.99 $\pm$ 1.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 50 ppm ในน้ำเสียสังเคราะห์ 100 มิลลิลิตร เมื่อใช้สาร violuric acid ซึ่งเป็นสารมีเดียเตอร์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับสารละลายเอนไซม์แลคเคส 750 mU พบว่าประสิทธิภาพในการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 เพิ่มขึ้นเป็น 74.61 $\pm$ 0.93 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการบำบัดด้วยสารละลายเอนไซม์แลคเคสเพียงอย่างเดียว (6.05 $\pm$ 0.35 เปอร์เซ็นต์) ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง เกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แลคเคส พบว่าสารละลายเกลือ NaCl 100 มิลลิโมลาร์ ทำให้ประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ลดลงเหลือ 2.33 $\pm$ 0.10 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับการบำบัดด้วยสารละลายเอนไซม์แลคเคส 750 mU (57.09 $\pm$ 0.74 เปอร์เซ็นต์) ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ศึกษาการตรึงเอนไซม์บนตัวกลางพบว่าบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ได้ 84.75 เปอร์เซ็นต์ (60 นาที) และ 89.98 เปอร์เซ็นต์ (90 นาที) ด้วยเอนไซม์แลคเคสที่ตรึงบนกะลามะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพและเม็ดเซลลูโลส ตามลำดับ การตรึงเอนไซม์แลคเคสบนตัวกลางสามารบำบัดสีย้อมได้ดีกว่าสารละลายเอนไซม์แลคเคสในระยะเวลาการบำบัดที่น้อยกว่าและสามารถใช้ซ้ำได้ การศึกษานี้พบว่ามีความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์ก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดที่หมดระยะเวลาการเก็บผลผลิตแล้วก่อนกำจัดทิ้งและการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมควรศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องคุณลักษณะน้ำเสียและการตรึงเอนไซม์ในตัวกลางที่เหมาะสมเพื่อให้การบำบัดสีย้อมเกิดประสิทธิภาพดีที่สุด

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Aphinya Bunluesup 2008: Decolorization of Dyes in Textile Wastewater by Ligninolytic Enzymes Extracted from Mushroom Culture Waste. Master of Science (Environmental Technology and Management), Major Field: Environmental Technology and Management, Department of Environmental Science. Thesis Advisor: Miss.Prapaipid Chairattanamanokorn, Doc.Eng. 70 pages.

White rot fungi produce ligninolytic enzyme when nutrients starve. Utilization of mushroom spent culture that is residue after harvest is the one alternative to extract the enzymes for decolorization of dye in wastewater because this spent mushroom culture still contains the ligninolytic enzyme. This research studied ligninolytic enzyme extraction from spent mushroom cultured 5 types of fungi, *Pleurotus sajor-caju, Pleurotus ostreatus*, *Agrocybe cylindracea*, *Pleurotus cystidiosus* and *Ganoderma lucidum*. The extraction of the spent culture with 0.1 M phosphate buffer pH 7 that 15: 30 ratio (g/ml) for 3 hours produced maximum laccase (Lac) from the spent culture with *P. ostreatus* (367.04 $\pm$ 1.26 mU/g) and from that with *P. sajor-caju* (210.73 $\pm$ 0.90 mU/g). Reactive Black 5 (50 ppm) in 100 ml synthetic wastewater was decolorized with 750 mU Lac enzyme solution from the *P. ostreatus* extraction and from *P. sajor-caju* extraction at 68.86 $\pm$ 0.27 % and 48.48 $\pm$ 0.39 %, respectively, after 72 hours. Then decolorization of 50 ppm Reactive Red 198 and Reactive Yellow 176 was 19.63 $\pm$ 1.66 and 9.99 $\pm$ 1.96 % , respectively. Addition of 10 mM violuric acid as redox mediator with Lac enzyme solution promoted the decolorization efficiency of Reactive Black 5. The decolorizing efficiency was increased to 74.61 $\pm$ 0.93% compared with only Lac enzyme solution (6.05 $\pm$ 0.35 %) for 6 hours. NaCl inhibited Lac enzyme activity. One hundred mM NaCl with 750 mU laccase decreased decolrizing efficiency from 57.09 $\pm$ 0.74% (only laccase) to 2.33 $\pm$ 0.10% for 72 hours. Moreover, decolorization of 50 ppm Reactive Black 5 with immobilized Lac enzyme on supporting the media (pretreated coconut shell and cellulose bead) was conducted. The Reactive Black 5 was decolorized to 84.75% at 60 minutes and 89.98% at 90 minutes with immobilized laccase on the pretreated coconut shell and cellulose bead, respectively. This results shown the immobilized Lac enzyme had advantages in the term of shorter decolorizing time and consecutively repeated utilization for the decolorization. From the research , it is possible to apply the spent mushroom culture for the enzyme production and decolorization of wastewater in textile industries. However, the application of the enzyme for decolorization in industries is supposed to more studies involving characteristic of wastewater and immobilizing ligninolytic enzyme on the appropriate medium for better decolorizing efficiency.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	18
อุปกรณ์	18
วิธีการ	19
ผลและวิจารณ์	24
สรุป	44
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	46
ภาคผนวก	53
ภาคผนวก ก สารเคมี	54
ภาคผนวก ข ข้อมูลจากการทดลอง	62
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	70

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ค่าแอลดี 50 ของสีย้อมเปรียบเทียบกับไซยาไนด์	6
2	ตัวอย่างสารมีเดียเตอร์ของกลุ่มเอนไซม์ลิกนิโนไลติกในเห็ดราแต่ละชนิด	12
3	คุณสมบัติของกลุ่มเอนไซม์ลิกนิโนไลติกแต่ละชนิด	13
4	ตัวอย่างชนิดของกลุ่มเห็ดราชนิดไวท์รอทและการบำบัดสีย้อมประเภทต่างๆ	14
5	หลักในการพิจารณาการตรึงเอนไซม์	17

ตารางผนวกที่

ก1	ปริมาณสารละลาย x และ y ที่ใช้ผสมเพื่อปรับพีเอชสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์	55
ก2	ปริมาณสารละลาย x และ y ที่ใช้ผสมเพื่อปรับพีเอชสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์	56
ข1	ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสที่เกิดขึ้นในแต่ละอัตราส่วนของก้อนเลี้ยงเชื้อเห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus*) กับสารละลายสกัด 50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ ที่ pH 5.6	63
ข2	ค่ากิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่เกิดขึ้นในแต่ละอัตราส่วนของก้อนเลี้ยงเชื้อเห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus*) กับสารละลายสกัด 50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ ที่ pH 5.6	63
ข3	ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและแมงกาแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในแต่ละชนิดสารละลายสกัด	64
ข4	ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและแมงกาแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในแต่ละชนิดของก้อนเลี้ยงเชื้อเห็ด	64

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ข5	ประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 (50 ppm) ที่ค่ากิจกรรมต่างๆของสารละลายเอนไซม์แลคเคสที่สกัดจาก *Pleurotus sajor-caju*	65
ข6	ประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ความเข้มข้น 50 ppm ที่ค่ากิจกรรมต่างๆของสารละลายเอนไซม์แลคเคสที่สกัดจาก *Pleurotus ostreatus*	65
ข7	ประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อม Reactive Red 198 และ Reactive Yellow 176 ความเข้มข้น 50 ppm ที่ค่ากิจกรรมสารละลายเอนไซม์แลคเคส 750 mU ที่สกัดจาก *Pleurotus ostreatus*	66
ข8	ผลของสารมีเดียเตอร์ (violuric acid) ต่อประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ความเข้มข้น 50 ppm ที่ค่ากิจกรรมสารละลายเอนไซม์แลคเคส 750 mU ที่สกัดจาก *Pleurotus ostreatus*	66
ข9	ผลของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ความเข้มข้น 50 ppm ที่ค่ากิจกรรมสารละลายเอนไซม์แลคเคส 750 mU ที่สกัดจาก *Pleurotus ostreatus*	67
ข10	ผลของการตรึงเอนไซม์แลคเคสที่สกัดจาก *Pleurotus ostreatus* บนตัวกลาง 2 ชนิด	67
ข11	ผลของการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ด้วยเอนไซม์แลคเคสที่ตรึงบนตัวกลางกะลามะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพ	68
ข12	ผลของการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ด้วยเอนไซม์แลคเคสที่ตรึงบนตัวกลางเม็ดเซลลูโลส	69

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กลไกการทำงานของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส	9
2	กลไกการทำงานของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส	10
3	กลไกการทำงานของเอนไซม์แลคเคส (a) ไม่ใช้มีเดียเตอร์ (b) ใช้มีเดียเตอร์	11
4	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์	21
5	ผลของอัตราส่วนน้ำหนักก้อนเลี้ยงเชื้อเห็ดต่อปริมาตรสารละลายสกัดในการสกัดเอนไซม์แลคเคส	24
6	ผลของอัตราส่วนน้ำหนักก้อนเลี้ยงเชื้อเห็ดต่อปริมาตรสารละลายสกัดในการสกัดเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส	25
7	ผลของชนิดสารละลายสกัดต่อการสกัดเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส	26
8	ปริมาณเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจากก้อนเลี้ยงเชื้อเห็ด 5 ชนิด	28
9	ประสิทธิภาพการบำบัดสี Reactive Black 5 (50 ppm) ด้วยเอนไซม์แลคเคสจาก *P. ostreatus* ที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 250 500 และ 750 mU	30
10	ประสิทธิภาพการบำบัดสี Reactive Black 5 (50 ppm) ด้วยเอนไซม์แลคเคสจาก *P. sajor-caju* ที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 250 500 และ 750 mU	30
11	ลักษณะโครงสร้างของสี Reactive Black 5	31
12	กลไกการบำบัดสีย้อมประเภทอะโซด้วยเอนไซม์แลคเคสจาก *Pyricularia oryzae*	32
13	การเปลี่ยนสีของสีย้อม Reactive Black 5 เมื่อถูกเอนไซม์แลคเคสย่อยสลาย	33
14	ค่าการดูดกลืนแสงสีย้อม Reactive Black 5 (50 ppm) ของการบำบัดที่ระยะเวลาต่างๆในช่วงความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตร	34
15	ประสิทธิภาพการบำบัดสี Reactive Red 198 Reactive Yellow 176 และ Reactive Black 5 ที่ 50 ppm) ด้วยสารละลายเอนไซม์แลคเคสจาก *P. ostreatus* ที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 750 mU	35

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	ประสิทธิภาพการบำบัดสี Reactive Black 5 ความเข้มข้น 50 ppm ด้วยสารละลายเอนไซม์แลคเคสที่สกัดจากก้อนเลี้ยงเชื้อเห็ด *P. ostreatus* ที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 750 mU ร่วมกับสาร violuric acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ	37
17	ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ที่ความเข้มข้น 50 ppm ด้วยสารละลายเอนไซม์แลคเคส 750 mU ที่สกัดจากก้อนเลี้ยงเชื้อเห็ด *P. ostreatus* ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง	39
18	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร	40
19	ผลการบำบัดสี Reactive Black 5 (50 ppm) ด้วยเอนไซม์แลคเคสที่ตรึงด้วยกะลามะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพ	41
20	ผลการบำบัดสี Reactive Black 5 (50 ppm) ด้วยเอนไซม์แลคเคสที่ตรึงด้วยเม็ดเซลลูโลส	42

การบำบัดสีย้อมในน้ำเสียอุตสาหกรรมสิ่งทอด้วยเอนไซม์ลิกนิโนไลติกที่สกัดจากวัสดุเหลือใช้จากการเพาะเห็ด

Decolorization of Dyes in Textile Wastewater by Ligninolytic Enzymes Extracted from Mushroom Culture Waste

คำนำ

ปัจจุบันการขยายตัวของอุตสาหกรรมสิ่งทอได้เติบโตรุดหน้าไปอย่างรวดเร็ว ขณะเดียวกันก็ส่งผลต่อสิ่งแวดล้อมควบคู่ไปด้วย โดยเฉพาะปัญหาสีย้อมในน้ำเสียที่มาจากกระบวนการฟอกย้อม โดยสีย้อมที่ใช้ในกระบวนการมากกว่า 15 เปอร์เซ็นต์จะปนเปื้อนออกมากับน้ำทิ้ง (Wesenberg *et al*., 2003) ก่อให้เกิดความเดือดร้อนและเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมได้ สีย้อมบางชนิดมีโครงสร้างซับซ้อน ความสามารถในการละลายน้ำสูงไม่สามารถบำบัดได้ อีกทั้งการใช้วิธีการบำบัดทางเคมีอาจทำให้เกิดปัญหาการเพิ่มปริมาณตะกอน สารเคมีปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมและอาจทำให้น้ำเสียมีความเป็นพิษเพิ่มขึ้น

การบำบัดสีย้อมด้วยวิธีทางชีวภาพถูกนำไปปรับใช้ในการแก้ไขปัญหาทางด้านสีย้อม วิธีการนี้มีทั้งการใช้จุลินทรีย์ประเภทต่างๆ เช่น แบคทีเรีย สาหร่าย และเห็ดรา ซึ่งเห็ดรานั้นถูกนำมาศึกษาอย่างกว้างขวางและสามารถบำบัดสีย้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพอันเนื่องมาจากกลไกการทำงานของเอนไซม์ลิกนิโนไลติก (ligninolytic enzyme) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ขับออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme)ได้แก่ เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase) เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase) และเอนไซม์แลคเคส (laccase) เนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้มีกลไกการทำงานแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific) จึงมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์กลุ่มนี้ในการย่อยสลายโมเลกุลหรือสารมลพิษที่ย่อยสลายยากรวมทั้งสีย้อมได้ ซึ่งเอนไซม์จะไปทำลายส่วนที่เป็นวงแหวนอะโรมาติกที่เป็นโครงสร้างของสีย้อม เห็ดราสามารถผลิตเอนไซม์ลิกนิโนไลติกในช่วงที่มีปริมาณอาหารน้อย ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดที่หมดระยะเวลาเก็บดอกเห็ดจึงเป็นแนวทางเลือกหนึ่งในการบำบัดสีย้อมเนื่องจากก้อนอาหารเหล่านี้ยังคงมีปริมาณแร่ธาตุและเอนไซม์ประเภทนี้อยู่ (Ball and Jackson, 1995)

การทดลองนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสกัดและประยุกต์ใช้เอนไซม์ลิกนิโนไลติกจากก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดชนิดต่างๆหลังจากเก็บผลผลิตแล้วในการบำบัดสีย้อมในน้ำเสียสังเคราะห์ตลอดจนศึกษาความเป็นไปได้ในการปรับใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม เพื่อเพิ่มมูลค่าของเสียทางการเกษตร ก่อให้เกิดรายได้เพิ่มเติมแก่เกษตรกรและเกิดประโยชน์ต่อภาคอุตสาหกรรม

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาวิธีการสกัดเอนไซม์ลิกนิโนไลติกจากก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดหลังจากเก็บผลผลิตแล้ว

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการบำบัดสีย้อมโดยใช้สารละลายเอนไซม์ลิกนิโนไลติก

3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการบำบัดสีย้อมโดยใช้เอนไซม์ลิกนิโนไลติกที่ตรึงบนตัวกลางและการปรับใช้ในอุตสาหกรรม

การตรวจเอกสาร

1. สีย้อม

สีย้อม (dyes) คือ สารให้สีที่สามารถจับติดวัสดุด้วยตัวเองหรือด้วยการชักนำโดยปฏิกิริยาในกระบวนการย้อมผ้าหรือกระบวนการพิมพ์ (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม [มอก.], 2530) สีย้อมเป็นสารมีสีที่ละลายน้ำได้หรืออาจอยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ สีย้อมที่ใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอนั้นมีหลายประเภทและมีการใช้งานที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการผลิต โดยในแต่ละปีมีผลิตภัณฑ์สีย้อมเกิดขึ้นกว่า 100,000 ชนิดทั่วโลก (Robinson *et al*., 2001) ประเภทของสีย้อมมีอิทธิพลต่อการบำบัดน้ำเสีย เนื่องจากสีย้อมบางชนิดมีความสามารถในการละลายน้ำสูงบำบัดได้ยาก หรือสีย้อมบางชนิดสามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างกลายเป็นสารพิษได้ ดังนั้นในการศึกษาการบำบัดสีย้อมในน้ำเสียจึงมีความจำเป็นที่ต้องศึกษาประเภทของสีย้อมที่ใช้ในกระบวนการด้วย

1.1 ประเภทของสีย้อม การจำแนกประเภทของสีย้อมทำได้หลายวิธีดังนี้

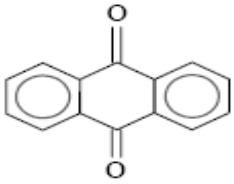
1.1.1 จำแนกตามแหล่งที่มาของสีย้อม ซึ่งปัจจุบันมีการจำแนกไว้ 2 ประเภท คือ สีย้อมธรรมชาติและสีย้อมสังเคราะห์ Fu and Virarrghavan (2001) กล่าวว่าอุตสาหกรรมส่วนใหญ่นิยมใช้สีย้อมสังเคราะห์ในกระบวนการผลิต เนื่องจากสีย้อมธรรมชาติมีกรรมวิธีในการสกัดที่ค่อนข้างยุ่งยาก มีความไม่แน่นอนของเฉดสีและมีความคงทนต่ำกว่าสีย้อมสังเคราะห์ โดยทั่วไปแล้วสีย้อมสังเคราะห์มีราคาสูงกว่าสีย้อมธรรมชาติ

1.1.2 จำแนกตามองค์ประกอบทางเคมี ซึ่งสีย้อมที่นิยมใช้มี 5 ประเภท (เรียงลำดับตามความนิยมใช้สีย้อม) ดังนี้

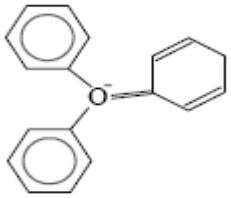
ก. สีย้อมอะโซ (azo dye) มีโครงสร้างที่สำคัญในโมเลกุล คือ

--- N=N---

ข. สีย้อมแอนทราควีโนน (antraquinone dyes) มีโครงสร้างสำคัญในโมเลกุล คือ



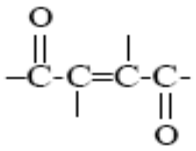
ค. สีย้อมไตรฟีนิลมีเธน (triphenylamethane dyes) มีโครงสร้างสำคัญในโมเลกุล คือ



ง. สีย้อมซัลเฟอร์ (sulphur dyes) โครงสร้างที่สำคัญในโมเลกุล คือ

-D-S-S-D-

จ. สีย้อมอินดิกอยด์ (indigoids dyes) โครงสร้างที่สำคัญในโมเลกุล คือ



ดังนั้นจะเห็นได้ว่าสีย้อมแต่ละชนิดมีโครงสร้างและคุณสมบัติต่างกันซึ่งส่งผลต่อประสิทธิภาพการบำบัดแตกต่างกันออกไป โดยประเภทสีย้อมที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทออย่างแพร่หลาย คือ สีย้อมรีแอคทีฟ (reactive dye) ซึ่งเป็นสีย้อมที่จำแนกตามวิธีการย้อมมีปริมาณการผลิตทั่วโลกมากกว่า 12 เปอร์เซ็นต์ของการผลิตสีทั้งหมด (Peralta-Zamora *et al*., 2003) โดยสีรีแอคทีฟส่วนใหญ่จะมีหมู่อะโซเป็นองค์ประกอบและสามารถสร้างพันธะโควาเลนต์กับเส้นใยได้

(Maximo *et al*., 2003) สีรีแอคทีฟใช้ย้อมเส้นใยเซลลูโลสดีที่สุด ละลายน้ำได้ มีคุณสมบัติเป็นแอนไอออน เมื่ออยู่ในน้ำที่เป็นด่างโมเลกุลของสีจะทำปฏิกิริยากับหมู่ OH ในเซลลูโลสและเชื่อมโยงกันด้วยพันธะโควาเลนต์ เกิดเป็นสารประกอบเคมีชนิดใหม่ สมบัติการละลายและดูดติดกับเส้นใยของตัวสีจะทำให้สีเข้าไปอยู่ในเส้นใยได้ เกิดปฏิกิริยายึดติดกับเส้นใย สีย้อมประเภทนี้มีการใช้อย่างแพร่หลาย อีกทั้งสีมีโครงสร้างซับซ้อนซึ่งการบำบัดน้ำเสียโดยทั่วไปไม่สามารถกำจัดสีย้อมให้หมดไปได้ จึงกลายเป็นปัญหาสำคัญของอุตสาหกรรมสิ่งทอ ซึ่งสีรีแอคทีฟที่นิยมใช้กันมาก เช่น Reactive Black Reactive Blue Reactive Red และ Reactive Yellow เป็นต้น (Maximo *et al*., 2003)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าปัญหาสิ่งแวดล้อมที่เกิดจากอุตสาหกรรมสิ่งทอ ส่วนใหญ่เกิดจากน้ำเสียที่มาจากกระบวนการฟอกย้อม สีย้อมที่ใช้ในการย้อมเส้นใยจะมีการดูดซึมสีย้อมจากสารละลายสีย้อมเพียงบางส่วนเท่านั้น สีย้อมที่เหลือจะคงอยู่ในสารละลายสีย้อมและถูกปล่อยออกมากับน้ำเสีย

