การผลิตเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากผักบุ้งทะเล เพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีสารประกอบฟีนอล

Production of Peroxidase from *Ipomoea pes-caprae* (Linn) Sweet for Removal of Phenol Containing Wastewater

น้อมจิตต์ แก้วไทย[1]

Nomchit Kaewthai[1]

บทคัดย่อ

การผลิตเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากผักบุ้งทะเลเพื่อใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีฟีนอล พบว่า เอนไซม์หยาบที่สกัดโดยใช้น้ำปราศจากอิออนมีกิจกรรม 25.27 ยูนิต/มิลลิลิตร มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 325.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และมีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 0.078 ยูนิตต่อมิลลิกรัม เมื่อตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 60 และทำบริสุทธิ์ต่อด้วยเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.58 และ 10.53 เท่า ตามลำดับ สามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้ร้อยละ 69.18 24.93 ตามลำดับ การทำบริสุทธิ์โดยวิธีเอเควียส ทู-เฟส โดยใช้ระบบที่มีองค์ประกอบของโพลีเอทธิลีนไกลคอล/แอมโมเนียมซัลเฟต/โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 27/6.0/1 น้ำหนัก/ปริมาตร มีสัมประสิทธิ์การแยกส่วนเท่ากับ 0.15 เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2 เท่า และเก็บเกี่ยวเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในส่วนล่างได้ 50.54 ยูนิต/มิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละ 86.52 เมื่อผ่านเจลฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟีเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 23 เท่า เก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้ร้อยละ 72.51 นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มาศึกษาประสิทธิภาพในการบำบัดฟีนอลในน้ำเสีย พบว่า เอนไซม์หยาบมีประสิทธิภาพในการบำบัดฟีนอลในน้ำเสียจำลองที่มีความเข้มข้นของฟีนอล 1,000 ไมโครกรัมต่อลิตร มากที่สุด โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากผักบุ้งทะเลในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานที่มีปริมาณฟีนอล 391 ไมโครกรัมต่อลิตร คือ การทำปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ 0.33 ยูนิตต่อมิลลิลิตร อัตราส่วนระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อสับสเตรต 0.8 พีเอช 7 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยมีประสิทธิภาพการบำบัดฟีนอลร้อยละ 82.34

คำสำคัญ: เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ผักบุ้งทะเล การทำบริสุทธิ์ การบำบัดฟีนอล

Keywords: Peroxidase, *Ipomoea pes-caprae* (Linn) Sweet, Purification, Phenol Removal

[1] คณะเกษตรศาสตร์นครศรีธรรมราช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

[1] Faculty of Agriculture Nakhon Sithammarat, Rajamangala University of Technology Srivijaya

ABSTRACT

Crude peroxidase was. extracted from leaves of *Ipomoea pes-caprae* (Linn), Sweet, using deionized water It was found that the enzyme activity and protein content and specific activity were 25.27 unit/ml, 325.05 mg/ml and 0.078 unit/mg respectively. The enzyme was partially purified by using ammonium sulphate fractionation, and extraction using a polyethylene glycol (PEG)/ammonium sulphate aqueous two-phase system (ATPS). Both partially purified peroxidase were followed by gel filtration on SephadexG-100 column. It was found that peroxidase was precipitated by ammonium sulphate fractionation with 1.85 folds purer than crude enzyme, with a recovery of 69.18%. The enzyme was finally purified about 10.53 folds by gel filtration on Sephadex G-100 column, with a recovery of 24.93%. Variation of phase composition and sodium chloride concentration resulted in the desired reduction in volume of extract and selective partitioning of the enzyme. PEG/ammonium sulphate/sodium chloride (27/6.0/1 w/v) system induced a partition coefficient of 0.15, purification factor of 2 and bottom phase recovery of 86.52%. The enzyme was finally purified about 23 folds by gel filtration on Sephadex G-100 column, with recovery of 72.51%. Crude enzyme and differently purified enzymes were used for investigating the efficiency of the enzymes to remove phenolic compound from synthetic wastewater. The result showed that the highest phenol removal efficiency was obtained from the crude enzyme. Therefore, it could be used to study on optimum reaction for industrial waste water. The optimum molar ratio of hydrogen peroxide to substrate was 0.8, and enzyme dose was 0.33 U/ml. The optimum pH value of 7, temperature 50°C and time course at 4 hours, resulted in phenol removal efficiency of 82.34%.