ปวีณา (2539) กล่าวว่าโดยทั่วไปสีย้อมมีความเป็นพิษต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับสารพิษบางชนิด เช่นไซยาไนด์ เป็นต้น (ตารางที่ 1) แต่สารวัตถุดิบบางชนิดที่ใช้ในการสังเคราะห์สีย้อมมีความเป็นพิษสูงและเป็นสารก่อมะเร็ง อีกทั้งสีย้อมบางชนิดอาจเปลี่ยนแปลงกลายเป็นสารมีพิษได้ เช่น สีย้อมที่มีโครงสร้างแบบอะโซ ซึ่งในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน หมู่อะโซจะถูกทำลายโดยสารรีดิวซ์ พันธะอะโซจะแตกตัวออกได้เป็นสารประกอบอะโรมาติกเอมีน ซึ่งเป็นสารมัธยันต์ (intermediate compounds) และเป็นสารก่อมะเร็ง แต่สารพิษเหล่านี้สามารถถูกออกซิไดซ์ต่อไปได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน (Wensenberg *et al*., 2003)

ตารางที่ 1 ค่าแอลดี 50 ของสีย้อมเปรียบเทียบกับไซยาไนด์

สารตัวอย่าง	ค่าแอลดี 50 (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)
สีย้อมน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์	มากกว่า 5000
สีย้อม 10 เปอร์เซ็นต์	2000-5000
สีย้อม 82 เปอร์เซ็นต์	มากกว่า 250
ไซยาไนด์	15

ที่มา: ปวีณา (2539)

1.2 การบำบัดสีย้อมในน้ำเสีย

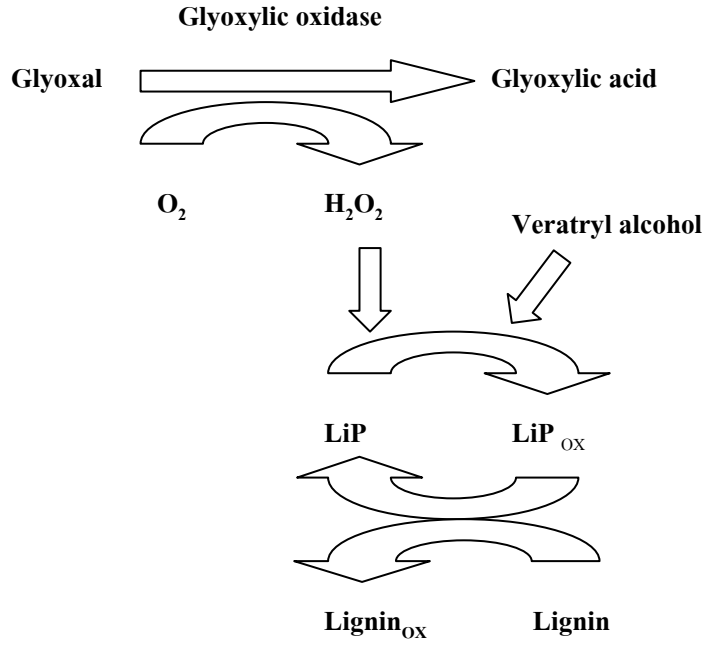
การบำบัดสีย้อมในน้ำเสียทำได้ยากและมีค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากสีย้อมเป็นสารประกอบที่ย่อยสลายยากและถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อให้มีความทนทานต่อการฟอกจางสี ปัจจุบันยังไม่มีการกำหนดมาตรฐานสีย้อมในน้ำทิ้ง โดยระบุเพียงว่าไม่เป็นที่รังเกียจ (กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม, 2539) แต่สีย้อมก็ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและมนุษย์ได้ โดยสีย้อมที่เป็นอนุภาคคอลลอยด์อยู่ในแหล่งน้ำจะบดบังการส่องผ่านของแสงอาทิตย์เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์แสงของพืชน้ำและสาหร่าย ลดความสามารถในการละลายออกซิเจนในน้ำ อีกทั้งสีย้อมหลายชนิดเป็นสารก่อมะเร็งและเป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (Wensenberg *et al*., 2003) วิธีการบำบัดสีย้อมด้วยวิธีทางกายภาพและเคมี ประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อมจะขึ้นอยู่กับประเภทของสีย้อม โครงสร้างสีย้อม และปริมาณสารเคมีซึ่งสีย้อมบางชนิดที่มีความสามารถในการละลายน้ำสูงไม่สามารถบำบัดได้ ทำให้เกิดปัญหาปริมาณตะกอนที่ต้องกำจัดออกและเกิดการปนเปื้อนสารเคมีสู่สิ่งแวดล้อม นอกจากนี้การใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชันเพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของสีย้อมทำให้น้ำเสียมีความเป็นพิษเพิ่มขึ้น (ศศิธร, 2549) หรือวิธีการบำบัดสีย้อมด้วยวิธีทางชีวภาพด้วยระบบตะกอนเร่ง (activated sludge) ไม่สามารถบำบัดสีย้อมให้หมดไปได้ทำให้มีปริมาณสีย้อมตกค้างถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (Pierce, 1994) ดังนั้นจึงมีการศึกษาการบำบัดสีย้อมด้วยวิธีการอื่นเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว อาทิเช่น การบำบัดสีย้อมด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ Banat *et al*., (1996) รวบรวมข้อมูลการบำบัดสีย้อมโดยใช้จุลินทรีย์ชนิดต่างๆไว้ อาทิเช่น การบำบัดสีย้อมโดยการใช้แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ azoreductase ภายใต้สภาวะไร้อากาศซึ่งการบำบัดสีย้อมเกิดจากการแตกพันธะอะโซ หรือการใช้สาหร่ายกลุ่ม *Chlorella* และ *Oscillatoria* ในการบำบัดสีย้อมอะโซ นอกจากนี้ในปัจจุบันได้มีการศึกษาการบำบัดสีย้อมโดยจุลินทรีย์ประเภทเห็ดรา (fungi) กลุ่มของเห็ดราที่มีการศึกษากันมากในการบำบัดสีย้อม คือ ชนิดไวท์รอท (white rot fungi) เช่น *Phanerochaete chrysosporium Trametes versicolor Phlebia radiata* และ *Pleurotus ostreatus* เป็นต้น เอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับการบำบัดสีย้อมของเชื้อรากลุ่มนี้ คือ ลิกนิโนไลติกเอนไซม์ (ligninolytic enzyme) ได้แก่ เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase) เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase) และเอนไซม์แลคเคส (laccase) เนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้มีกลไกการทำงานแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific) ดังนั้นจึงมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์จากเชื้อรากลุ่มนี้ในการย่อยสลายสารประกอบเคมีสังเคราะห์ชนิดต่างๆที่ประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) เช่นเดียวกับลิกนิน เช่น สารประกอบ polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) สารประกอบกลุ่มคลอโรฟีนอล (chlorophenol) รวมทั้งสีย้อม เป็นต้น

2. เอนไซม์ลิกนิโนไลติกในเห็ดราชนิดไวท์ร็อท

Wesenberg *et al*. (20003) ได้รวบรวมข้อมูลพบว่ากลุ่มเห็ดราชนิดไวท์ร็อทที่มีการศึกษาการสกัดเอนไซม์ลิกนิโนไลติกมาบำบัดสีย้อมในน้ำเสีย ได้แก่ *Phanerochaete sp. Trametes sp. Phlebia sp. Pycnoporus sp. Phellinus sp. Stereum sp. Bjerkandra sp.* และ *Pleurotus sp.* โดยกลุ่มสกุล *Pleurotus sp.* คือ กลุ่มสกุลเห็ดนางรมซึ่งนิยมนำมาสกัดเอนไซม์ลิกนิโนไลติกโดยมีความสำคัญในด้านการเป็นอาหารของมนุษย์ สามารถเจริญเติบโตบนต้นไม้ได้ตามธรรมชาติและสามารถสร้างเอนไซม์ลิกนิโนไลติก เอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์เฮมิเซลลูเลสได้ (จารุวรรณ, 2548; Howard *et al*, 2003) อีกทั้งเห็ดสกุลนี้นับเป็นเห็ดที่มีปริมาณการผลิตสูงเป็นอันดับต้นของการผลิตทั่วโลก โดยคิดเป็น 14.2 เปอร์เซ็นต์ของการผลิตเห็ดทั่วโลก (Chang, 1999; Chiu *et al*., 2000) ในส่วนของประเทศไทยมีการผลิตเห็ดสกุลนี้มากเป็นอันดับสองรองจากเห็ดฟาง (ชาญยุทธ์และคณะ, 2546) การศึกษาการสกัดเอนไซม์ลิกนิโนไลติกจากกลุ่มเห็ดราชนิดไวท์ร็อทสามารถสกัดได้จากการเพาะ เลี้ยงเชื้อโดยตรงจากอาหารเหลวและอาหารแข็งเพื่อให้ได้ปริมาณและคุณภาพของชนิดเอนไซม์ที่ต้องการหรือการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร อันได้แก่ ก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดที่หมดระยะเวลาเก็บดอกเห็ดแล้ว เช่น กลุ่มสกุลเห็ดนางรม เห็ดหลินจือ หรือเห็ดหอม เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากเห็ดราสามารถผลิตเอนไซม์ลิกนิโนไลติกในระหว่างที่มีปริมาณอาหารไม่สมบูรณ์ ดังนั้นก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดที่หมดระยะเวลาเก็บดอกเห็ดยังคงมีปริมาณแร่ธาตุและเอนไซม์ประเภทนี้อยู่ (Ball and Jackson, 1995) จึงสามารถสกัดเอาสารละลายเอนไซม์หรือใช้ก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดในการบำบัดสารมลพิษจำพวกสีย้อมหรือสารมลพิษอินทรีย์ที่ย่อยสลายยากได้ (Trejo-Hernandez *et al*., 2001; Lau *et al*., 2003)

เอนไซม์หลักที่สำคัญในการบำบัดสีย้อมของเห็ดรากลุ่มนี้เป็นเอนไซม์ประเภทออกซิโดรีดักเตสที่ขับออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลายสารประเภทลิกนิน (extracellular ligninolytic enzyme) ซึ่งเอนไซม์หลักที่ทำหน้าที่ คือ เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase ; LiP) เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase ; MnP) และเอนไซม์แลคเคส (laccase ; Lac) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ในช่วงเมทาบอลิซึมทุติยภูมิ (secondary metabolism) โดยเชื้อรากลุ่มนี้บางสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ได้ทั้ง 3 ชนิด แต่บางสายพันธุ์สามารถผลิตได้เพียงหนึ่งหรือสองชนิดเท่านั้น (Wensenberg *et al*., 2003) กลุ่มเอนไซม์ชนิดนี้มีคุณสมบัติไม่เฉพาะเจาะจง จึงสามารถย่อยสลายโมเลกุลหรือสารมลพิษอินทรีย์ที่ย่อยสลายยาก เช่น chlorophenol nitrotoluenes และ polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH_s) เป็นต้น รวมทั้งสีย้อม ซึ่งเอนไซม์ทั้งสามชนิดจะมีปฏิกิริยาในการย่อยสลายสารต่างกัน ดังนี้

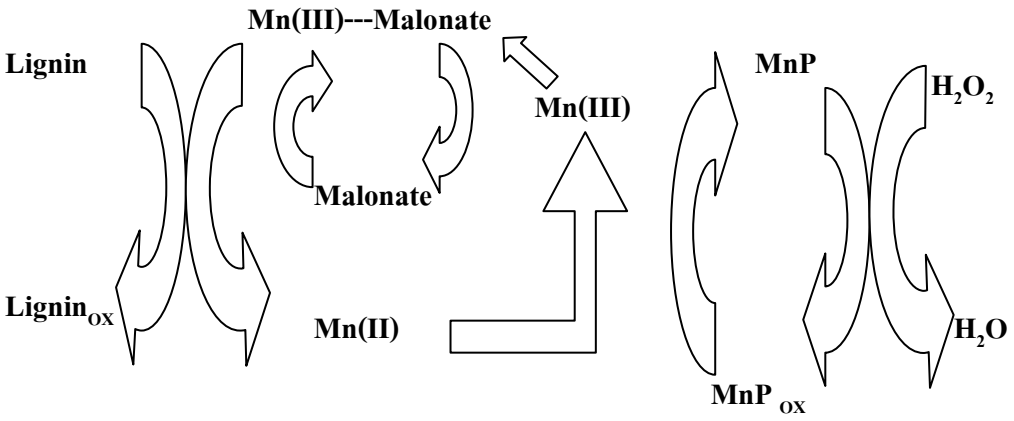
2.1 เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase ; LiP ; E.C. 1.11.1.14) โดยปกติสามารถเกิดปฏิกิริยาได้เมื่อมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา (Renganathan and Gold, 1986) เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในธรรมชาติมีองค์ประกอบเป็น heme iron atom (Fe III) ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นเมื่อ H_2O_2 เป็นตัวให้อิเล็กตรอน 2 อนุภาค แก่ oxo-iron cation radical (Fe IV-O) กลายเป็น compound I (LiP_{ox}) ที่สามารถย่อยสลายลิกนินได้ จากนั้นจะเกิดการออกซิไดซ์อีกครั้งกลายเป็น compound II (LiP) และกลับเข้าสู่สภาวะเดิมในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อีกครั้งเป็น compound III (LiP III) สารประกอบเวอราทริลแอลกอฮอล์ทำหน้าที่เป็นมีเดียเตอร์ในการถ่ายเทอิเล็กตรอนแก่ compound II และ compound III เพื่อกลับมาสู่ลิกนินเปอร์ออกซิเดสในสภาวะปกติดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 กลไกการทำงานของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส

ที่มา: Breen and Singleton (1999)

2.2 เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase; MnP; E.C. 1.11.1.13) มีกลไกการทำงานเหมือนกับเปอร์ออกซิเดสทั่วไป โดยจะมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา โดย Mn(II) ทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอน 2 ตัว แก่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เกิดเป็น compound I (MnP_{ox}) จะถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็น compound II (MnP) และเข้าสู่สภาวะเดิมคือเอนไซม์ MnP และถ้ามีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากเกินพอจะทำให้เกิดเป็น compound III (Mn III) ได้อีก ซึ่งสามารถย่อยสลายสารประกอบฟีนอล (phenolic) รวมทั้งสีย้อมได้ด้วยเช่นกัน เอนไซม์ MnP สามารถออกซิไดซ์ glutathione dithiothreitol และ NADPH และผลิตน้ำได้จากออกซิเจน ซึ่งเกิดในปฏิกิริยา Mn(II)-dependent reaction และสารมารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพื่อปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันสำหรับการย่อยสลายลิกนิน ดังแสดงในภาพที่ 2

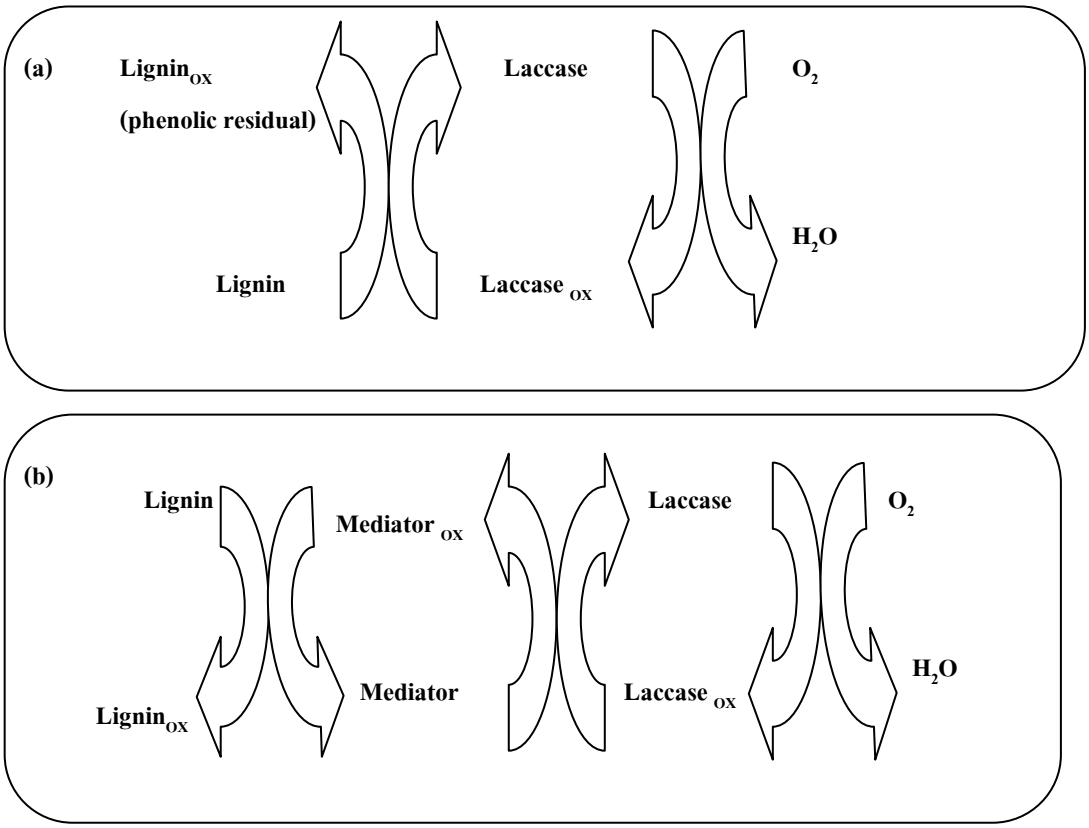


ภาพที่ 2 กลไกการทำงานของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

ที่มา: Breen and Singleton (1999)

2.3 เอนไซม์แลคเคส (laccase ; Lac; E.C. 1.10.3.2) เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม extracellular glycoprotein เอนไซม์แลคเคสเป็นเอนไซม์ที่มีทองแดง (Cu) เป็นองค์ประกอบของโมเลกุล ทำหน้าที่ในการออกซิไดซ์สารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) และสารที่ไม่ใช่สารประกอบฟีนอล (non-phenolic compounds) เช่น guaiacol 2,6-dimethoxyphenol p-phenylene diamine และ syringaldazine เป็นต้นและรีดิวซ์โมเลกุลออกซิเจนได้เป็นน้ำ ซึ่งเอนไซม์แลคเคสอาจจะทำปฏิกิริยาโดยตรงกับส่วนที่เป็นสารประกอบฟีนอลของลิกนินหรืออาจใช้สารมีเดียเตอร์

(mediator compound) ซึ่งทำหน้าที่เป็นโค-สับสเตรท กลไกการทำงานแสดงในภาพที่ 3 มีเดียเตอร์ ได้แก่ ABTS (2, 2'-azinobis-(3)-ethylbenzeythiazoline-6-sulphonate)



ภาพที่ 3 กลไกการทำงานของเอนไซม์แลคเคส (a) ไม่ใช้มีเดียเตอร์ (b) ใช้มีเดียเตอร์

ที่มา: Breen and Singleton (1999)

สารมีเดียเตอร์ คือ สารที่ทำหน้าที่เป็นเหมือนโค-สับสเตรท โดยสารนี้จะมีค่าพลังงานรีดอกซ์โพเทนเชียล (redox potential) สูง ซึ่งมีค่ามากกว่า 900 มิลลิโวลต์ (Wensenberg *et al*., 2003) โดยเอนไซม์ที่ถูกออกซิไดส์โดยออกซิเจนจะไปออกซิไดส์สารมีเดียเตอร์ให้อยู่ในรูป cation radical ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่เสถียรซึ่งจะไปออกซิไดส์โมเลกุลของสีย้อมต่อไป โดยถ้าพลังงานรีดอกซ์โพเทนเชียล (redox potential) ของสารมีเดียเตอร์มีค่าสูงจะทำให้ความสามารถในการบำบัดสีย้อมเพิ่มขึ้น โดยทั่วไปสารมีเดียเตอร์มีทั้งที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (native mediators) และสามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ (synthetic mediators) และสามารถใช้ได้กับกลุ่มเอนไซม์ลิกลิโนไลติกแต่ละชนิดแตกต่างกันออกไป (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ตัวอย่างสารมีเดียเตอร์ของกลุ่มเอนไซม์ลิกนินโนไลติกในเห็ดราแต่ละชนิด

สารมีเดียเตอร์	ชนิดเห็ดรา (เอนไซม์)
Native mediators	
Mn^{3+}	*Phanerochaete chrysosporium* (MnP)
Organic acids (malonate, oxalate)	*Fomes annosus, Armillaria mellea*, *Cenporiopsis subvermispora*, *Nematoloma frowardii*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Phlebia radiata*, (LiP, MnP)
Veratryl alcohol	*Phanerochaete chrysosporium* (LiP)
3-Hydroxyanthranilic acid (3-HAA)	*Pycnoporus cinnabarinus* (Lac)
Synthetic mediators	
1- Hydroxybenzotriazole (1-HBT)	*Trametes versicolor*, *Trametes villosa*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pleurotus ostreatus*, (Lac)
Violuric acid	*Trametes villosa*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Pleurotus ostreatus* (Lac)
2, 2'-azinobis-(3)-ethylbenzeythiazoline-6-sulphonate (ABTS)	*Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Coriolopsis gallica* (Lac)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Wensenberg *et al*. (2003)

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้นกลุ่มเห็ดราชนิดไวท์รอทแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลิกนิโนไลติกต่างกันและเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติแต่งต่างกันหลายประการตามหน้าที่และกลไกการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 คุณสมบัติของกลุ่มเอนไซม์ลิกนิโนไลติกแต่ละชนิด

คุณสมบัติ	LiP (E.C. 1.11.1.14)	MnP (E.C. 1.11.1.13)	Lac (E.C. 1.10.3.2)
ชื่อสามัญ	diarylpropan O_2, H_2O_2 oxidoreductases	Mn(II): H_2O_2 oxidoreductases	p-benzendial: O_2-oxidoreductases
หมู่พรอสทีติก	Heme	Heme	1 type-1-Cu, 1 type-2-Cu 2 coupled type-3-Cu
มวลโมเลกุล (kDa)	38-47	32-62.5	59-110
Glycosylation	N-	N-	N-
ช่วง pH	2.0-5.0	2.6-4.5	2.0-8.5
E^0 (mV)	1450	1510	500-800
ความเสถียร	ต่ำ	สูง	สูง
Native mediators	Veratryl alcohol 2-chloro-1,4-dimethoxybenzene	Mn^{2+} Mn^{3+}	3-hydroxyanthranilic acid
Secondary and synthetic mediators	-	Thiols, unsaturated fatty acids	2, 2'-azinobis-(3)-ethylbenzeythiazoline-6-sulphonate, 1-hydroxybenzotriazole

ที่มา: ดัดแปลงจาก Wensenberg *et al*. (2003)

กลุ่มเห็ดราไวท์รอทแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการผลิตปริมาณและคุณภาพของเอนไซม์ลิกนิโนไลติกแตกต่างกัน จึงทำให้มีการนำไปประยุกต์ใช้กับการบำบัดสีย้อมประเภทต่างๆ ได้อย่างหลากหลาย (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ตัวอย่างชนิดของกลุ่มเห็ดราชนิดไวท์รอทและการบำบัดสีย้อมประเภทต่างๆ

เชื้อรา	เอนไซม์	การบำบัดสีย้อม
Bjerkandera adusta	LiP และ MnP	Reactive Orange 96, Reactive Violet 5, Reactive Black 5, Reactive Blue 15
Lentinus tigrinus	Lac และ MnP	Moreira Orange II, Reactive Blue 38, Poly R-478
Phanerochaete chrysosporium	LiP และ MnP	Remazol Turquoise Blue, Azure Blue, Cresol Red, Bromophenolblue, Acid Green27, Acidtetrasodiumsalt, Indigo Carmine, Acid Red 106, Mordant Yellow10, Brilliant Yellow, Chrysophenine, Cibacron Brilliant Yellow 3G-P
Pleurotus eryngii	LiP และ MnP	Reactive Violet 5, Reactive Black 5,
Pleurotus ostreatus	MnP	Remazol Brilliant Blue R, Copperphtalocyaninetetrasulphonic, Acid Green 27, Indigo Carmine, Mordant Yellow 10, Brilliant Yellow , Cibacron Brilliant Yellow 3G-P, Cibacron Brilliant Red 3B
Pleurotus sajor-caju	Lac และ MnP	Amaranth, New Coccine , Orange G , Indigo
Trametes (Coriolus) versicolor	Lac LiP และ MnP	Everzol Turquoise Blue G, Everzol Yellow 4GL, Everzol Red RBN, Orange K-GL, Everdirect Supra, Yellow PG, Copperphtalocyaninetetrasulphonic, Indigo Carmine, Acid Red 106, Mordant Yellow 10

ที่มา: ดัดแปลงจาก Wensenberg *et al*. (2003)

3. การประยุกต์เอนไซม์ลิกนิโนไลติกในระดับอุตสาหกรรม

เอนไซม์ลิกนิโนไลติกที่สกัดจากเห็ดราชนิดไวท์รอทนอกจากสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรมสิ่งทอแล้วนั้นยังสามารถนำไปประยุกต์ได้ทั้งอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเยื่อกระดาษหรืองานวิจัยด้านนาโนเทคโนโลยี (Couto and Herrera, 2006) โดยในอุตสาหกรรมสิ่งทอกลุ่มเห็ดราชนิดไวท์รอทถูกนำมาศึกษามากที่สุด (Wesenberg *et al*., 2003) กลไกการบำบัดสีย้อมในน้ำเสียเกิดขึ้นได้ทั้งจากปฏิกิริยาของเอนไซม์เองรวมถึงอาจมีกลไกการดูดซับสีย้อมด้วยเส้นใยไมซีเลียมของกลุ่มเห็ดราด้วยซึ่งเกิดขึ้นเป็นส่วนน้อย (Glenn and Gold, 1983) กลุ่มเห็ดราชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้แตกต่างกันชนิดของเอนไซม์หลักที่ทำปฏิกิริยาในการบำบัดสีย้อมจึงแตกต่างกันด้วย

Chagas and Durrant (2001) ศึกษาพบว่าเอนไซม์แลคเคสจาก *Pleurotus sajor-caju* เป็นเอนไซม์หลักในการบำบัดสีย้อมและ *Phanerochaete chrysosporium* พบเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์หลักในการบำบัดสีย้อม ขณะที่ Robinson *et al*. (2001) พบว่า *Bjerkandra adusta* มีเอนไซม์หลักในการบำบัดสีย้อมคือ เอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส ดังนั้นการประยุกต์ใช้เอนไซม์ลิกนิโนไลติกจึงควรคำนึงถึงชนิดของสายพันธุ์จุลินทรีย์ (McMullan *et al*., 2001) ถึงแม้ว่ากลุ่มเห็ดราชนิดไวท์รอทหลายชนิดสามารถบำบัดสีย้อมได้นั้น เมื่อนำไปใช้กับน้ำเสียอุตสาหกรรมสิ่งทอโดยตรงแล้วมีประสิทธิภาพน้อยเพราะน้ำเสียจริงที่ออกมานั้นมีสิ่งสกปรกอื่นๆปะปนมาด้วย ทั้งสารช่วยย้อม กรด ด่าง เกลือ ไขมัน สารฟอกขาว สารลอกแป้ง โลหะหนัก เป็นต้น สิ่งเหล่านี้มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ Abadulla *et al*. (2000) ศึกษาพบว่าสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะทองแดงและเหล็กในน้ำเสียมีผลทำให้ enzyme activity ของ *Polyporus sp.* และ *Tramestes villosa* ลดลง 20 เปอร์เซ็นต์ เกลือโซเดียมคลอไรด์ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เกลือโซเดียมคลอไรด์เป็นสารเคมีพื้นฐานที่จำเป็นต่อกระบวนการฟอกย้อมในอุตสาหกรรมสิ่งทอ ปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์มีผลต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ลิกนิโนไลติกจากเชื้อแต่ละชนิดแตกต่างกัน มีรายงานพบว่าถ้าความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์มากกว่า 0.2 โมลาร์ มีผลทำให้เอนไซม์สูญเสีย activity เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ (Naki *et al*., 1981; Kim and Nicell., 2006) นอกจากนี้อาจมีปัจจัยด้านปริมาณสารอาหารในน้ำเสียเกี่ยวข้องด้วย Zhen and Yu (1998) พบว่าการมีสารคาร์บอนและไนโตรเจนในน้ำเสียมากเกินไปจะเป็นตัวยับยั้งการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจาก *Phanerochaete chrysosporium* เนื่องจากเชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้ในช่วงของการผลิตสารทุติยภูมิภายใต้สภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนอยู่อย่างจำกัด จากปัญหาที่เกิดขึ้นจึงมีการพัฒนาเพื่อให้สามารถบำบัดสีย้อมในน้ำเสียให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นโดย

มีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่ถูกตรึงในตัวกลาง (immobilized enzyme) ประเภทต่างๆเพื่อสามารถนำไปปรับใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียจริงได้ต่อไป

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น สารละลายเอนไซม์ไม่สามารถบำบัดสีย้อมที่ปนเปื้อนออกมากับน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดของสารละลายเอนไซม์ทั้งในด้านความเสถียรหรือการนำไปใช้ติดต่อกันหลายครั้ง หรือคุณลักษณะของน้ำเสียที่มีสารเคมีอื่นๆซึ่งอาจมีพิษต่อเอนไซม์ปนเปื้อนอยู่ วิธีการตรึงเอนไซม์จึงมีการพัฒนาขึ้นทั้งการเลือกใช้วัสดุที่นำมาตรึงที่เหมาะสม (Duran *et al*., 2002) และการเลือกชนิดเชื้อราที่มีคุณภาพในการผลิตเอนไซม์ลิกนิโนไลติก (Wesenberg *et al*., 2003)

วิเชียร (2521) กล่าวว่า immobilized enzyme คือ การใช้วิธีการทางฟิสิกส์หรือเคมีต่อเอนไซม์แล้วทำให้เอนไซม์มีคุณสมบัติไม่สามารถละลายน้ำได้สามารถใช้ได้หลายครั้งโดยที่ activity ไม่เปลี่ยนแปลงซึ่งการผลิต immobilized enzymeโดยทั่วไปสามารถแบ่งออกได้ 3 วิธีด้วยกัน คือ

1) Carrier method ใช้ตัว carrier ที่ไม่ละลายน้ำเกาะกับเอนไซม์ โดยอาจใช้ในลักษณะเป็นแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลอ่อนๆหรือการทำให้เกิดพันธะโควาเลนต์ตัว carrier กับเอนไซม์

2) Cross-linkage method เป็นการใช้ปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับ bifunctional reagent เกาะกันในรูป cross-linkage วิธีนี้มีแรงยึดที่แข็งแรงแต่ต้องใช้ปริมาณเอนไซม์มาก ความเสถียรต่ำ

3) Entrapping method เป็นวิธีการที่ห่อหุ้มเอนไซม์เอาไว้ใน lacttice type หรือ semi-permeable membrane

ประโยชน์ที่สำคัญของ immobilized enzyme นั้น สามารถใช้ติดต่อกันได้หลายครั้งและง่ายต่อการแยกออกจากผลผลิตที่ได้ เอนไซม์มีความเสถียรเพิ่มขึ้นสามารถแก้ไขข้อบกพร่องของการใช้สารละลายเอนไซม์ธรรมดาและสามารถใช้เอนไซม์ได้เหมาะสมกับความต้องการ (วิเชียร, 2521)

Bickerstaff (1997) กล่าวว่าการเลือกวัสดุที่เหมาะสมในการนำตรึงเอนไซม์และการเลือกวิธีในการตรึงให้เกิดประสิทธิภาพจะต้องมีหลักเบื้องต้นในการพิจารณาถึงคุณสมบัติทางกายภาพ คุณสมบัติทางเคมีและปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 หลักในการพิจารณาการตรึงเอนไซม์

คุณสมบัติ	ประเด็นที่ต้องพิจารณา
ทางกายภาพ	พื้นที่ผิวและความพรุนของวัสดุที่จะนำมาตรึงเอนไซม์
ทางเคมี	คุณสมบัติในด้าน hydrophilicity ของวัสดุที่จะนำมาตรึงเอนไซม์ หมู่ฟังก์ชันที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์
ความเสถียร	residual enzyme activity
ความปลอดภัย	สารเคมีที่นำมาใช้ในต้องไม่เป็นพิษต่อเอนไซม์และการนำไปใช้
ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น	reaction kinetics enzyme loading และ catalytic productivity

ที่มา: ดัดแปลงจาก Bickerstaff (1997)

Hablik and Schinmer (2000) ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์แลคเคสจาก *Pleurotus ostreatus* ด้วย Eupergit ®C เพื่อกำจัดสารมลพิษประเภทฟีนอล (phenolic pollutants) ในระบบชั้นตัวกลางอัดบรรจุ (packed-bed reactor) ซึ่งการตรึงเอนไซม์ด้วย Eupergit ®C นี้เป็นเทคนิคที่ใช้เอนไซม์กับตัว carrier มาทำให้เกิดพันธะโควาเลนต์ซึ่งทำให้แรงดึงดูดระหว่างตัว carrier กับเอนไซม์แข็งแรง นอกจากนี้ Peralta-Zamora *et al*. (2003) ได้ทำการตรึงเอนไซม์แลคเคสจาก *Trametes versicolor* เพื่อบำบัดสีย้อมรีแอคทีฟ (Reactive Blue 19 Reactive Black 5 Reactive Orange 122 และ Reactive Red 251) ด้วยซิลิกาเจล amberlite IRA-400 glass-ceramic และ monmorillonite พบว่าการตรึงด้วยซิลิกาเจลให้ประสิทธิภาพดีที่สุด ผลของการบำบัดสีย้อมนั้นมาจากทั้งกลไกการดูดซับด้วยซิลิกาเจลและเอนไซม์แลคเคสที่ถูกตรึง ดังนั้นเทคนิควิธีการตรึงเอนไซม์ลิกนิโนไลติกจึงมีหลากหลายวิธีและประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อมขึ้นอยู่กับประเภทของเอนไซม์รวมถึงวัสดุและวิธีการตรึงเอนไซม์ด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 เครื่องยูวี/วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น GBC 932

1.2 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

1.3 เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดจานเดียว

1.4 ตู้อบ

1.5 กรวยกรอง

1.6 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร

1.7 ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 50 100 250 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

1.8 ปิเปตต์ ขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร

1.9 บีกเกอร์ขนาด 50 100 250 600 และ1,000 มิลลิลิตร

1.10 กระบอกตวง

1.11 กระดาษกรอง

1.12 กะลามะพร้าวทุบละเอียดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 5 มิลลิเมตร

1.13 เม็ดเซลลูโลส

1.14 รำข้าว

1.15 ไดอะไลซิสทิวป์ (Dialysis tubes)

1.16 คอลัมน์

1.17 TOYOPERL DEAE-650 M สำหรับการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

1.18 ก้อนเลี้ยงเชื้อเห็ด 5 ชนิด คือ เห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singers) เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) เห็ดยานางิ (*Agrocybe cylindracea*) เห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus*) และเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum* (Leys. ex Fr.) Karst)

1.19 อื่นๆ ได้แก่ แท่งแก้วคน ช้อนตักสาร ลูกยาง น้ำกลั่น ขวดพลาสติก

2. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1 สี Reactive Black 5 Reactive Red 198 และ Reactive Yellow 176

2.2 กรดอะซิติก กรดไวโอรูลิก และกรดไฮโดรคลอริก

2.3 สารละลายต่างๆ ได้แก่ 2, 6-ไดเมทอกซีฟีนอล โซเดียมอะซิเตท แมงกานีสซัลเฟต ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คอปเปอร์ซัลเฟต โซเดียมไฮดรอกไซด์ แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ ที่ pH 5.6 และฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ที่ pH 7

2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

2.5 กลูโคส

2.6 Yeast Extract

2.7 ผงโพลีเอทิลีนไกลคอล 20000

วิธีการ

1. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์

นำก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ด 5 ชนิด คือ เห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajor-caju (Fr.) Singers*) เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) เห็ดยานางิ (*Agrocybe cylindracea*) เห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus*) และเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum (Leys. ex Fr.) Karst*) ซึ่งเป็นก้อนเลี้ยงเชื้อหลังจากหมดระยะการเก็บดอกเห็ด จากนั้นนำก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดเก็บที่ตู้เย็น เมื่อจะนำไปทดลองทำการผสมคลุกเคล้าก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดให้เป็นเนื้อเดียวกันสำหรับเห็ดแต่ละชนิด

1.1 ศึกษาผลของอัตราส่วนก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดกับสารละลายสกัดต่อการสกัดเอนไซม์

นำก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดมา 1 ชนิด คลุกเคล้าให้เป็นเนื้อเดียวกัน สกัดเอนไซม์ด้วยสารละลายอะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 5.6 เป็นสารละลายสกัดใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้อัตราส่วนของน้ำหนักก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดกับสารละลายสกัดเป็น 1 : 2 1 : 3 และ 1 : 4 (15 : 30 15 : 45 และ 15 : 60 กรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) ทำการทดลองสามซ้ำ เขย่าขวดเพื่อให้ก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดผสมคลุกเคล้ากับสารละลายสกัดด้วยอัตราเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด จากนั้นกรองด้วยผ้า

ขาวบาง นำส่วนที่เป็นน้ำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และแยกเอาส่วนน้ำใสไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ (enzyme activity)

1.2 ศึกษาผลของชนิดสารละลายสกัดต่อการสกัดเอนไซม์

นำก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดมา 1 ชนิด (ชนิดเดียวกันกับการทดลองที่ 2.1) คลุกเคล้าให้เป็นเนื้อเดียวกัน สกัดเอนไซม์ด้วยอัตราส่วนที่เหมาะสม (จากการทดลองที่ 2.1) ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายสกัด 0.2 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 7 และ 50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ ที่ pH 5.6 ทำการทดลองสามซ้ำในแต่ละชนิดสารละลายสกัด เขย่าขวดเพื่อให้ก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดผสมคลุกเคล้ากับสารละลายสกัดด้วยอัตราเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ในระยะเวลาที่เหมาะสม (จากการทดลองที่ 2.1) จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางเอาส่วนที่เป็นน้ำนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และแยกเอาส่วนน้ำใสที่ได้ไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เกิดขึ้น

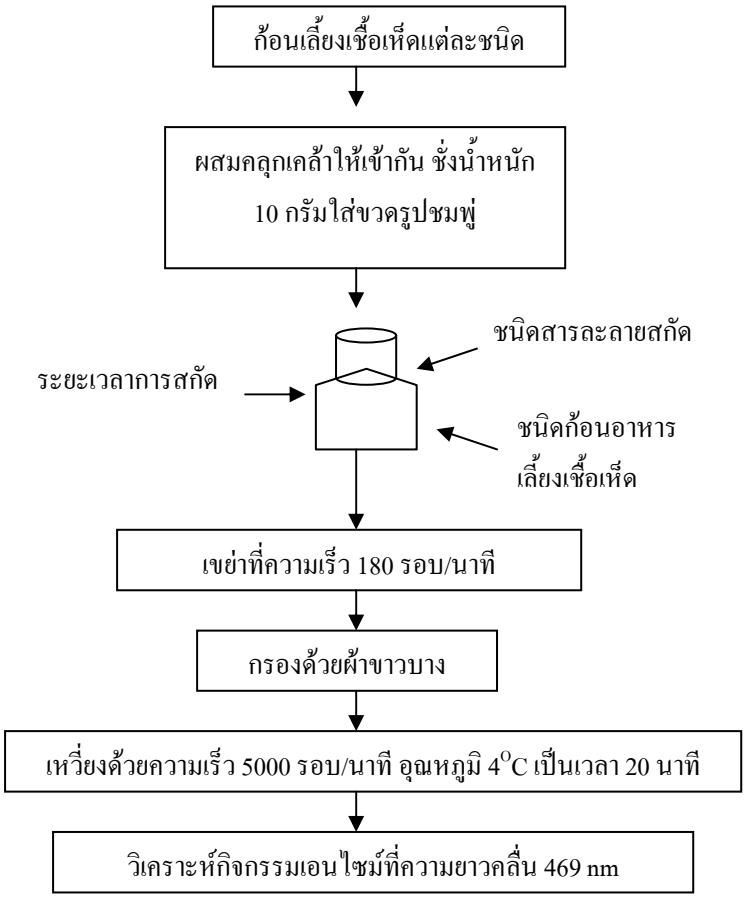
1.3 ศึกษาผลของก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดแต่ละชนิดต่อการสกัดเอนไซม์

หลังจากทราบสภาวะในการสกัดเอนไซม์ที่เหมาะสมแล้ว นำมาสกัดก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดทั้ง 5 ชนิด ด้วยสารละลายสกัดและระยะเวลาที่เหมาะสม (จากการทดลองที่ 2.1 และ 2.2) ทำการทดลองสามซ้ำในแต่ละชนิดของเห็ดเขย่าขวดเพื่อให้ก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดผสมคลุกเคล้ากับสารละลายสกัดด้วยอัตราเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางเอาส่วนที่เป็นน้ำนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และแยกเอาส่วนน้ำใสที่ได้ไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เกิดขึ้น ซึ่งการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ทั้งหมดแสดงในภาพที่ 4