บทนำ

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีการใช้ในอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง ทั้งในการวินิจฉัยทางการแพทย์ การใช้ประโยชน์ทางด้านอาหาร เครื่องดื่ม เภสัชกรรม ใช้ในการกำจัดสารพิษและสารก่อมะเร็งบางชนิด รวมทั้งการบำบัดน้ำเสียที่มีสารประกอบพวกฟีนอลหรืออนุพันธ์ของฟีนอลซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งจากโรงงานพลาสติกและเรซิน โรงงานสิ่งทอ โรงงานผลิตเยื่อกระดาษ เป็นต้น ทำให้น้ำเสียที่ผ่านกระบวนการบำบัดด้วยเอนไซม์มีความปลอดภัยต่อชุมชนหรือสิ่งแวดล้อม [1-4] ด้วยเหตุดังกล่าวเป็นผลให้ปริมาณความต้องการเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่มีจำหน่ายในปัจจุบันมีราคาแพงเนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่นำเข้าจากต่างประเทศซึ่งผลิตจากพืชฮอสเรดิสที่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของรากเป็นเวลานาน ทำให้ค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์สูง เนื่องจากในพืชมีเอนไซม์ที่เป็นไอโซไซม์มากกว่า 40 ชนิด [5] เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้ผลิตจาก

พืชเมืองหนาวพวกฮอสเรดิสซึ่งในประเทศไทยปลูกได้น้อยมาก ดังนั้นการผลิตเอนไซม์จากพืชชนิดใหม่ที่สามารถผลิตเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสได้สูงและสามารถปลูกได้ง่ายในประเทศไทยจึงเป็นทางเลือกหนึ่งของการพัฒนาการผลิตเอนไซม์เพื่อให้มีปริมาณเพียงพอกับการใช้งานภายในประเทศและมีราคาไม่สูงนัก เป็นผลให้ช่วยลดการขาดดุลทางการค้าในการนำเข้าลดลงได้ อีกทั้งช่วยให้ผู้ประกอบการในอุตสาหกรรมมีทางเลือกในการบำบัดน้ำเสียที่มีฟีนอลเป็นองค์ประกอบ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากผักบุ้งทะเล การใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ได้จากการทำบริสุทธิ์บำบัดน้ำเสียที่มีฟีนอล และการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในการบำบัดฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม

วิธีการวิจัย

การเตรียมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบผักบุ้งทะเล

เตรียมตัวอย่างเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยใช้วิธีของ Lin *et. al.* (1996) [6] และน้อมจิตต์ และคณะ (2546) [7] โดยใช้ใบผักบุ้งทะเล 100 กรัม ปั่นกับน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 200 มิลลิลิตร หลังจากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง 4 ชั้น จะได้เอนไซม์หยาบ (Crude enzyme) วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้วิธีของ Srinivas, et.al. (1999) [8] และปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry *et. al.* (1951) [9] และใช้เป็นเอนไซม์ในการศึกษาการทำบริสุทธิ์และการบำบัดน้ำเสียต่อไป

การทำบริสุทธิ์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากผักบุ้งทะเล

การผลิตเอนไซม์จากผักบุ้งทะเลโดยผ่านขั้นตอนการสกัดแยกและและการทำบริสุทธิ์โดยเปรียบเทียบวิธีการทำบริสุทธิ์ 2 วิธี คือ การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแล้วผ่านกระบวนการเจลฟิลเตรชัน ($(NH_4)_2SO_4$-G) และวิธีเอเควียส ทู-เฟส (Aqueous two-phase; ATPS) แล้วผ่านกระบวนการเจลฟิลเตรชัน (ATPS-G) เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมในการทำบริสุทธิ์ โดยพิจารณาจากความบริสุทธิ์และผลได้ของเอนไซม์ โดยมีขั้นตอนดังนี้

การทำบริสุทธิ์ขั้นต้นโดยวิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการสกัดทำบริสุทธิ์ขั้นต้นโดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต [7-8] ดูดตัวอย่างเอนไซม์จำนวน 50 มิลลิลิตร ใส่ใน ฟลาสก์แล้วค่อยๆ เติมแอมโมเนียมซัลเฟตทีละน้อยๆ ให้มีความเข้มข้นอิ่มตัวที่ร้อยละ 60 ขณะเติมต้องมีการกวนอย่างช้าๆ ตลอดเวลาด้วยเครื่อง Magnetic stirrer แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 1 คืน แยกตะกอนโปรตีนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนที่แยกได้ละลายใน phthalate-sodium hydroxide buffer พีเอช 6 โดยใช้บัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร นำส่วนใสที่แยกได้ไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนส่วนตะกอนนำไปกำจัดเกลือโดยการไดแอไลซีสวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน

การทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีเอเควียส ทู-เฟส

การทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีเอเควียส ทู-เฟส ด้วยระบบโพลิเมอร์เกลือ (โพลีเอธิลีนไกลคอล (PEG) / แอมโมเนียมซัลเฟต) [8] ศึกษาถึงผลขององค์ประกอบของเฟสระหว่าง PEG และแอมโมเนียมซัลเฟต โดยทำการแปรผันปริมาตรของ PEG (MW.6000) และแอมโมเนียมซัลเฟต เท่ากับร้อยละ 11/12.5 15/10.1 20/8.9 24/7.5 และ 27/6.0 (w/v) ซึ่งจะปรับปริมาตรสุดท้ายของระบบให้ได้ 100 มิลลิลิตร และแปรผันปริมาตรของเกลือ โซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 1 2 และ 3 ตามลำดับ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนทั้งส่วนบน (Top phase) และส่วนล่าง (Bottom phase) [8] คำนวณค่าสัมประสิทธิ์การแยกส่วนโดยใช้สูตร

$$m = C_T / C_B$$

เมื่อ m = ค่าสัมประสิทธิ์การแยกส่วน

C_T คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ในเฟสบน

C_B คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ในเฟสล่าง

นำตะกอนเอนไซม์ที่แยกได้มาทำไดอะไลซ์โดยถุงไดอะไลซ์ ที่มีขนาดรูยอมให้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10,000 ผ่านได้ ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต พีเอช 6 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปลี่ยนบัฟเฟอร์ 2 – 3 ครั้ง และกวนด้วยเครื่องกวน อย่างช้าๆ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนของสารละลายในถุงไดอะไลซ์

การทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟฟี

การทำบริสุทธิ์โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน-โครมาโตกราฟฟี [6] โดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-100 ขนาด 1.5x50 เซนติเมตร ใช้สารละลายเอนไซม์ที่ได้จากขั้นตอนที่การทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีเอเควียส ทู-เฟส และตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 1 มิลลิลิตร บรรจุลงในคอลัมน์ SephadexG-100 ปรับสมดุลด้วยสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมฟอสเฟต พีเอช 6 10 มิลลิลิตร ให้อัตราการไหลที่ 15 มิลลิลิตร / ชั่วโมง เก็บสารละลายที่ถูกชะออกมาเป็นส่วนส่วนละ 3 มิลลิลิตร วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณโปรตีน

การคำนวณค่า Recovery

Recovery(%) = B/A x 100

เมื่อ A = ยูนิตเอนไซม์ใน crude enzyme

B = ยูนิตเอนไซม์ที่คำนวณได้เมื่อผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์แต่ละขั้น

การใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในการบำบัดฟีนอลในน้ำเสีย

ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการกำจัดฟีนอลในน้ำเสียจำลองของเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ

เตรียมน้ำเสียจำลองโดยการนำน้ำประปาต้มเพื่อกำจัดคลอรีน และกวนข้ามคืนโดยใช้เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า เพื่อเป็นการให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งมีผลให้น้ำมีสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ นำน้ำประปาที่ปราศจากคลอรีน

มาเติมฟีนอลให้มีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการกำจัดฟีนอลโดยใช้เอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์และเอนไซม์หยาบตามวิธี Caza et.al. (1999) [10] โดยการนำน้ำเสียจำลองปริมาตร 30 มิลลิลิตร เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 1 และสารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซลเซียส เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาเติมเอนไซม์คะตะเลสให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาและสารส้มให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าและปรับพีเอชที่ 6.3-7.5 กวนด้วยความเร็วต่ำอีกครั้งเพื่อให้เกิดการรวมตัวกันของตะกอน สุ่มตัวอย่างมา 5 มิลลิลิตร เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที จากนั้นนำส่วนใสนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลที่เหลืออยู่ [10] คำนวณประสิทธิภาพการกำจัด เลือกรูปแบบเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดสูงสุดไปใช้ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการบำบัดฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงาน

ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการบำบัดฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงาน

เลือกรูปแบบเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดฟีนอลสูงสุดมาทำการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการกำจัดฟีนอล โดยวิธีการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการกำจัดฟีนอลทำเช่นเดียวกับน้ำเสียจำลอง ทั้งนี้แปรผันปัจจัยต่างๆ ได้แก่ พีเอช 4 5 6 7 8 9 10 อุณหภูมิ 30 40 50 60 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.16 0.33 0.66 1.00 1.33 ยูนิตต่อมิลลิลิตร อัตราส่วนระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสับเสตรตที่ 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 1.2 1.4 1.6 2.0 และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่ 1 2 3 4 5 6 7 ชั่วโมง

ผลการวิจัย

การเตรียมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากผักบุ้งทะเล

การเตรียมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากผักบุ้งทะเล โดยการแยกสกัดด้วยน้ำปราศจากอิออน พบว่า เอนไซม์หยาบมีกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์-ออกซิเดส และปริมาณโปรตีนเท่ากับ 25.27 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 325.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 0.078 ยูนิตต่อมิลลิกรัม เอนไซม์หยาบที่ได้นำไปทำบริสุทธิ์ขั้นต้นโดยวิธีที่แตกต่างกัน เพื่อนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีฟีนอลต่อไป