1.4 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

กิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส และ แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส วิเคราะห์จากการวัดอัตราการออกซิไดซ์ของสารละลาย 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMP) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4.5 ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของ 2-6, DMP ที่ถูกออกซิไดซ์ ที่ความยาวคลื่น 469 nm (E_{469} = 27500) ด้วยเครื่องยูวี/วิสิเบิลสเปค

โตรโฟโตมิเตอร์ ส่วนในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ต้องเติม 0.1 มิลลิโมลาร์ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ สารละลายแมงกานีสซัลเฟต ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เพิ่มเข้าไปด้วย โดยอัตราการออกซิไดซ์ 2,6-DMP ของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสเป็นผลต่างระหว่างอัตราการออกซิไดซ์ 2,6-DMP ที่เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และแมงกานีสซัลเฟตกับอัตราการออกซิไดซ์ของเอนไซม์แลคเคส โดยเอนไซม์ 1 ยูนิต เท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์ที่ออกซิไดซ์สับสเตรท 1 ไมโครโมล ในเวลา 60 วินาที



ภาพที่ 4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการบำบัดสีย้อมโดยใช้สารละลายเอนไซม์

2.1 ทดสอบการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ที่ความเข้มข้น 50 ppm ในน้ำเสียสังเคราะห์ 100 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่สกัดจากก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด (จากการทดลองขั้นตอนที่ 1.3) ที่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ระดับต่างๆ นำสารละลายไปวัด

ค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง ด้วยเครื่องยูวี/วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น GBC 932 ที่ความยาวคลื่น 598 นาโนเมตร

2.2 ทดสอบการกำจัดสีย้อม Reactive Red 198 และ Reactive Yellow 176 ที่ความเข้มข้น 50 ppm ในน้ำเสียสังเคราะห์ 100 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายเอนไซม์ที่สกัดจากก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด (จากการทดลองขั้นตอนที่ 1.3) โดยเลือกใช้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สามารถบำบัดสี Reactive Black 5 ดีที่สุด (จากการทดลองขั้นตอนที่ 2.1) ในการบำบัดสีย้อมทั้งสองนี้ นำสารละลายไปวัดการลดลงของค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องยูวี/วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น GBC 932 ที่ความยาวคลื่น 518 นาโนเมตร (Reactive Red 198) และ 400 นาโนเมตร (Reactive Yellow 176)

2.3 ใช้สารละลายเอนไซม์แลคเคสปริมาณที่เหมาะสม (จากการทดลองขั้นตอนที่ 2.1 และ 2.2) ทดสอบผลของสารมีเดียเตอร์ คือ กรดไวโอรูริก (violuric acid) ที่ความเข้มข้นต่างๆในการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี/วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น GBC 932 ที่ความยาวคลื่น 598 นาโนเมตร

2.4 ทดสอบผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ในการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 เติมความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่ระดับต่างๆในสารละลายเอนไซม์และน้ำเสียสังเคราะห์ นำสารละลายไปวัดการลดลงของการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องยูวี/วิสิเบิลสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น GBC 932 ที่ความยาวคลื่น 598 นาโนเมตร

คำนวณประสิทธิภาพการกำจัดสีในน้ำเสีย (% color removal efficiency) จากสูตร

$$\% \text{ color removal efficiency} = \frac{C_1 - C_2}{C_1} \times 100$$

C_1 คือ ความเข้มข้นของสีย้อมเริ่มต้น (ppm)

C_2 คือ ความเข้มข้นของสีย้อมหลังการทดลอง (ppm)

3. ศึกษาการบำบัดสีย้อมในน้ำเสียด้วยเอนไซม์ที่ตรึงบนตัวกลาง

จากขั้นตอนการทดลองที่ 1.3 ทราบว่าก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อของเห็ดชนิดใดสามารถผลิตเอนไซม์ลิกนิโนไลติกได้มากที่สุด จากนั้นเชื้อเห็ดชนิดนั้นเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง (Solid State Fermentation) ด้วยรำข้าว เพื่อผลิตเอนไซม์ให้ได้ปริมาณมากและทำเอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น โดยตรึงเอนไซม์บนตัวกลาง 2 ชนิด คือ กะลามะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และเม็ดเซลลูโลส ศึกษาการบำบัดสีย้อมในน้ำเสียสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ที่ตรึงบนตัวกลางในระบบชั้นตัวกลางอัดบรรจุ (packed-bed reactor) ในระดับห้องปฏิบัติการ

4. สรุปผลและจัดทำรูปเล่มรายงาน

วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติด้วยวิธี ANOVA ที่ช่วงความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์และจัดทำรายงาน

5. ระยะเวลาในการทำวิจัย

เริ่มตั้งแต่ เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2549 และสิ้นสุด เดือนตุลาคม พ.ศ. 2550

6. สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพมหานคร

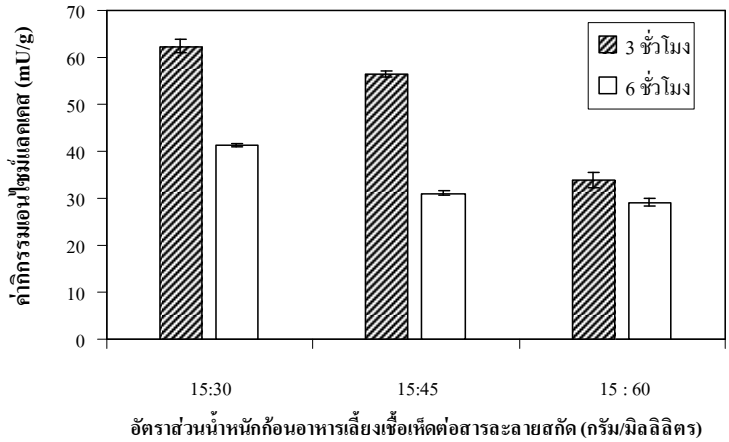
ผลและวิจารณ์

1. สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์

1.1 ผลของอัตราส่วนก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดกับสารละลายสกัดต่อการสกัดเอนไซม์

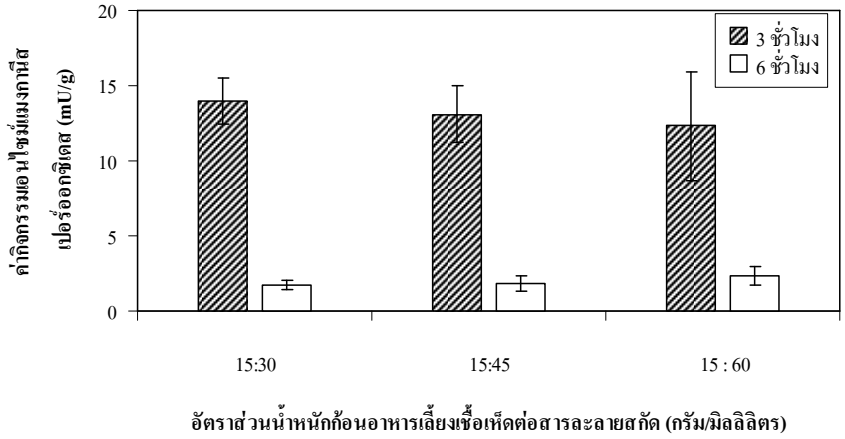
นำก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus*) มาคลุกเคล้าให้เป็นเนื้อเดียวกัน สกัดเอนไซม์ด้วยสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ ที่ pH 5.6 ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใช้อัตราส่วนของน้ำหนักก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดต่อสารละลายสกัดเป็น 1 : 2 1 : 3 และ 1 : 4 (15 : 30 15 : 45 และ 15 : 60 กรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) ทำการทดลองสามซ้ำ เขย่าขวดให้ก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดคลุกเคล้ากับสารละลายสกัด ด้วยอัตราเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง กรองด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนที่เป็นน้ำไปเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และแยกเอาส่วนน้ำใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

จากผลการทดลองพบว่า อัตราส่วนของน้ำหนักก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดต่อสารละลายสกัด 1 : 2 (15 กรัม/30 มิลลิลิตร) ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสมากที่สุดที่ระยะเวลาการสกัด 3 ชั่วโมง (62.28 $\pm$ 1.47 mU/g) และ 6 ชั่วโมง (41.34 $\pm$ 0.27 mU/g) (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ผลของอัตราส่วนน้ำหนักก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดเป๋าฮื้อต่อปริมาตรสารละลายสกัดในการสกัดเอนไซม์แลคเคส

ในส่วนของเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส พบว่าที่อัตราส่วนของน้ำหนักก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดต่อสารละลายสกัด 1 : 2 (15 กรัม/30 มิลลิลิตร) ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์มากที่สุดที่ระยะเวลาการสกัด 3 ชั่วโมง (13.97 $\pm$ 1.56 mU/g) ขณะที่ระยะเวลาการสกัด 6 ชั่วโมง อัตราส่วนของน้ำหนักก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดต่อสารละลายสกัด 1 : 4 (15 กรัม/60 มิลลิลิตร) ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์มากที่สุด (2.33 $\pm$ 0.64 mU/g) เมื่อพิจารณาแล้วพบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในแต่ละอัตราส่วนการสกัดของแต่ละช่วงเวลาการสกัดมีค่าใกล้เคียงกันมากและมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 6)

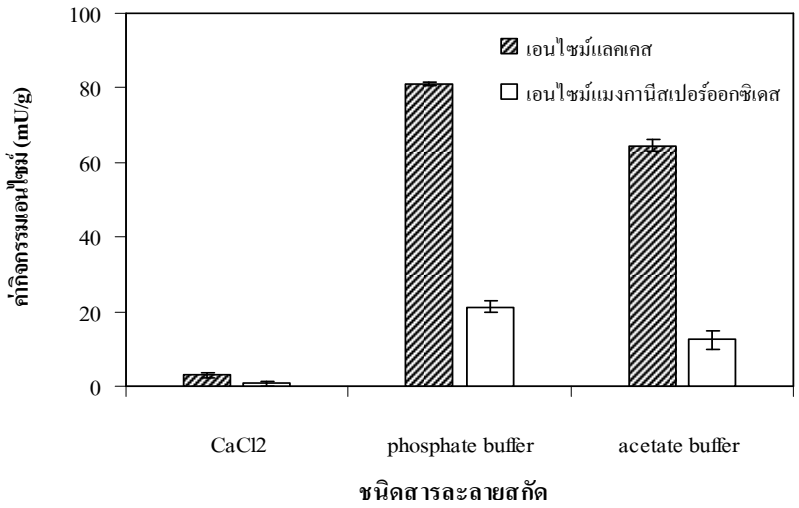


ภาพที่ 6 ผลของอัตราส่วนน้ำหนักก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดเป๋าฮื้อต่อปริมาตรสารละลายสกัดในการสกัดเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

อัตราส่วนของการสกัดมีผลต่อปริมาณค่ากิจกรรมเอนไซม์ เนื่องจากการใช้ปริมาณสารสกัดที่เหมาะสมหรือเพียงพอสามารถสกัดเอนไซม์จากก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดได้อย่างทั่วถึง ทำให้ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่สูง ปริมาณเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสลดลงเมื่อระยะเวลาการสกัดเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ระยะเวลาการสกัดเอนไซม์ที่เหมาะสมจะขึ้นอยู่กับชนิดเอนไซม์ที่ทำการศึกษา (Nannipieri *et al*., 1980) และระยะเวลาการสกัดที่ใช้เวลานานทำให้เอนไซม์หรือโปรตีนเกิดการสลายตัวได้ (Criquet *et al*., 1999) จากค่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่ได้จากการทดลอง จึงเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสม คือ 1 : 2 (15 กรัม/30 มิลลิลิตร) รวมถึงระยะเวลาการสกัดที่เหมาะสม 3 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้ในการทดลองหาชนิดสารละลายสกัดที่เหมาะสมในขั้นต่อไป

1.2 ผลของชนิดสารละลายสกัดต่อการสกัดเอนไซม์

นำก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus*) คลุกเคล้าให้เป็นเนื้อเดียวกัน สกัดเอนไซม์ด้วยอัตราส่วน 1:2 ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลาย 0.2 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) สารละลาย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 7 และสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ ที่ pH 5.6 ทำการทดลองสามซ้ำในแต่ละชนิดสารละลายสกัด เขย่าขวดเพื่อให้ก้อนเลี้ยงเชื้อเห็ดผสมคลุกเคล้ากับสารละลายสกัด ด้วยอัตราเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ในระยะเวลาการสกัด 3 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางเอาส่วนที่เป็นน้ำนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และแยกเอาส่วนน้ำใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส



ภาพที่ 7 ผลของชนิดสารละลายสกัดต่อการสกัดเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

จากผลการทดลองพบว่าสารละลายสกัด 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 7 สามารถสกัดเอนไซม์ได้ดีที่สุด ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสสูงที่สุด (81.14 $\pm$ 0.42 และ 21.29 $\pm$ 1.59 mU/g ตามลำดับ) ขณะที่สารละลายสกัด 50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ ที่ pH 5.6 สามารถสกัดเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้รองลงมา (64.51 $\pm$ 1.54 และ 12.55 $\pm$ 2.54 mU/g ตามลำดับ) (ภาพที่ 7) สารละลายสกัด 0.2 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสน้อยที่สุด (2.98 $\pm$

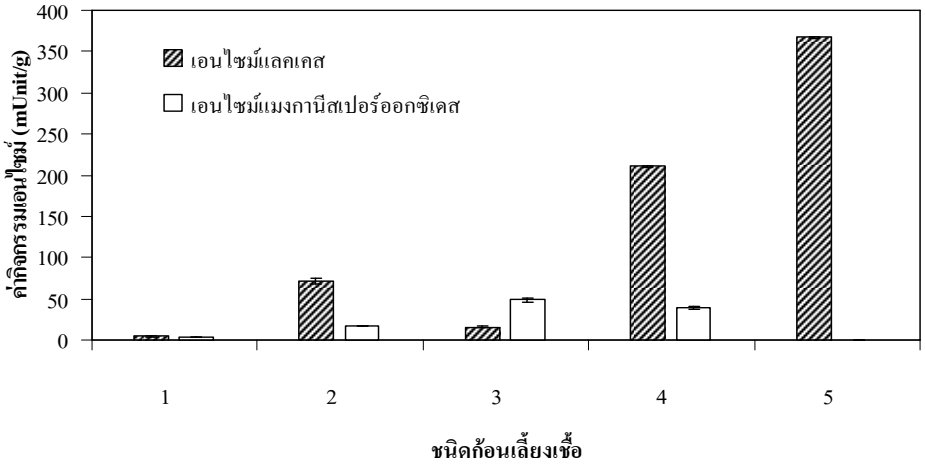
0.56 และ 0.71 $\pm$ 0.49 mU/g ตามลำดับ) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้สารสกัดต่างชนิดกันมีผลต่อการสกัดเอนไซม์ ผลการทดลองนี้แตกต่างกับ Criquet *et al*. (1999) ซึ่งได้ทำการทดลองสกัดเอนไซม์แลคเคสจาก evergreen oak litter ด้วยสารสกัด 10 ชนิด พบว่าการใช้สารสกัดแคลเซียมคลอไรด์สามารถสกัดเอนไซม์แลคเคสได้ปริมาณสูงที่สุดที่ช่วงความเข้มข้น 0.2-1.0โมลาร์ การใช้สารละลายสกัดชนิดเดียวกันสกัดเอนไซม์ชนิดเดียวกันจากวัตถุดิบต่างชนิดกันให้ปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกัน การใช้สารละลายสกัดที่เหมาะสมจึงต้องพิจารณาในหลายปัจจัยทั้งชนิดและความเข้มข้นของสารละลายสกัด แหล่งวัตถุดิบ ชนิดของเอนไซม์ หรือค่าความเป็นกรด-ด่าง จากการทดลองนี้ จึงเลือกสารละลาย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 7 ใช้เป็นสารละลายสกัดในการทดลองการสกัดเอนไซม์ในก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดแต่ละชนิดต่อไป

1.3 ผลของก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดแต่ละชนิดต่อการสกัดเอนไซม์

สกัดก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดทั้ง 5 ชนิด คือ เห็ดนางฟ้าภูฏาน (*Pleurotus sajor-caju (Fr.) Singers*) เห็ดนางรมฮังการี (*Pleurotus ostreatus*) เห็ดยานางิ (*Agrocybe cylindracea*) เห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus*) และเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum (Leys. ex Fr.) Karst*) ด้วยสภาวะการสกัดที่เหมาะสม (ก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ด 15 กรัม/สารละลาย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 7 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ระยะเวลาการสกัด 3 ชั่วโมง) ทำการทดลองสามซ้ำในแต่ละชนิดของก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ด เขย่าขวดเพื่อให้ก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดผสมคลุกเคล้ากับสารละลายสกัดด้วยอัตราเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางเอาส่วนที่เป็นน้ำนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และแยกเอาส่วนน้ำใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

จากผลการทดลองพบว่าก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดนางรมฮังการี (*Pleurotus ostreatus*) ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสสูงที่สุด (367.04 $\pm$ 1.26 mU/g) รองลงมาคือเห็ดนางฟ้าภูฏาน (*Pleurotus sajor-caju*) (210.73 $\pm$ 0.90 mU/g) เห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus*) (71.63 $\pm$ 2.96 mU/g) เห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) (15.88 $\pm$ 0.42 mU/g) และเห็ดยานางิ (*Agrocybe cylindracea*) (4.43 $\pm$ 0.29 mU/g) ตามลำดับ ขณะที่เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสไม่พบในก้อนเชื้อเห็ดนางรมฮังการีแต่พบในก้อนเลี้ยงเชื้อเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) มากที่สุด (48.73 $\pm$ 3.07 mU/g) รองลงมาคือเห็ดนางฟ้าภูฏาน (*Pleurotus sajor-caju*) (38.70 $\pm$ 1.70 mU/g)

เห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus*) (17.28 $\pm$ 0.48 mU/g) และเห็ดยานางิ (*Agrocybe cylindracea*) (3.72 $\pm$ 0.48 mU/g) ตามลำดับ (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 ปริมาณเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจากก้อนเลี้ยงเชื้อเห็ด 5 ชนิด: 1 = เห็ดยานางิ (*Agrocybe cylindracea*) 2 = เห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus*) 3 = เห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) 4 = เห็ดนางฟ้าภูฏาน (*Pleurotus sajor-caju*) 5 = เห็ดนางรมฮังการี (*Pleurotus ostreatus*)

เมื่อมองโดยภาพรวมพบว่าก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดทั้ง 5 ชนิดผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้น้อยกว่าเอนไซม์แลคเคส เห็ดรากลุ่มไวท์รอทสามารถผลิตเอนไซม์ลิกนินโนไลติกแตกต่างกัน บางชนิดผลิตเอนไซม์ได้เพียงชนิดเดียว และบางชนิดอาจผลิตเอนไซม์ได้ 2-3 ชนิด (Wesenberg *et al*., 2003) และโดยส่วนใหญ่เห็ดรากลุ่มไวท์รอทมักจะผลิตเอนไซม์แลคเคสมากกว่าเอนไซม์ชนิดอื่นๆ (Murugesan *et al*., 2007) จากภาพที่ 8 พบว่ากลุ่มเห็ดราสกุล *Pleurotus* ผลิตเอนไซม์แลคเคสได้สูงและเห็ดรากลุ่มนี้นิยมนำมาศึกษาการสกัดเอนไซม์ลิกนินโนไลติก อย่างมาก Wesenberg *et al*. (2003) ได้รวบรวมข้อมูลพบว่ากลุ่มเห็ดราสกุล *Pleurotus* ที่นิยมนำมาศึกษาการสกัดเอนไซม์มาก ได้แก่ *P. ostreatus*, *P. sajor-caju* และ *P. eryngii* ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ได้หลากหลาย เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มเห็ดราสกุลเดียวกันก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus*) ให้ปริมาณเอนไซม์แลคเคสน้อยกว่าเห็ดนางฟ้าภูฏาน (*Pleurotus sajor-caju*) และเห็ดนางรมฮังการี (*Pleurotus ostreatus*) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Eichlerova *et al*. (2006) ซึ่งศึกษาการผลิตเอนไซม์ลิกนินโนไลติกของกลุ่มเห็ดราสกุล *Pleurotus* และประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อมจากโรงงานอุตสาหกรรม พบว่าเห็ดนางรมฮังการี (*Pleurotus ostreatus*) ให้ปริมาณเอนไซม์

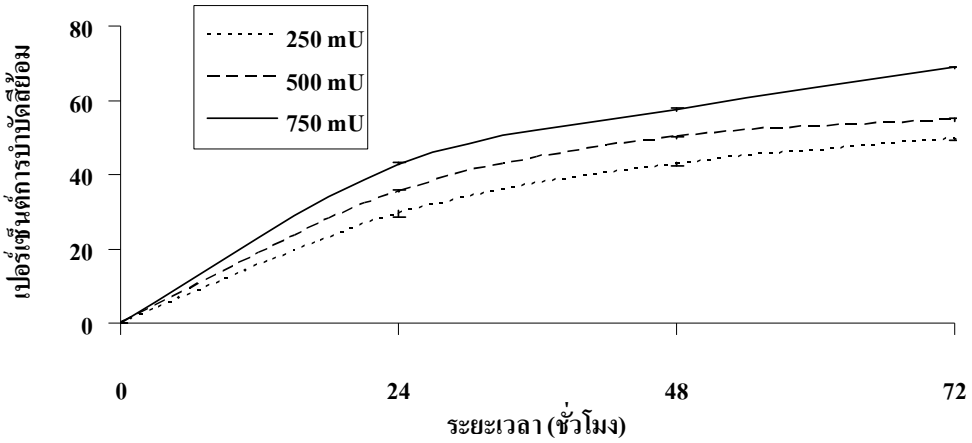
แลคเคส (73.0 $\pm$ 6.5 U/L) สูงกว่าเห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus*) (13.3 $\pm$ 1.0 U/L) ในอาหารเหลว Kirk medium ดังนั้นจากผลการทดลองในขั้นตอนนี้จึงเลือกชนิดก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ด 2 ชนิด คือ เห็ดนางรมฮังการี และเห็ดนางฟ้าภูฏานนำมาทดสอบความสามารถในการบำบัดสีย้อมด้วยค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่คำนวณจากเอนไซม์แลคเคสเท่านั้นในขั้นตอนต่อไป

2. สภาวะที่เหมาะสมในการบำบัดสีย้อมโดยใช้สารละลายเอนไซม์แลคเคส

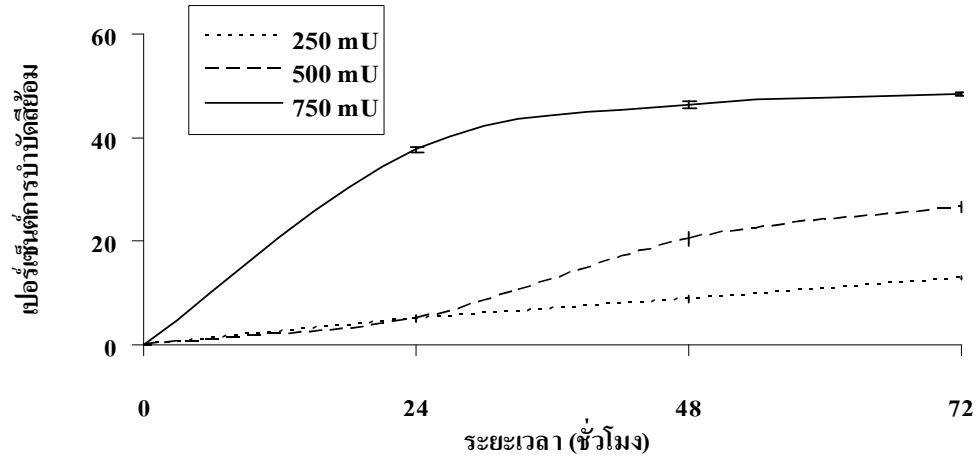
2.1 ผลการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ด้วยสารละลายเอนไซม์แลคเคส

เติมสารละลายเอนไซม์แลคเคสจากเห็ดนางรมฮังการี(*P. ostreatus*) และเห็ดนางฟ้าภูฏาน (*P. sajor-caju*) ที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 250 500 และ 750 mU ในน้ำเสียสังเคราะห์ สีย้อม Reactive Black 5 ที่ความเข้มข้น 50 ppm 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที เก็บตัวอย่างน้ำเสียสังเคราะห์ที่ 24 48 และ 72 ชั่วโมง วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การบำบัดสีย้อมโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 598 nm

ประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 (50 ppm) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น ของทั้งเอนไซม์แลคเคสที่สกัดจาก *P. ostreatus* และ *P. sajor-caju* โดยที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 750 mU ประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อมสูงที่สุด ซึ่งเอนไซม์แลคเคสที่สกัดจาก *P. ostreatus* บำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ได้ 68.86 $\pm$ 0.27 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 9) ขณะที่เอนไซม์แลคเคสที่สกัดจาก *P. sajor-caju* บำบัดสีย้อมได้ 48.48 $\pm$ 0.39 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 10)



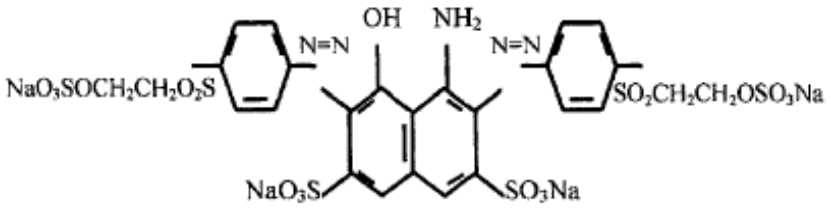
ภาพที่ 9 ประสิทธิภาพการบำบัดสี Reactive Black 5 (50 ppm) ด้วยเอนไซม์แลคเคสที่สกัดจาก *P. ostreatus* ที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 250 500 และ 750 mU



ภาพที่ 10 ประสิทธิภาพการบำบัดสี Reactive Black 5 (50 ppm) ด้วยเอนไซม์แลคเคสที่สกัดจาก *P. sajor-caju* ที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 250 500 และ 750 mU

โดยทั่วไปสีย้อม Reactive Black 5 มีพันธะอะโซ (N=N) เป็นองค์ประกอบ (ภาพที่ 11) สีย้อมประเภทอะโซนี้ไม่ได้เป็นสับสเตรทของเอนไซม์แลคเคสโดยตรง Criquet *et al.* (1999) และ Shleev *et al.* (2006) อธิบายกลไกการทำงานทั่วไปของเอนไซม์แลคเคสว่าเป็นเอนไซม์ที่มีกลุ่มอะตอมทองแดงเป็นองค์ประกอบสามารถออกซิไดส์สารประกอบพวกฟีนอล (phenolic

compounds) โดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนไปดึงไฮโดรเจนจากหมู่ไฮดรอกซิลของสารประกอบพวกฟีนอลและสามารถออกซิไดส์สารที่ไม่ได้มีหมู่ฟีนอลเป็นองค์ประกอบ (non-phenolic compounds) ได้เช่นเดียวกัน

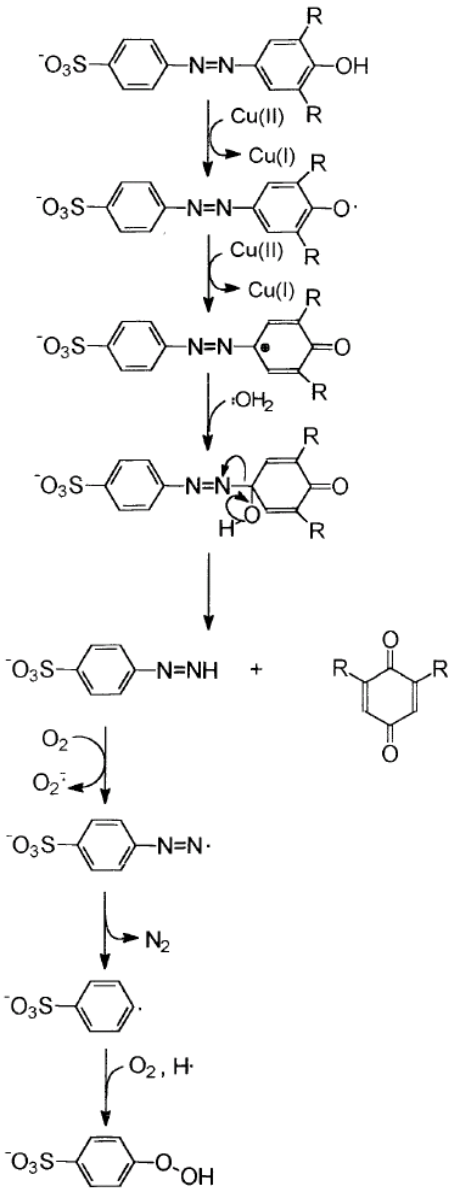


ภาพที่ 11 ลักษณะโครงสร้างของสีย้อม Reactive Black 5

ที่มา: Armagan *et al*. (2004)

จากการทดลองพบว่าเอนไซม์แลคเคสที่สกัดจาก *P. ostreatus* มีประสิทธิภาพในการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ได้สูงกว่า *P. sajor-caju* ทั้งนี้ผลการทดลองสอดคล้องกับ Rodriquez *et al*. (2004) ซึ่งศึกษาการบำบัดสารมลพิษ 2, 4-dichorophenol ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ด้วยเห็ดราสกุล *Pleurotus* พบว่าที่ระยะเวลา 10 ชั่วโมง *P. ostreatus* สามารถย่อยสลาย 2, 4-dichorophenol ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ *P. sajor-caju* สามารถย่อยสลายได้ประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ Piontek *et al*. (2002) และ Bukh *et al*. (2006) ให้เหตุผลถึง *P. ostreatus* สามารถบำบัดสีย้อมหรือสารมลพิษได้ดีกว่า *P. sajor-caju* นั้นเป็นผลเนื่องมาจากเอนไซม์แลคเคสจากเชื้อทั้งสองชนิดมีตำแหน่งของกลุ่มอะตอมทองแดงที่เข้าทำปฏิกิริยาแตกต่างกัน ทำให้ปฏิกิริยาเกิดช้าหรือเร็วแตกต่างกันและประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อมจึงแตกต่างกัน Pricelius *et al*. (2007) กล่าวว่าปฏิกิริยาของเอนไซม์แลคเคสมีหลากหลาย ทั้งปฏิกิริยาในรูปแบบ one electron oxidations ไปออกซิไดส์สารประกอบฟีนอลและสารประกอบอะโรมาติกเอมีนให้กลายเป็น reactive free radicals หรือปฏิกิริยาที่เกี่ยวเนื่องกับ polymerization depolymerization demethylation quinine formation หรือ การทำลายพันธะวงแหวนของสารประกอบพวกอะโรมาติก Chivukula and Renganathan (1995) แสดงถึงกลไกการบำบัดสีย้อมที่มีพันธะอะโซ (N=N) (ภาพที่ 12) ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในสีย้อม Reactive Black 5 และอธิบายว่ากลุ่มวงแหวนฟีนอล (phenolic ring) ของสีย้อมประเภทอะโซมีลักษณะเป็น electron rich ในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยเอนไซม์แลคเคส นอกจากนี้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอนไซม์แลคเคสสามารถช่วยลดความเป็นพิษของสีย้อมได้

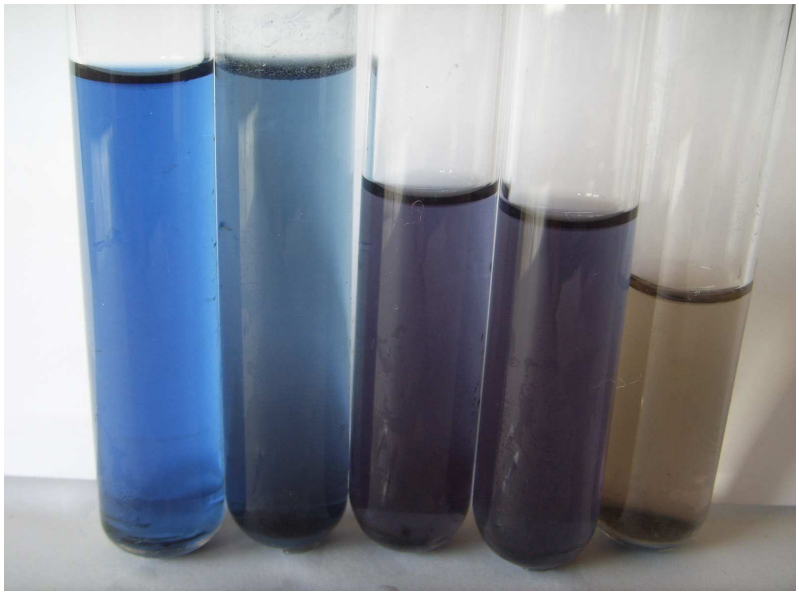
เนื่องจากในการเกิดปฏิกิริยาทำลายพันธะอะโซจะได้โมเลกุลไนโตรเจนซึ่งจะไม่ก่อตัวเป็นสารประกอบอะโรมาติกเอมีน



ภาพที่ 12 กลไกการบำบัดสีย้อมประเภทอะโซด้วยเอนไซม์แลคเคสจาก *Pyricularia oryzae*

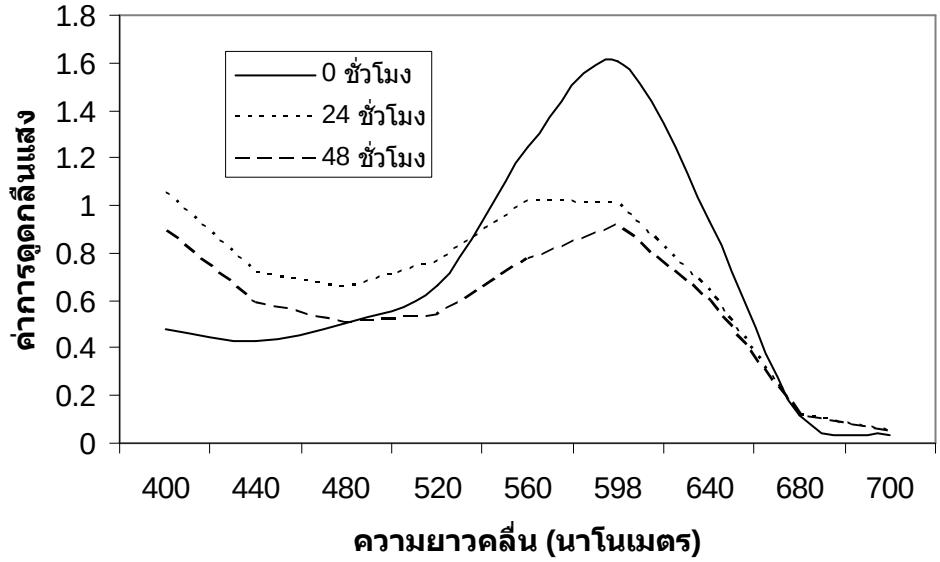
ที่มา: Chivukula and Renganathan (1995)

โมเลกุลของสีย้อมที่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์แลคเคสเกิดสารมัธยันต์ (intermediate compounds) ในแต่ละขั้นตอนของการทำปฏิกิริยา ซึ่งสามารถสังเกตการเปลี่ยนสีของสีย้อมโดยสีย้อม Reactive Black 5 จะเปลี่ยนจากสีน้ำเงิน (ที่ 0 ชั่วโมง) เป็นเขียว ม่วง และเหลืองอมน้ำตาล (ที่ 72 ชั่วโมง) (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 การเปลี่ยนสีของสีย้อม Reactive Black 5 เมื่อถูกเอนไซม์แลคเคสย่อยสลาย

การเปลี่ยนสีของสีย้อมหลังจากทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เนื่องมาจากโครงสร้างโมเลกุลของสีย้อมในส่วนที่ให้สี คือ chromorphomic group เปลี่ยนแปลงไป (Lucas *et al*., 2006) นอกจากนี้ผลของการบำบัดสีย้อมสามารถพิสูจน์ได้ด้วยการสแกนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูงสุดของสีย้อม Reactive Black 5 (ภาพที่ 14) ซึ่งจากภาพจะพบว่าที่ความยาวคลื่นสูงสุดของสีย้อม Reactive Black 5 คือ 598 นาโนเมตรจะให้ค่าการดูดกลืนแสงแตกต่างกันที่ระยะเวลาต่างๆ ของการบำบัดด้วยเอนไซม์แลคเคส เป็นการบ่งบอกถึงโครงสร้างสีย้อมถูกย่อยสลายหรือเปลี่ยนแปลงไปเพราะการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์แลคเคส



ภาพที่ 14 ค่าการดูดกลืนแสงสีย้อม Reactive Black 5 (50 ppm) ของการบำบัดที่ระยะเวลาต่างๆ ในช่วงความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตร

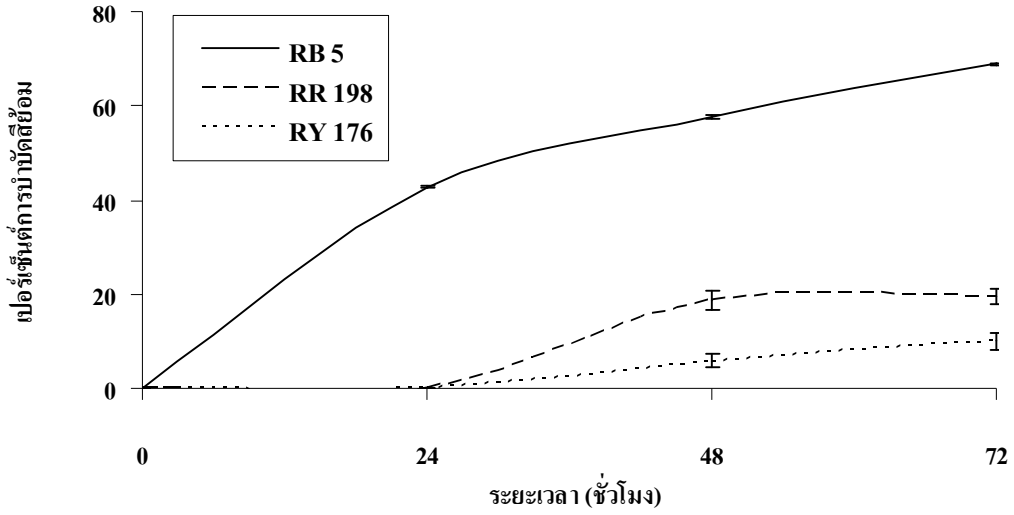
นอกจากนี้ Wong and Yu (1999) ได้ทำการทดลองการบำบัดสีย้อมด้วยเอนไซม์แลคเคสจาก *Trametes versicolor* พบว่าสีย้อมประเภทแอนทราควิโนนเป็นสับสเตรทโดยตรงของเอนไซม์แลคเคส ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Abadulla *et al*. (2000) ที่สกัดเอนไซม์แลคเคสจาก *T. hirsuta* พบว่าสามารถบำบัดสีย้อม Acid Blue 74 ซึ่งเป็นสีย้อมประเภทแอนทราควิโนนได้เร็วกว่าสีย้อม Reactive Black 5 ทั้งนี้ได้ให้เหตุผลว่าเนื่องมาจากข้อจำกัดในการทำปฏิกิริยาของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) และหมู่เอมีน ($-NH_2$) ของสี Reactive Black 5 จึงทำให้ใช้ระยะเวลาบำบัดนานกว่าสีย้อม Acid Blue 74

ดังนั้นจากผลการทดลองทั้งหมดในขั้นตอนนี้จึงเลือกชนิดก้อนเลี้ยงเชื้อเห็ดนางรมฮังการี (*P. ostreatus*) นำมาสกัดเอนไซม์แลคเคสโดยใช้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ 750 mU เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อม Reactive Red 198 และ Reactive Yellow 176 เปรียบเทียบกับสีย้อม Reactive Black 5 ในขั้นตอนต่อไป

2.2 ผลการบำบัดสีย้อม Reactive Red 198 และ Reactive Yellow 176 ด้วยสารละลายเอนไซม์แลคเคส เปรียบเทียบกับการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5

ใช้เอนไซม์แลคเคสที่สกัดจากก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ด *P. ostreatus* 750 mU บำบัดสีย้อม Reactive Red 198 และ Reactive Yellow 176 ที่ความเข้มข้น 50 ppm ในน้ำเสียสังเคราะห์ 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที โดยเก็บตัวอย่างที่ 24 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับแล้ววิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การบำบัดสีย้อมโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 518 นาโนเมตร (Reactive Red 198) และ 400 นาโนเมตร (Reactive Yellow 176)

จากผลการทดลองพบว่าหลังจาก 72 ชั่วโมง เอนไซม์แลคเคสบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ได้ 68.86 $\pm$ 0.27 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สีย้อม Reactive Red 198 และ Reactive Yellow 176 สามารถบำบัดได้ 19.63 $\pm$ 1.66 และ 9.99 $\pm$ 1.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 ประสิทธิภาพการบำบัดสี Reactive Red 198 (RR 198) Reactive Yellow 176 (RR 176) และ Reactive Black 5 (RB 5) ที่ 50 ppm ด้วยสารละลายเอนไซม์แลคเคสจาก *P. ostreatus* ที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 750 mU

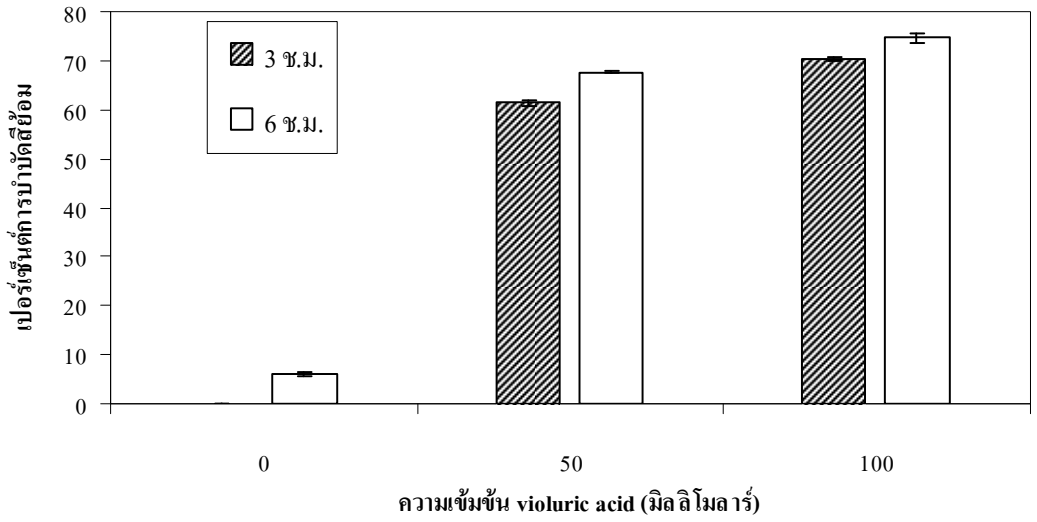
ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสีย้อม Reactive Red 198 และ Reactive Yellow 176 บำบัดได้ยาก Maximo *et al*. (2003) ศึกษาการบำบัดสีย้อมรีแอคทีฟด้วยกลุ่มเห็ดราไวท์รอท 6 ชนิด บนอาหารวุ้น พบว่า *Trametes versicolar* และ *Irpex lacteus* สามารถบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 แต่ไม่สามารถบำบัดสีย้อม Reactive Red 158 และ Reactive Yellow 27 มีเพียง *Phanerochaete magnoliae* เท่านั้นที่บำบัดสีย้อม Reactive Red 158 และ Reactive Yellow 27 ได้เพียงบางส่วน

โครงสร้างของสีย้อมแต่ละชนิดมีความซับซ้อนแตกต่างกันอีกทั้งสีย้อมบางชนิดมีโครงสร้างหรือส่วนประกอบสามารถเป็นสับสเตรทโดยตรงให้กับเอนไซม์และบางชนิดต้องใช้สารเคมีช่วยในการทำปฏิกิริยาจึงส่งผลให้ประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อมแตกต่างกัน (Jarosz-Wilkolazka *et al*., 2002; Junghanns *et al*., 2008) จากการทดลองนี้จึงศึกษาถึงการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 โดยใช้สารละลายเอนไซม์แลคเคสร่วมกับสารมีเดียเตอร์ในการทดลองขั้นต่อไป

2.3 ผลการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ด้วยสารละลายเอนไซม์แลคเคสร่วมกับสารมีเดียเตอร์

ในการศึกษานี้ใช้กรดไวโอรูริก (violuric acid) เป็นตัวแทนของสารมีเดียเตอร์โดยใช้สารละลายเอนไซม์แลคเคสที่สกัดจาก *P. ostreatus* ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 750 mU ร่วมกับสาร violuric acid ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ ในการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 และเปรียบเทียบผลการบำบัดด้วยสารละลายเอนไซม์เพียงอย่างเดียว โดยใช้สีย้อม Reactive Black 5 ที่ความเข้มข้น 50 ppm ในน้ำเสียสังเคราะห์ 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที โดยเก็บตัวอย่างที่ 3 และ 6 ชั่วโมงตามลำดับ แล้ววิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การบำบัดสีย้อมโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 598 nm

เมื่อใช้สาร violuric acid ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ สามารถบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ได้สูงที่สุดทั้งในระยะเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง (70.41 $\pm$ 0.28 และ 74.61 $\pm$ 0.93 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ)เมื่อเปรียบเทียบกับการบำบัดด้วยสารละลายเอนไซม์แลคเคสอย่างเดียวสามารถบำบัดได้ 6.05 $\pm$ 0.35 เปอร์เซ็นต์ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง โดยที่ความเข้มข้นของสาร violuric acid (5 และ 10 มิลลิโมลาร์) ในระยะเวลาการบำบัด 3 และ 6 ชั่วโมง ประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 ประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ที่ความเข้มข้น 50 ppm ด้วยสารละลายเอนไซม์แลคเคสที่สกัดจากก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ด *P. ostreatus* ที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 750 mU ร่วมกับสาร violuric acid ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้ violuric acid ร่วมกับเอนไซม์แลคเคสส่งผลให้การบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 เร็วกว่าการใช้สารละลายเอนไซม์แลคเคสเพียงอย่างเดียว ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Couto and Sanroman (2007) ซึ่งใช้สาร violuric acid เป็นสารมีเดียเตอร์ ในการช่วยบำบัดสีย้อมชนิด diazo ร่วมกับเอนไซม์แลคเคสที่สกัดจาก *Trametes hirsuta* พบว่าเปอร์เซ็นต์การบำบัดสีย้อมเพิ่มขึ้นเป็น 3 เท่าเมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่ใช้สารมีเดียเตอร์ Camerero *et al*. (2004) ทดลองใช้สาร violuric acid ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ บำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ร่วมกับเอนไซม์แลคเคสที่สกัดจาก *Pycnoporus cinnabarinus* พบว่าสามารถบำบัดสีย้อมได้ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่ใช้สารมีเดียเตอร์ซึ่งบำบัดได้น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง

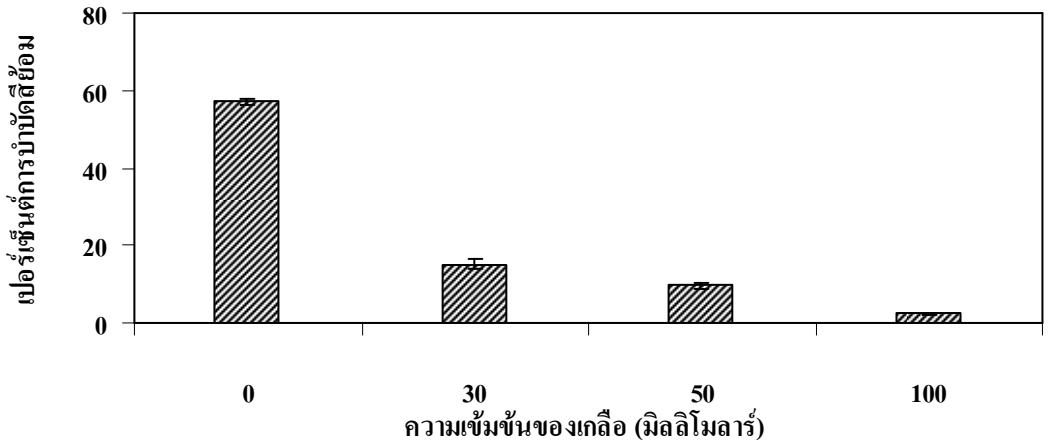
กลไกของสารมีเดียเตอร์ในการเพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อมนั้น Wong and Yu (1999) อธิบายว่าเกิดขึ้นจากเอนไซม์แลคเคสที่ถูกออกซิไดส์โดยออกซิเจนจะไปออกซิไดส์สารมีเดียเตอร์ให้อยู่ในรูป cation radical ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่เสถียร สารมีเดียเตอร์ในรูปนี้จะไปออกซิไดส์โมเลกุลของสีย้อมต่อไปสารมีเดียเตอร์ทำหน้าที่เป็นเหมือนโค-สับสเตรทถ้าพลังงานรีดอกซ์โพเทนเชียล (redoxpotential) ของสารมีเดียเตอร์มีค่าสูงทำให้ความสามารถในการบำบัดสีย้อม

เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Soares *et al*. (2002) ศึกษาการบำบัดสีย้อมอะโซที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยเอน ไซม์แลคเคสที่สกัดจาก *Aspergillus niger* โดยใช้สารมีเดียเตอร์ 2 ชนิด คือ สาร violuric acid และ สาร *N*-hydroxybenzotriazole พบว่าสาร *N*-hydroxybenzotriazole ไม่เพิ่มประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อม ขณะที่สาร violuric acid มีผลทำให้ประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อมลดลง ซึ่งเมื่อใช้เอนไซม์แลคเคสเพียงอย่างเดียวสามารถบำบัดสีย้อมได้ 99.2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้สาร *N*-hydroxybenzotriazole ร่วมกับเอนไซม์บำบัดสีย้อมได้ 98.6 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อใช้สาร violuric acid ร่วมกับสารละลายเอนไซม์บำบัดสีย้อมได้เพียง 55.2 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเลือกใช้สารมีเดียเตอร์เพื่อให้บำบัดสีย้อมอย่างมีประสิทธิภาพนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยทั้งในด้านคุณสมบัติของสารมีเดียเตอร์ที่นำมา ใช้และชนิดของเชื้อราที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์แลคเคส

2.4 ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5

ใช้เอนไซม์แลคเคสที่สกัดจาก *P. ostreatus* ที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 750 mU ร่วมกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 30 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ เพื่อทดสอบผลของเกลือ NaCl ในการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ที่ความเข้มข้น 50 ppm ในน้ำเสียสังเคราะห์ 100 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับการบำบัดสีย้อมที่ไม่ใส่เกลือ NaCl นำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 180 รอบ/นาที โดยเก็บตัวอย่างที่ 72 ชั่วโมงแล้ววิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การบำบัดสีย้อมโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 598 nm

จากภาพที่ 17 พบว่า เกลือ NaCl มีผลทำให้ประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ลดลงในทุกชุดการทดลอง เมื่อความเข้มข้นของเกลือ NaCl เพิ่มขึ้นมีผลทำให้ประสิทธิภาพการบำบัดลดลงตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบชุดการทดลองที่ไม่ใส่เกลือ NaCl ประสิทธิภาพการบำบัดที่ระยะเวลา 72 ช.ม. สามารถบำบัดได้ 57.09 $\pm$ 0.74 เปอร์เซ็นต์และที่ชุดการทดลองที่ใส่เกลือ NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ประสิทธิภาพการบำบัดลดลงเหลือ 2.33 $\pm$ 0.10 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 17 ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อประสิทธิภาพการบำบัดสี Reactive Black 5 ที่ความเข้มข้น 50 ppm ด้วยสารละลายเอนไซม์แลคเคส 750 mU ที่สกัดจากก้อนเลี้ยงเชื้อเห็ด *P. ostreatus* ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง

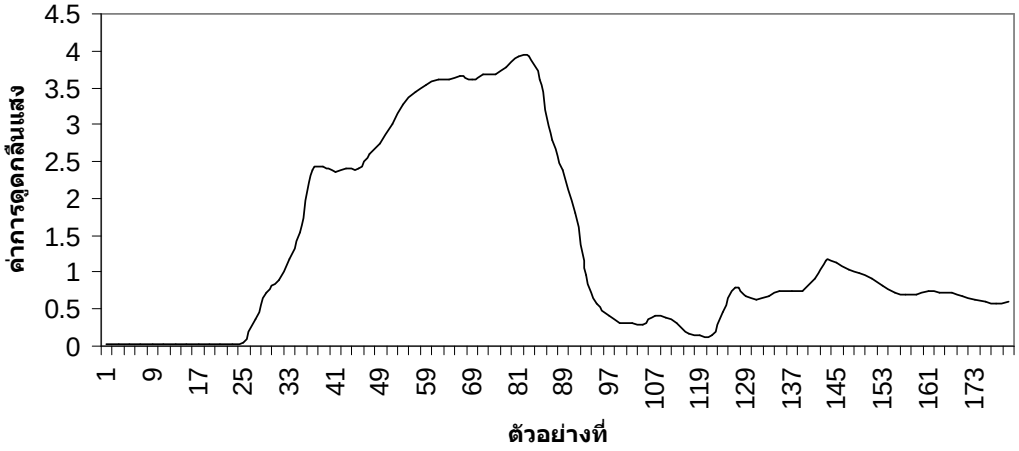
ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเกลือ NaCl มีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลงซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Ullrich *et al.* (2005) ที่ศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์แลคเคสที่ผลิตจาก *Agaricus blazei* พบว่า เกลือ NaCl มีผลทำให้กิจกรรมเอนไซม์ (enzyme activity) ลดลง โดยที่ความเข้มข้นของเกลือ 20 และ 30 มิลลิโมลาร์ จะทำให้ enzyme activity ลดลง 50 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ Liers *et al.* (2007) พบว่าเกลือ NaCl มีผลทำให้ enzyme activity ของ *Xylaria polymorpha* ลดลง โดยที่ความเข้มข้นของเกลือในช่วง 6 ถึง 1500 มิลลิโมลาร์ จะทำให้ activity ลดลง 10 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจะสังเกตได้ว่าเกลือ NaCl มีผลทำให้เอนไซม์แลคเคสที่สกัดจากเชื้อต่างชนิดกันสูญเสีย activity มากหรือน้อยแตกต่างกัน Naki and Varfolomeyev (1981) และ Kim and Nicell (2006) พบว่าถ้าความเข้มข้นของเกลือ NaCl มากกว่า 0.2 M มีผลทำให้ enzyme activity ลดลงเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์

Farnet *et al.* (2008) ได้ศึกษาผลของ halide ions (F^- Cl^- และ Br^-) โดยใช้สารละลาย NaBr NaCl และ NaF ที่ความเข้มข้น 5 10 15 20 และ 25 มิลลิโมลาร์ ต่อการทำงานของเอนไซม์แลคเคสที่สกัดจาก *Marasmius quercophilus* พบว่าสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ NaF ส่งผลให้ activity สูญเสียเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สารละลาย NaCl ที่ความเข้มข้นเดียวกันส่งผลให้เอนไซม์สูญเสีย activity ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ halide ions ต่างชนิดกันส่งผลยับยั้ง enzyme activity แตกต่างกัน ($F^- > Cl^- > Br^-$) ระดับการยับยั้ง activity ของเอนไซม์แลคเคสด้วย halide ions นั้นมีความสัมพันธ์กับกลุ่มอะตอมทองแดงที่บริเวณ active site ของเอนไซม์แลคเคส (Rosconi *et*

al., 2004) และผลของ Cl^- ต่อการยับยั้ง enzyme activity ที่พบกันมากจะอยู่ในรูปสารประกอบจำพวกเกลือคลอไรด์ เช่น NaCl $CaCl_2$ และ $HgCl_2$ เป็นต้น กลุ่ม halide ions ที่ส่งผลต่อการยับยั้ง enzyme activity นั้นไม่รวมถึง I^- เนื่องจากเอนไซม์แลคเคสสามารถออกซิไดส์ I^- ได้ I_2 ดังนั้นผลของความเข้มข้นของเกลือ NaCl ส่งผลต่อ activity ของเอนไซม์แลคเคสในเชื้อราแต่ละชนิดแตกต่างกัน

3. การบำบัดสีย้อมในน้ำเสียสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์แลคเคสที่ตรึงบนตัวกลาง

จากการทดลองขั้นตอนที่ 1 พบว่าการสกัดก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. ostreatus* สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ปริมาณสูงสุด จึงนำเชื้อ *P. ostreatus* มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง (Solid State Fermentation) ด้วยรำข้าว ปรับความชื้น 70 เปอร์เซ็นต์และเติม 2 % กลูโคส yeast extracted 5 กรัม/น้ำ 1 ลิตร และ 1 มิลลิโมลาร์ สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต เพื่อการกระตุ้นให้เชื้อสร้างเอนไซม์เพาะเลี้ยงเชื้อประมาณ 2 อาทิตย์ หลังจากนั้นนำมาสกัดเอนไซม์ด้วยสภาวะที่เหมาะสม (จากการทดลองขั้นที่ 1) เมื่อได้สารละลายเอนไซม์แลคเคสแล้ว ทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้นด้วยผงโพลีเอทิลีนไกลคอลและนำไปตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตให้สารละลายอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ และทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Gel filtration ในคอลัมน์ซึ่งเป็นการแยกชนิดโปรตีนหรือเอนไซม์ตามขนาดมวลโมเลกุล (วิธีการทดลองแสดงในภาคผนวก ก) เก็บตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านจากคอลัมน์ ครั้งละประมาณ 10 มิลลิลิตร/นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ผลการวัดแสดงดังภาพที่ 18



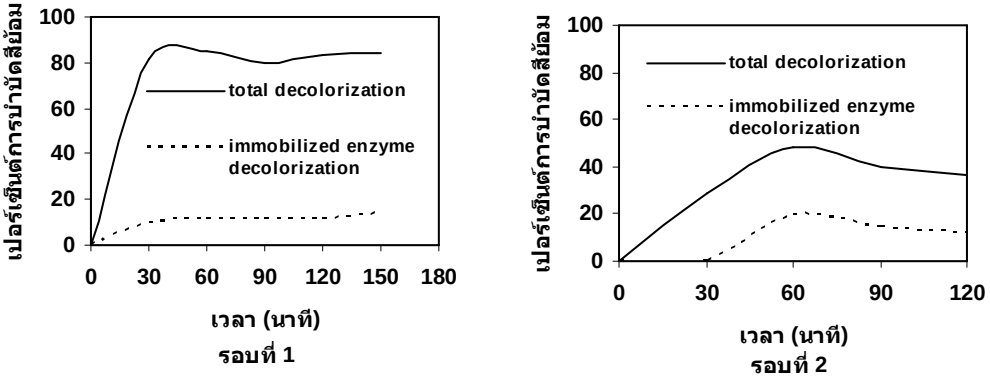
ภาพที่ 18 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

จากภาพที่ 18 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงมี 2 ช่วง ได้แก่ ตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ที่ 83 และตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ที่ 145 โดยค่าการดูดกลืนแสงที่สูงช่วงแรกนั้น ตัวอย่างสารละลาย

เอนไซม์ถูกชะด้วยสารละลาย 0.01 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 6 และช่วงที่สองถูกชะด้วยสารละลายผสมระหว่าง 0.01 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 6 และ 0.1 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ เลือกตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ที่ 31-93 และ 125-180 นำมาผสมกันแล้ววัดค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสที่เกิดขึ้นเพื่อนำสารละลายเอนไซม์นี้ไปใช้ในขั้นตอนการตรึงเอนไซม์บนตัวกลางต่อไป

นำสารละลายเอนไซม์แลคเคสที่บริสุทธิ์ตรึงเอนไซม์โดยใช้กะลามะพร้าว (35 กรัม) ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลาย 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และสารละลาย 1 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก (HCl) และเม็ดเซลลูโลส (16 กรัม) เป็นวัสดุในการตรึงเอนไซม์ กะลามะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพสามารถตรึงเอนไซม์แลคเคสได้ 3.86 mU/g ขณะที่เม็ดเซลลูโลสตรึงเอนไซม์แลคเคสได้ 26.13 mU/g (วิธีการปรับสภาพตัวกลางและการตรึงเอนไซม์แสดงในภาคผนวก ก) เมื่อทำการตรึงเอนไซม์แล้วบรรจุตัวกลางในคอลัมน์เพื่อทำการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ที่ความเข้มข้น 50 ppm ในน้ำเสียสังเคราะห์ 100 มิลลิลิตร

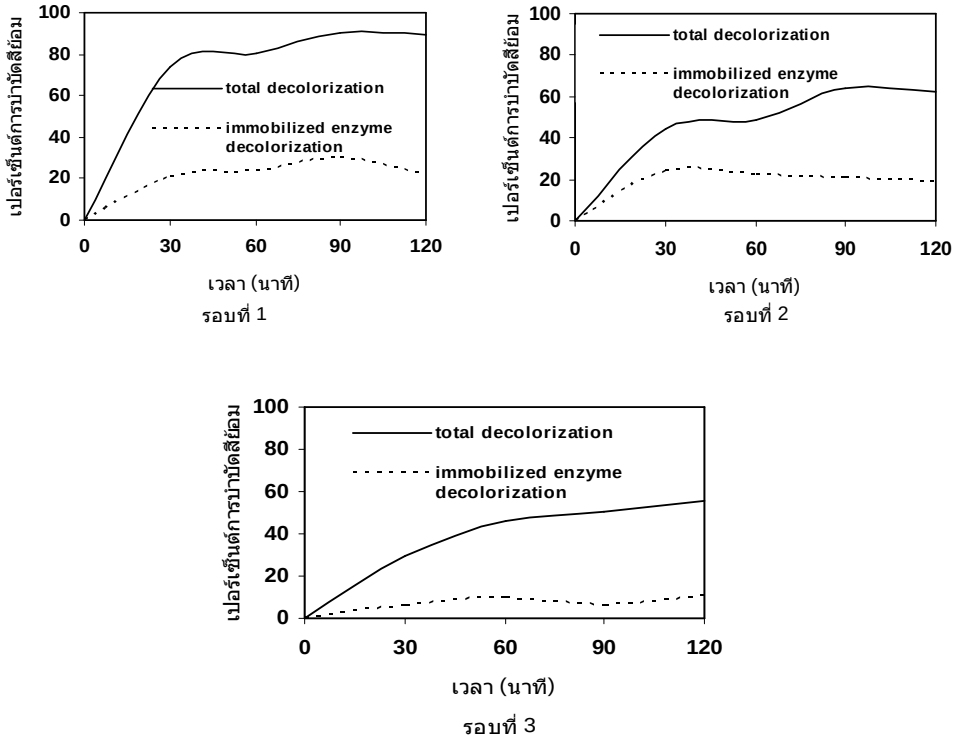
ผลการทดลองพบว่าการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 เกิดขึ้นจากทั้งกลไกการดูดซับของวัสดุที่นำมาตรึงและผลจากเอนไซม์แลคเคสที่ถูกตรึง ผลการบำบัดสีย้อมด้วยกะลามะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพแสดงดังภาพที่ 19 และผลการบำบัดสีย้อมด้วยเม็ดเซลลูโลสแสดงดังภาพที่ 20



ภาพที่ 19 การบำบัดสี Reactive Black 5 (50 ppm) ด้วยเอนไซม์แลคเคสที่ตรึงด้วยกะลามะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพ

จากภาพที่ 19 พบว่าประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อมรวม (total decolorization) ในรอบที่ 1 สามารถบำบัดสีย้อมได้สูงสุด 84.75 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 60 นาที ขณะที่ประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อมรวมในรอบที่สองลดลง โดยบำบัดได้ 48.09 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 60 นาที ในส่วนการ

บำบัดสีย้อมจากเอนไซม์แลคเคสที่ถูกตรึงด้วยกะลามะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพนั้น ประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อมในรอบที่ 1 และรอบที่ 2 สามารถบำบัดได้สูงสุดประมาณ 11.69 และ 19.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 20 การบำบัดสี Reactive Black 5 (50 ppm) ด้วยเอนไซม์แลคเคสที่ตรึงด้วยเม็ดเซลลูโลส

จากภาพที่ 20 พบว่าประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อมรวม (total decolorization) ในรอบที่ 1 สามารถบำบัดสีย้อมได้สูงสุด 89.98 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 90 นาที ขณะที่ประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อมรวมในรอบที่ 2 และ 3 ลดลง โดยบำบัดได้ 64.46 และ 50.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 90 นาที ในส่วนการบำบัดสีย้อมจากเอนไซม์แลคเคสที่ถูกตรึงด้วยเม็ดเซลลูโลสนั้น ประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อมในรอบที่ 1 รอบที่ 2 และรอบที่ 3 สามารถบำบัดได้สูงสุดประมาณ 30.15 23.61 และ 10.62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การที่วัสดุตัวกลางดูดซับสีย้อมได้เนื่องจากผิวของตัวกลางมีรูพรุนและมีพื้นที่ผิวในการสัมผัสสีย้อม (Cao *et al*., 2006) ประจุบวกบนพื้นผิวของตัวกลางที่เกิดขึ้นจึงสามารถดูดซับสีย้อมซึ่งมีประจุลบได้ (Orfao *et al*., 2006) ผลของการดูดซับสีย้อมลดลงในแต่ละรอบของการทดลอง

เนื่องจากผิวของตัวกลางมีการดูดซับสีย้อมในการทดลองรอบแรกแล้วทำให้พื้นที่ผิวที่สามารถดูดซับสีย้อมจึงลดลงและอาจเกิดการอิ่มตัว การบำบัดสีย้อมในรอบที่ 2 หรือรอบต่อๆไปจึงลดลง

ผลของการบำบัดสีย้อมด้วยเอนไซม์แลคเคสที่ถูกตรึงด้วยเม็ดเซลลูโลสสามารถบำบัดสีย้อมได้ดีกว่ากะลามะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพนั้น เนื่องมาจากเม็ดเซลลูโลสสามารถตรึงเอนไซม์แลคเคส (26.14 mU/g) ได้ดีกว่ากะลามะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพ (3.86 mU/g) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการตรึงเอนไซม์แลคเคสบนตัวกลางสามารถบำบัดสีย้อมได้ดีกว่าการใช้สารละลายเอนไซม์แลคเคส เนื่องจากใช้ปริมาณเอนไซม์แลคเคสน้อยกว่าทั้งการตรึงด้วยกะลามะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพ (ค่ากิจกรรมเอนไซม์รวม 135 mU) และการตรึงด้วยเม็ดเซลลูโลส (ค่ากิจกรรมเอนไซม์รวม 418 mU) เมื่อเทียบกับสารละลายเอนไซม์แลคเคสเพียงอย่างเดียว (ค่ากิจกรรมเอนไซม์รวม 750 mU) อีกทั้งข้อได้เปรียบด้านระยะเวลาการบำบัดสีย้อมที่น้อยกว่าและสามารถใช้ซ้ำติดต่อกัน ซึ่งการใช้เอนไซม์แลคเคสที่ตรึงบนตัวกลางในระบบ packed-bed reactor เพื่อบำบัดสีย้อมควรพิจารณาถึงปัจจัยของ ชนิด ความสูง พื้นที่ผิว และความหนาแน่นของตัวกลางที่นำมาใช้ อัตราการไหลของน้ำเสีย รวมถึงชนิดของเอนไซม์ วิธีการตรึงเอนไซม์ (Peralta-Zamora *et al*., 2003) เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพในการบำบัดสีย้อมในน้ำเสียดีที่สุด

สรุป

การใช้สารละลาย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 7 สกัดก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดที่อัตราส่วนของน้ำหนักก้อนอาหารต่อสารละลายสกัด 1 : 2 (15 กรัม/30 มิลลิลิตร) ที่ระยะเวลา 3 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ลิกนิโนไลติกจากก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดที่หมดระยะเวลาการเก็บผลผลิตจำนวน 5 ชนิด คือ เห็ดนางฟ้าภูฏาน (*Pleurotus sajor-caju*) เห็ดนางรมฮังการี (*Pleurotus ostreatus*) เห็ดยานางิ (*Agrocybe cylindracea*) เห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus*) และ เห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) พบว่าก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ชนิด ส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์แลคเคสได้มากกว่าเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสโดยกลุ่มเห็ดราแต่ละชนิดจะผลิตเอนไซม์ลิกนิโนไลติกแตกต่างกัน *P. ostreatus* ผลิตเอนไซม์แลคเคสได้สูงสุด (367.04 $\pm$ 1.26 mU/g) รองลงมาคือ *P. sajor-caju* (210.73 $\pm$ 0.90 mU/g) จากนั้นเลือกก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดทั้ง 2 ชนิดนี้ทดสอบความสามารถในการบำบัดสีย้อมด้วยสารละลายเอนไซม์แลคเคสต่อไป

สารละลายเอนไซม์แลคเคสจากการสกัดก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อ *P. ostreatus* และ *P. sajor-caju* สามารถบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ที่ความเข้มข้น 50 ppm ในน้ำเสียสังเคราะห์ 100 มิลลิลิตร ในระยะเวลา 72 ชั่วโมงได้ 68.86 $\pm$ 0.27 เปอร์เซ็นต์ และ 48.48 $\pm$ 0.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่ค่ากิจกรรมเอนไซม์ (enzyme activity) 750 mU จากนั้นใช้สารละลายเอนไซม์แลคเคสค่า enzyme activity 750 mU บำบัดสีย้อม Reactive Red 198 และ Reactive Yellow 176 ที่ความเข้มข้น 50 ppm ในน้ำเสียสังเคราะห์ 100 มิลลิลิตร ในระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าสามารถบำบัดสีย้อม Reactive Red 198 ได้ 19.63 $\pm$ 1.66 เปอร์เซ็นต์และบำบัดสีย้อม Reactive Yellow 176 ได้ 9.99 $\pm$ 1.96 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาผลของสาร violuric acid ซึ่งเป็นสารมีเดียเตอร์ต่อประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อม โดยใช้ violuric acid ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ร่วมกับสารละลายเอนไซม์แลคเคสในการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 พบว่าประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อมเพิ่มขึ้นเป็น 74.61 $\pm$ 0.93 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การบำบัดสีย้อมด้วยสารละลายเอนไซม์แลคเคสอย่างเดียวสามารถบำบัดได้ 6.05 $\pm$ 0.35 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 6 ชั่วโมง นอกจากนี้เกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แลคเคส ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลาย NaCl 100 มิลลิโมลาร์ ทำให้ประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ลดลงเหลือ 2.33 $\pm$ 0.10 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ที่ความเข้มข้น 50 ppm ในน้ำเสียสังเคราะห์ 100 มิลลิลิตร ด้วยเอนไซม์แลคเคสที่ตรึงบนตัวกลางในระบบชั้นตัวกลางอัดบรรจุ (packed-bed reactor) ระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อมรวม (total decolorization) ของเอนไซม์แลคเคสที่ตรึงด้วยกะลามะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยสารละลาย 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และสารละลาย 1 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก สามารถบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ได้ 84.75 และ 48.09 เปอร์เซ็นต์ ในรอบที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ในเวลา 60 นาที โดยประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อมจากเอนไซม์ที่ถูกตรึงเป็น 11.69 และ 19.73 เปอร์เซ็นต์ ในรอบที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ขณะที่ประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อมรวมของเอนไซม์แลคเคสที่ถูกตรึงด้วยเม็ดเซลลูโลสสามารถบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ได้สูงสุด 89.98 เปอร์เซ็นต์ ในรอบที่ 1 ในเวลา 90 นาที และประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อมจากเอนไซม์ที่ถูกตรึงเป็น 30.15 23.61 และ 10.62 เปอร์เซ็นต์ ในรอบที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการบำบัดสีย้อมด้วยการตรึงเอนไซม์แลคเคสบนตัวกลางสามารถบำบัดได้ดีกว่าการใช้สารละลายเอนไซม์แลคเคสในระยะเวลาการบำบัดสีย้อมที่น้อยกว่าและสามารถใช้ซ้ำติดต่อกัน

จากการวิจัยทั้งหมดนี้มีความเป็นไปได้ในด้านการใช้ประโยชน์ก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดที่หมดระยะเวลาการเก็บผลผลิตในการสกัดเอนไซม์ลิกนิโนไลติกโดยควรเลือกก้อนอาหารที่หมดระยะการเก็บดอกเห็ดแล้วที่ช่วงเวลาเดียวกันเพื่อให้ปริมาณเอนไซม์ที่สกัดได้มีความแน่นอนและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในรูปของสารละลายเอนไซม์หรือเอนไซม์ที่ตรึงบนตัวกลางได้ การนำไปปรับใช้ในอุตสาหกรรมควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับคุณลักษณะน้ำเสียและกลุ่มเห็ดราที่สามารถให้เอนไซม์ลิกนิโนไลติกปริมาณสูงรวมทั้งการตรึงเอนไซม์บนตัวกลางที่เหมาะสมต่อไปเพื่อให้การบำบัดสีย้อมในน้ำเสียเกิดประสิทธิภาพดีที่สุด

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

จารุวรรณ สนมวัฒนะวงศ์. 2548. **เอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลสในเห็ดนางรม *Pleurotus ostreatus* 10.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชาญยุทธ์ ภาณุฑัต, จำนง อุทัยบุตร และ นงนุช แตงทรัพย์. 2545. **โครงการพัฒนาการผลิตเห็ดครบวงจร.** สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

ประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3. 2539. **เรื่องกำหนดมาตฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากแหล่งกำเนิดประเภทโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม.**

ปวีณา ธนะสังข์. 2539. **การกำจัดสีจากน้ำทิ้งฟอกย้อมสิ่งทอโดยวิธีออกซิเดชั่น-รีดักชั่น.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2521. **การผลิตและการใช้ immobilized enzyme.** พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศศิธร จินตนาสุนทรศิริ. 2549. **การบำบัดสีย้อมในน้ำเสียอุตสาหกรรมสิ่งทอโดยระบบโปรยกรองด้วยเห็ดนางรม *Pleurotus ostreatus.*** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2530. **มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมสีย้อม.** มอก. 739-2530.

Abadulla, E., T. Tzanov. S. Costa, K. H. Robra, A. C. Paulo and G.M. Gubitz. 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsute.* **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 3357-3362.

Armagan, B., M. Turan and M. S. Celik. 2004. Equilibrium studies on the adsorption of reactive azo dyes into zeolite. **Desalination** 170: 33-39.

Ball, A. S. and A. M. Jackson. 1995. The recovery of lignocellulose-degrading enzymes from spent mushroom compost. **Bioresource Technol.** 54: 311-314.

Banat, M., P. Nigam, D. Singh and R. Marchant. 1996. Microbial decolorization of textile dyes-containing effluent: a review. **Bioresource Technol.** 58: 179-196.

Bickerstaff, G. F. 1997. **Immobilized of Enzymes and Cells.** Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.

Breen, A. and F. L. Singleton. 1999. Fungi in lignocellulose breakdown and biopluping. **Curr. Biotechol. Adv.** 15: 583-620.

Bukh, C., M. Lund and M. J. Bjerrum. 2006. Kinetic studies on the reaction between *Trametes villosa* laccase and dioxygen. **J. Inorg. Biochem.** 100: 1547-1557.

Camarero, S., D. Ibara, M. J. Martinez and A. T. Martinez. 2004. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. **Appl. Environ. Microbiol.** 71: 1775-1784.

Cao, Q., K. Xie, Y. K. Lv and W. R. Bao. 2006. Process effects on activated carbon with large specific surface area from corn cob. **Bioresource Technol.** 97: 110-115.

Chagas, E. P. and L. R. Durrant. 2001. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajor-caju*. **Enzyme Microb. Technol.** 29: 473-477.

Chang, S. T. 1999. World production of cultivated edible and medicinal mushroom in 1997 with emphasis on Lentinus edodes. (Berk). **Int. J. Medicinal Mushroom** 1: 291-300.

Chiu, S. W., S. C. Law, M. L. Chig, K. W. Cheung and M. J. Chen. 2000. Themes for mushroom exploitation in the 21st century: sustainability, waste management and conservation. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 46: 269-282.

Chivukula, M. and V. Renganathan. 1995. Phenolic azo dye oxidation by laccase from Pyricularia oryzae. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 4374-4377.

Couto, S. R. and J. L. T. Herrera. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. **Biotechnol. Adv.** 24: 500-513.

Couto, S. R. and M. A. Sanroman. 2007. The effect of violuric acid on the decolorization of recalcitrant dyes by laccase from *Trametes hirsute.* **Dyes Pigments** 74: 123-126.

Criquet, S., S. Tagger, G. Vogt, G. Iacazio and J. L. Petit. 1999. Laccase activity of forest litter. **Soil Biol. Biochem.** 31: 1239-1244.

Duran, N., M. A. Rosa, A. D'Annible and L. Gianfreda. 2002. Application of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized in different supports: a review. **Enzyme Microb. Technol.** 31: 907-931.

Eichlerova, I., L. Homolka and F. Nerud. 2006. Ability of industrial dyes decolorization and ligninolytic enzymes production by different *Pleurotus* species with special attention on *Pleurotus calyptratus*, strain CCBAS 461. **Process Biochem.** 41: 941-946.

Farnet, A. M., G. Gil and E. Ferre. 2008. Effects of pollutants on laccase activites of *Marasmius quercophilus*, a white-rot fungus isolated from a Mediterranean schlerophyllous litter. **Chemosphere** 70: 895-900.

Fu, Y. and T. Viraraghavan. 2001. Fungal decolorization of dye wastewater: a review. **Bioresource Technol.** 79: 251-262.

Glenn, J. K. and M. H. Gold. 1983. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium.* **Appl. Environ. Microbiol.** 45: 1741-1747.

Howard, R. L., E. L. Jansen van Renabury and S. Howard. 2003. Lignocellulose biotechnology: Issue of bioconversion and enzymes production. **African J. Biotechnol.** 2: 602-619.

Hublik, G. and F. Schinner. 2000. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. **Enzyme Microb. Technol.** 27: 330-336.

Jaroz-Wilkolazka, A., J. Kochmanska-Rdest, E. Malarczyk, W. Wardas and A. Leonowicz. 2002. Fungi and their ability to decolourize azo and anthraquinonic dyes. **Enzyme Microb. Technol.** 30: 566-572.

Junghanns, C., G. Krauss and D. Schlosser. 2008. Potential of aquatic fungi derived from freshwater environments to decolourise synthetic azo and anthraquinone dyes. **Bioresource Technol.** 99: 1225–1235.

Kim, Y. J. and J. A. Nicell. 2006. Impact of reaction conditions on the laccase-catalyzed conversion of bisphenol. **Bioresource Technol.** 97: 1431–1442.

Lau, K. L., Y. Y. Tsang and S. W. Chiu. 2003. Use of spent mushroom compost to bioremediate PAH-contaminated samples. **Chemosphere** 52: 1539-1546.

Liers, C., R. Ullrich, M. Pecyna, D. Schlosser and M. Hofrichter. 2007. Production, purification and partial enzymatic and molecular characterization of a laccase from the wood-rotting ascomycete *Xylaria polymorpha*. **Enzyme Microb. Technol.** 41: 1785-1793.

Lourenco, N. D., J. M. Novis and H. M. Pinheiro. 2000. Reactive textile dye color removal in a sequencing batch reactor. **Water Sci. Technol.** 42(5-6): 321-328.

Lucas, M. S., C. Amaral, A. Sampaio, J. A. Peres and A. A. Dias. 2006. Biodegradation of the diazo dye reactive black 5 by a wild isolate of Candida oleophila. **Enzyme Microb. Technol.** 39: 51-55.

Maximo, C., M. T. P. Amorim and M. Costa-Ferreira. 2003. Biotransformation of industrial reactive azo dyes by *Geotricum* sp. CCMI 1019. **Enzyme Microb. Technol.** 32: 145-151.

McMullan, G., C. Meehan, A. Conneely, N. Kirby, T. Robinson and P. Nigam. 2001. Mini review: microbial decolourisation and degradation of textile dyes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 56: 81-87.

Murugesan, K., I. H. Nam, Y. M. Kim and Y. S. Chang. 2007. Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. **Enzyme Microb. Technol.** 40: 1662-1672.

Naki, A. and S. D. Varfolomeyev. 1981. Mechanism of the inhibition of laccase activity from *Polyporus versicolor* by halide-ions. **Biokhimiia.** 46 : 1694–1702.

Nannipieri, P., B. Ceccanti, S. Cervelli and E. Matarese. 1980. Extraction of phosphatase, urease, proteases, organic carbon and nitrogen from soil. **Soil Sci. Soc. AM. J.** 44: 1011-1016.

Orfao, J. J. M., A. I. M. Silva, J. C. V. Pereira, S. A. Baretta, I. M. Fonseca and P. C. C. Faria. 2006. Adsorption of a reactive dye on chemically modified activated carbons-influence of pH. **J. Colloid Interface Sci.** 296: 480-489.

Peralta-Zamora, P., C. M. Pereira, E. R. L. Tiburtius, S. G. Moraes, M. A. Rosa, R. C. Minussi and N. Duran. 2003. Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. **Appl. Catal., B:** Environmental 42: 131-144.

Pierce, J. 1994. Colour in textile effluents-the origin of the problem. **J. Soc. Dyers Colour** 110: 131-134.

Piontek, K., M. Antorinis and T. Choinowski. 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-A° resolution containing a full complement of coppers. **J. Biol. Chem.** 277: 37663-37669.

Pricelius, S., C. Held, S. Sollner, S. Deller, M. Murkovic, R. Ullrich, M. Hofricher, A. Cavaco-Paulo, P. Macheroux and G. M. Guebitz. 2007. Enzymatic reduction and oxidation of fibre-bound azo-dyes. **Enzyme Microb. Technol.** 40: 1732-1738.

Renganathan, V. and M. H. Gold. 1986. Spectral characterization of the oxidized states of lignin peroxidase, an extracellular heme enzyme from the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemistry** 25: 1626-1631**.**

Robinson, T., B. Chandran and P. Nigam. 2001. Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolorization of textile dyes. **Enzyme Microb. Technol.** 29: 575-579.

Rodriguez, E., O. Nuero, F. Guillen, A. T. Martinez and M. J. Martinez. 2004. Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. **Soil Biol. Biochem.** 36: 909-916.

Rosconi, F., L. F. Fraguas, G. Martinez-Drets, S. Castro-Sowinski. 2005. Purification and characterization of a periplasmic laccase produced by Sinorhizobium meliloti. **Enzyme Microb. Technol.** 36: 800-807.

Shleev, S., P. Persson, G. Shumakovich, Y. Mazhugo, A. Yaropolov, T. ruzgas and L. Gorton. 2006. Interaction of fungal laccase and laccase-mediator systems with lignin. **Enzyme Microb. Technol.** 39: 841-847.

Soares, G. M. B., M. T. P. Amorim, R. Hrdina and M. Costa-Ferreira. 2002. Studies on the biotransformation of novel diazo dyes by laccase. **Process Biochem.** 37: 581-587.

Trejo-Hernandez, M.R., A. Lopez-Munguia and R. Q. Ramirez. 2001. Residual compost of *Agaricus bisporus* as a source of crude laccase for enzymic oxidation of phenolic compounds. **Process Biochem.** 36: 635-639.

Ullrich R., M. H. Le, N. L. Dung and M. Hofrichter. 2005. Laccase from the medicinal mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization. **Appl Microbiol. Biotechnol.** 67: 357–363.

Wesenberg, D., I. Kyriakides and S. N. Agathos. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnol. Advances** 22: 161-187.

Wong, Y. and J. Yu. 1999. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. **Water Res.** 33: 3512-3520.

Zhen, Z. and J. Yu. 1998. Stress on immobilized *Phanerochaete chrysosporium* hyphae in submerge cultures for ligninase production. **J. Chem. Eng.** 76: 784-789.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สารเคมี

สารเคมี

1. สารเคมีสำหรับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์

1.1 การเตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

1.1.1 สารละลายกรดอะซิติก เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (สารละลาย x)

สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 5.8 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

1.1.2 สารละลายโซเดียมอะซิเตท เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (สารละลาย y)

ชั่งโซเดียมอะซิเตท 13.608 กรัม ละลายในน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

1.1.3 การเตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ที่พีเอชต่างๆ

ผสมสารละลาย x และ y ให้มีปริมาตรตามที่แสดงในตารางผนวกที่ ก1 แล้วนำไปปรับพีเอชตามที่ต้องการจากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ก1 ปริมาณสารละลาย x และ y ที่ใช้ผสมเพื่อปรับพีเอชสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์

พีเอช	สารละลาย x (มิลลิลิตร)	สารละลาย y (มิลลิลิตร)
4.2	36.8	13.2
4.4	30.5	19.5
4.6	25.5	24.5
4.8	20.0	30.0
5.0	14.8	35.2
5.2	10.5	39.5
5.4	8.8	41.2
5.6	4.8	45.2

1.2 การเตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

1.2.1 สารละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (สารละลาย x)

ชั่งโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 13.80 กรัม ละลายในน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

1.2.2 สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (สารละลาย y)

ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 14.19 กรัม ละลายในน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

1.2.3 การเตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่พีเอชต่างๆ

ผสมสารละลาย x และ y ให้มีปริมาตรตามที่แสดงในตารางผนวกที่ ก 2 แล้วนำไปปรับพีเอชตามที่ต้องการจากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ก2 ปริมาณสารละลาย x และ y ที่ใช้ผสมเพื่อปรับพีเอชสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

พีเอช	สารละลาย x (มิลลิลิตร)	สารละลาย y (มิลลิลิตร)
5.8	92.0	8.0
6.0	87.7	12.3
6.2	81.5	18.5
6.4	73.5	26.5
6.6	62.5	37.5
6.8	51.0	49.0
7.0	39.0	61.0
7.2	28.0	72.0
7.4	19.0	81.0
7.6	13.0	87.0
7.8	8.5	91.5
8.0	5.3	94.7

1.3 การเตรียมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

ชั่งแคลเซียมคลอไรด์ 2.22 กรัม ละลายในน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

2.1 การเตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1โมลาร์ ที่พีเอช 4.5

2.1.1 สารละลายกรดอะซิติก เข้มข้น 0.2 โมลาร์ (สารละลาย x)

สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 11.6 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2.1.2 สารละลายโซเดียมอะซิเตท เข้มข้น 0.2 โมลาร์ (สารละลาย y)

ชั่งโซเดียมอะซิเตท 27.216 กรัม ละลายในน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2.1.3 การเตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ที่พีเอช 4.5

ผสมสารละลาย x และ y ให้มีปริมาตรตามที่แสดงในตารางผนวกที่ ก1 แล้วนำไปปรับพีเอชที 4.5 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2.2 การเตรียมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์

สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ 1.03 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2.3 การเตรียมสารละลายแมงกานีสซัลเฟต ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

ชั่งแคลเซียมคลอไรด์ 0.015 กรัม ละลายในน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2.4 การใส่สารเคมีต่างๆในคิวเวตต์เพื่อวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ด้วยเครื่องยูวี/วิสิเบิลสเปคโตรโฟมิเตอร์ รุ่น GBC 932 ที่ความยาวคลื่น 496 นาโนเมตร

2.4.1 เอนไซม์แลคเคส ใส่ น้ำกลั่น 1.25 มิลลิลิตร โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่พีเอช 4.5 0.5 มิลลิลิตร สารละลาย 2, 6-ไดเมทอกซีฟีนอล 0.25 มิลลิลิตร และตัวอย่างที่วิเคราะห์ 0.5 มิลลิลิตร

2.4.2 เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ใส่ น้ำกลั่น 0.75 มิลลิลิตร โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่พีเอช 4.5 0.5 มิลลิลิตร สารละลายแมงกานีสซัลเฟต ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ 0.25 มิลลิลิตร สารละลาย 2, 6-ไดเมทอกซีฟีนอล 0.25 มิลลิลิตร ตัวอย่างที่วิเคราะห์ 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ 0.25 มิลลิลิตร

3. สารเคมีสำหรับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการบำบัดสีย้อมโดยใช้สารละลายเอนไซม์

3.1 การเตรียมสารละลายสีย้อมความเข้มข้น 500 ppm ของสีย้อม Reactive Black 5 Reactive Red 198 และ Reactive Yellow 176

ชั่งสีย้อมแต่ละชนิด 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้นเมื่อต้องการทำการทดลองใช้สีย้อมแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 50 ppm จึงทำการเจือจางต่อไป

3.2 การเตรียมสารละลายกรดไวโอรูลิก ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์

ชั่งกรดไวโอรูลิก 1.571 กรัม ละลายในน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเมื่อต้องการทำการทดลองใช้สารละลายกรดไวโอรูลิกที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิโมลาร์ จึงทำการเจือจางต่อไป

3.3 การเตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 2.925 กรัม ละลายในน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเมื่อต้องการทำการทดลองใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 30 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ จึงทำการเจือจางต่อไป

4. การเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร

4.1 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อ

4.1.1 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Potato Dextrose Agar ประมาณ 14 วัน จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง (Solid State Fermentation) ต่อไป

4.1.2 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง (Solid State Fermentation) ในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร 20 ขวด โดยใช้รำข้าว ประมาณ 20 กรัม/ขวด ใส่ 2 % กลูโคส 0.8 กรัม และ yeast extracted 5 กรัม และคอปเปอร์ซัลเฟต 0.2 กรัม ละลายรวมกันในน้ำกลั่นคนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้นเทใส่ขวดรูปชมพู่ประมาณ 50 มิลลิลิตร/ขวด เพื่อปรับความชื้น 70 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการเลี้ยงเชื้อประมาณ 2 อาทิตย์แล้วนำไปสกัดเอนไซม์ต่อไป

5. สารเคมีสำหรับการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

5.1 การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

5.2 การเตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 5.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

5.3 การเตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.01โมลาร์ ที่พีเอช 6.0

5.3.1 สารละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0.01 โมลาร์ (สารละลาย x)

ชั่งโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.380 กรัม ละลายในน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

5.3.2 สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0.01 โมลาร์ (สารละลาย y)

ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.419 กรัม ละลายในน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

5.3.3 การเตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่พีเอช 6.0

ผสมสารละลาย x และ y ให้มีปริมาตรตามที่แสดงในตารางผนวกที่ ก2 แล้วนำไปปรับพีเอชที่ 6.0 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

5.4 ขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

5.4.1 หลังจากสกัดเอนไซม์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง ด้วยสภาวะที่เหมาะสม จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบางเอาส่วนที่เป็นน้ำนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และแยกเอาส่วนน้ำใสที่ได้ไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เกิดขึ้น จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ไปทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้น โดยใส่สารละลายเอนไซม์ในไดอะไลซิสทิวป์ โรยผงโพลีเอทิลีนไกลคอลให้ทั่วและใส่น้ำแข็งทิ้งไว้ค้างคืนและใส่ในตู้เย็น

5.4.2 หลังจากผ่านขั้นตอน 5.4.1 นำเอนไซม์ไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เกิดขึ้น จากนั้นถ่ายลงบีกเกอร์ เติมแอมโมเนียมซัลเฟตประมาณ 260 กรัม ให้ละลายอิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ ทำการคนด้วย magnetic bar และใส่น้ำแข็งรอบบีกเกอร์ตลอดระยะเวลาการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต หลังจากเติมแอมโมเนียมซัลเฟตจนอิ่มตัวแล้ว แช่ตู้เย็นค้างคืนแล้วนำไปเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และเทส่วนน้ำใสทิ้ง นำตะกอนมาละลายด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.01โมลาร์ ที่พีเอช 6.0 จากนั้นนำไปวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้

5.4.3 หลังจากผ่านขั้นตอน 5.4.2 ทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Gel filtration ในคอลัมน์ โดยล้างเจลด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ และสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ประมาณ 2 ครั้ง จากนั้นแพ็คเจลที่ผสมในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่อยๆเททีละนิดเพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศและตรวจสอบการรั่วไหลของเจล เมื่อใส่เจลในคอลัมน์จนระดับสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์อยู่เหนือระดับของเจลประมาณ 1 เซนติเมตร ให้ใส่เอนไซม์ลงในคอลัมน์ต่อไป หลังจากใส่เอนไซม์จนหมดให้ชะด้วยสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และขั้นสุดท้ายทำการชะด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ ผสมกับสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์จนสารละลายที่ผ่านออกมาไม่มีสีคงที่ โดยขั้นตอนนี้ทำการเก็บตัวอย่างสาร ละลายเอนไซม์ที่ผ่านจากคอลัมน์ โดยเก็บตัวอย่างครั้งละประมาณ 10 มิลลิลิตรและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

6. การปรับสภาพตัวกลางและการตรึงเอนไซม์บนตัวกลาง

6.1 ขั้นตอนการปรับสภาพตัวกลาง

ทำการทดลองโดยใช้กะลามะพร้าวที่อบแห้งและทุบให้ละเอียดขนาด 0.5-1 เซนติเมตร นำมาปรับสภาพโดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ในขั้นตอนการปรับสภาพใช้กะลา มะพร้าวประมาณ 35 กรัม แช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกประมาณ 200 มิลลิลิตร นำไปเขย่าประมาณ 30 นาที และตั้งทิ้งไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้ค่าพีเอช คงที่อยู่ในช่วง 6-8 หลังจากนั้นนำมาปรับสภาพต่อด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยทำการทดลองเหมือนกับที่ปรับสภาพด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก นำไปเขย่าประมาณ 30 นาที และตั้งทิ้งไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้ค่าพีเอชคงที่อยู่ในช่วง 6-8

6.2 ขั้นตอนการตรึงเอนไซม์บนตัวกลาง

ขั้นตอนนี้ใช้ตัวกลาง 2 ชนิด คือ กะลามะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพ 35 กรัมและเม็ดเซลลูโลส(ไม่ได้ปรับสภาพ) 16 กรัม โดยนำวัสดุตัวกลางทั้ง 2 ชนิดนี้แช่ใน 3% (v/v) aminopropyl triethoxy silane ที่ละลายใน acetone ที่ อุณหภูมิ 50 °C ประมาณ 24 ชั่วโมงและล้างด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นนำไปแช่ใน 2.5 % (v/v) glutaric dialdehyde ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น และทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำมาแช่ในเอนไซม์บริสุทธิ์เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ลดลงดูอัตราการ immobilized enzyme ที่เกิดขึ้น

ภาคผนวก ข

ข้อมูลจากการทดลอง

ตารางผนวกที่ ข1 ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสที่เกิดขึ้นในแต่ละอัตราส่วนของน้ำหนักก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus*) กับสารละลายสกัด 50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ ที่ pH 5.6

อัตราส่วนน้ำหนักก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ด/สารละลายสกัด (กรัมต่อมิลลิลิตร)	3 ช.ม. Enzyme activity (mU/g)	6 ช.ม. Enzyme activity (mU/g)
15 : 30	62.28 $\pm$ 1.47	41.34 $\pm$ 0.27
15 : 45	56.49 $\pm$ 0.71	31.06 $\pm$ 0.55
15 : 60	33.78 $\pm$ 1.59	29.12 $\pm$ 0.84

ตารางผนวกที่ ข2 ค่ากิจกรรมเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่เกิดขึ้นในแต่ละอัตราส่วนของน้ำหนักก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus*) กับสารละลายสกัด 50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ ที่ pH 5.6

อัตราส่วนน้ำหนักก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ด/สารละลายสกัด (กรัมต่อมิลลิลิตร)	3 ช.ม. enzyme activity (mU/g)	6 ช.ม. enzyme activity (mU/g)
15 : 30	13.97 $\pm$ 1.56	1.75 $\pm$ 0.28
15 : 45	13.10 $\pm$ 1.86	1.84 $\pm$ 0.50
15 : 60	12.30 $\pm$ 3.60	2.33 $\pm$ 0.64

ตารางผนวกที่ ข3 ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและแมงกาแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในแต่ละชนิดสารละลายสกัด

ชนิดของสารละลายสกัด	ชนิดเอนไซม์	
	แลคเคส	แมงกาแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส
	activity (mU/g)	activity (mU/g)
0.2 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์	2.98 $\pm$ 0.56	0.71 $\pm$ 0.49
0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 7	81.14 $\pm$ 0.42	21.29 $\pm$ 1.59
50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ ที่ pH 5.6	64.51 $\pm$ 1.54	12.55 $\pm$ 2.54

ตารางผนวกที่ ข4 ค่ากิจกรรมเอนไซม์แลคเคสและแมงกาแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในแต่ละชนิดของก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ด

ชนิดของก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ด	ชนิดเอนไซม์	
	แลคเคส	แมงกาแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส
	activity (mU/g)	activity (mU/g)
เห็ดยานางิ (*Agrocybe cylindracea*)	4.43 $\pm$ 0.29	3.72 $\pm$ 0.48
เห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus*)	71.63 $\pm$ 2.96	17.28 $\pm$ 0.48
เห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*)	15.88 $\pm$ 0.42	48.73 $\pm$ 3.07

ตารางผนวกที่ ข4 (ต่อ)

ชนิดของก้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ด	ชนิดเอนไซม์	
	แลคเคส	แมงกาแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส
	activity (mU/g)	activity (mU/g)
เห็ดนางฟ้าภูฏาน (*Pleurotus sajor-caju*)	210.73 ± 0.90	38.70 ± 1.70
เห็ดนางรมฮังการี (*Pleurotus ostreatus*)	367.04 ± 1.26	ไม่พบ

ตารางผนวกที่ ข5 ประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 (50 ppm) ที่ค่ากิจกรรมต่างๆ ของสารละลายเอนไซม์แลคเคสที่สกัดจาก *Pleurotus sajor-caju*

% การบำบัดสีย้อมที่ระยะเวลาต่างๆ/ค่ากิจกรรมเอนไซม์	24 ชั่วโมง (เปอร์เซ็นต์)	48 ชั่วโมง (เปอร์เซ็นต์)	72 ชั่วโมง (เปอร์เซ็นต์)
250 mU	5.06 ± 0.23	8.84 ± 0.57	12.96 ± 0.18
500 mU	5.06 ± 0.75	20.48 ± 1.46	26.61 ± 1.11
750 mU	37.69 ± 0.43	46.24 ± 0.66	48.48 ± 0.39

ตารางผนวกที่ ข6 ประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ความเข้มข้น 50 ppm ที่ค่ากิจกรรมต่างๆของสารละลายเอนไซม์แลคเคสที่สกัดจาก *Pleurotus ostreatus*

% การบำบัดสีย้อมที่ระยะเวลาต่างๆ/ค่ากิจกรรมเอนไซม์	24 ชั่วโมง (เปอร์เซ็นต์)	48 ชั่วโมง (เปอร์เซ็นต์)	72 ชั่วโมง (เปอร์เซ็นต์)
250 mU	29.63 ± 0.94	42.83 ± 0.35	49.47 ± 0.29
500 mU	35.56 ± 0.30	49.91 ± 0.25	54.66 ± 0.56
750 mU	42.83 ± 0.21	57.66 ± 0.42	68.86 ± 0.27

ตารางผนวกที่ ข7 ประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อม Reactive Red 198 และ Reactive Yellow 176 ความเข้มข้น 50 ppm ที่ค่ากิจกรรมสารละลายเอนไซม์แลคเคส 750 mU ที่สกัดจาก *Pleurotus ostreatus*

% การบำบัดสีย้อมที่ระยะเวลาต่างๆ/ชนิดสีย้อม	24 ชั่วโมง (เปอร์เซ็นต์)	48 ชั่วโมง (เปอร์เซ็นต์)	72 ชั่วโมง (เปอร์เซ็นต์)
Reactive Red 198	0 ± 0	18.82 ± 2.00	19.63 ± 1.66
Reactive Yellow 176	0 ± 0	5.86 ± 1.27	9.99 ± 1.96

ตารางผนวกที่ ข8 ผลของสารมีเดียเตอร์ (violuric acid) ต่อประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ความเข้มข้น 50 ppm ที่ค่ากิจกรรมสารละลายเอนไซม์แลคเคส 750 mU ที่สกัดจาก *Pleurotus ostreatus*

% การบำบัดสีย้อมที่ระยะเวลาต่างๆ/ ชุดการทดลอง	3 ชั่วโมง (เปอร์เซ็นต์)	6 ชั่วโมง (เปอร์เซ็นต์)
สารละลายเอนไซม์แลคเคสอย่างเดียว ไม่ใส่สาร violuric acid	0 ± 0	6.05 ± 0.35
สารละลายเอนไซม์แลคเคส + 5 mM violuric acid	61.31 ± 0.60	67.72 ± 0.29
สารละลายเอนไซม์แลคเคส + 10 mM violuric acid	70.41 ± 0.28	74.61 ± 0.93

ตารางผนวกที่ ข9 ผลของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อประสิทธิภาพการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ความเข้มข้น 50 ppm ที่ค่ากิจกรรมสารละลายเอนไซม์แลคเคส 750 mU ที่สกัดจาก *Pleurotus ostreatus*

ชุดการทดลอง	% การบำบัดสีย้อมที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง
สารละลายเอนไซม์แลคเคสอย่างเดียว	57.09 $\pm$ 0.74
สารละลายเอนไซม์แลคเคส 750 mU + 30 mM NaCl	15.07 $\pm$ 1.30
สารละลายเอนไซม์แลคเคส 750 mU + 50 mM NaCl	9.56 $\pm$ 0.84
สารละลายเอนไซม์แลคเคส 750 mU + 100 mM NaCl	2.33 $\pm$ 0.10

ตารางผนวกที่ ข10 ผลของการตรึงเอนไซม์แลคเคสที่สกัดจาก *Pleurotus ostreatus* บนตัวกลาง 2 ชนิด

ชนิดตัวกลาง	น้ำหนัก (กรัม)	Enzyme activity ที่ 0 ชั่วโมง (mU)	Enzyme activity ที่ 5 ชั่วโมง(mU)	อัตราการ immobilized (mU/g)
กะลามะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดและด่าง	35	239	104	3.86
เม็ดเซลลูโลส	16	606	188	26.13

ตารางผนวกที่ ข11 ผลของการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ด้วยเอนไซม์แลคเคสที่ตรึงบนตัวกลางกะลามะพร้าวที่ผ่านการปรับสภาพ

รอบที่	เวลา(นาที)	% การบำบัดสีย้อมรวม (การดูดซับ+เอนไซม์)	% การบำบัดสีย้อมด้วยเอนไซม์
1	0	0	0
	30	88.45	ND
	60	84.75	11.17
	90	79.51	ND
	120	83.32	11.69
	150	83.78	13.94
2	0	0	0
	30	28.45	ND
	60	48.09	13.73
	90	40.23	14.32
	120	36.21	11.94
	150	ND	ND

หมายเหตุ ND หมายถึง ไม่ได้ทำการตรวจสอบ

ตารางผนวกที่ ข12 ผลของการบำบัดสีย้อม Reactive Black 5 ด้วยเอนไซม์แลคเคสที่ตรึงบนตัวกลางเม็ดเซลลูโลส

รอบที่	เวลา(นาที)	% การบำบัดสีย้อมรวม (การดูดซับ+เอนไซม์)	% การบำบัดสีย้อมด้วยเอนไซม์
1	0	0	0
	30	73.77	20.96
	60	80.32	23.48
	90	89.98	20.14
	120	89.28	21.71
2	0	0	0
	30	44.39	23.61
	60	48.71	22.35
	90	64.46	20.48
	120	62.52	19.14
3	0	0	0
	30	29.63	9.21
	60	45.76	9.80
	90	50.24	5.70
	120	55.81	14.49

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายอภิญญา บรรลือทรัพย์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 4 ตุลาคม 2524
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2546) สศ.บ. (อาชีวอนามัยและความปลอดภัย) มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช (พ.ศ. 2548)
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2550)