การทำบริสุทธิ์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากผักบุ้งทะเลโดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตตามด้วยเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟฟี

การทำบริสุทธิ์ขั้นต้นโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 60 พบว่า เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.58 เท่า สามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้ร้อยละ 69.18 เมื่อทำบริสุทธิ์ต่อด้วยเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี (รูปที่ 1a) เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 10.53 เท่า และสามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้ร้อยละ 24.93 (ตารางที่ 1)

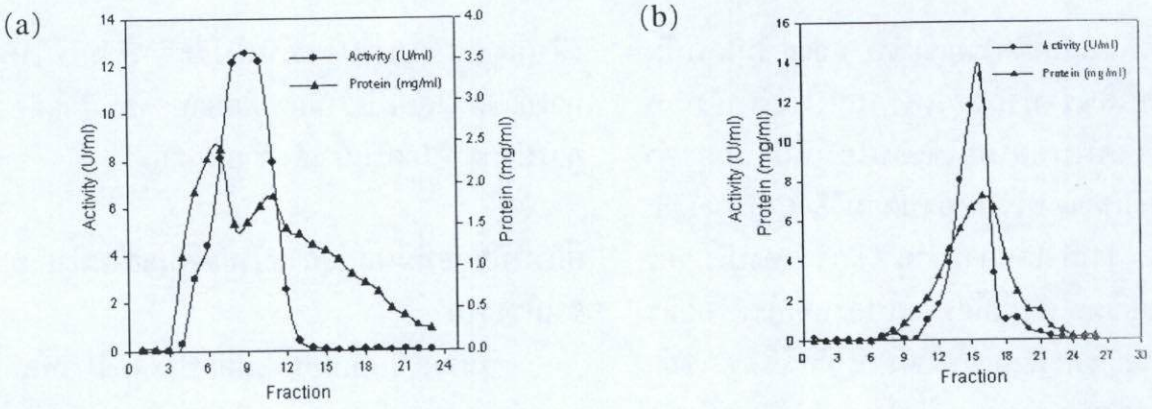

Fig. 1 Gel filtration of *I. pes-caprae* (Linn) Sweet peroxidase on Sephadex G-100 column (1.5x50cm) (a) ammonium precipitation (b) ATPS

Table 1 Purification of *I. pes-caprae* (Linn) Sweet peroxidase using ammonimsulphate coupling gel filtration

Procedure	Total Enzyme (U)	Total Protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification factor	Recovery (%)
Crude enzyme	3,059	5,514	0.55	1	100
$(NH_4)_2SO_4$ precipitation	2,116.35	2,424.44	0.87	1.58	69.18
Sephadex G-100 Chromatography	762.6	131.7	5.79	10.53	24.93

การทำบริสุทธิ์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากผักบุ้งทะเลโดยวิธีเอเควียส ทู-เฟสตามด้วยเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี

นำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสหยาบไปทำบริสุทธิ์โดยวิธีเอเควียส ทู-เฟส พบว่า ระบบที่ประกอบด้วย PEG และแอมโมเนียมซัลเฟต ร้อยละ 27/ 6.0 (w/v) ให้ค่าของสัมประสิทธิ์ของการแยกส่วนต่ำสุดเท่ากับ 0.09 วัดปริมาตรส่วนล่างซึ่งมีเอนไซม์ได้ร้อยละ 92.01 พบกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 47.481 ยูนิต/มิลลิลิตร และปริมาณโปรตีน 219.61 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (ตารางที่ 2) จึงได้เลือกใช้ระบบที่มีองค์ประกอบของ PEG และแอมโมเนียมซัลเฟตที่ร้อยละ 27/ 6.0 (w/v) ในการทดสอบผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ พบว่า ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 ให้สัมประสิทธิ์การแยกส่วนต่ำที่สุดคือ 0.156 มีกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและปริมาณโปรตีน เท่ากับ 50.54 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 233.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3) เอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์โดยวิธีเอเควียส ทู-เฟส ด้วยระบบที่มี PEG/ammoniumsulphate/ NaCl 27/ 6.0/1 (w/v) มีกิจกรรมจำเพาะเพิ่มขึ้นทั้งในส่วนบนและส่วนล่าง คือ 0.22 และ 1.02 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 2.75 และ 12.75 เท่า ตามลำดับ สามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์ในส่วนล่างได้มากกว่า คือ ร้อยละ 92.01 เมื่อผ่านการทำบริสุทธิ์โดยวิธีเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีซึ่งแสดงลำดับการชะในรูปที่ 1b เอนไซม์มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 1.84 ยูนิตต่อมิลลิกรัม และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 23 เท่า สามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้ ร้อยละ 72.51 (ตารางที่ 4)

Table 2 Effect of phase composition on partitioning of *Ipomoea pes-caprae* (Linn) Sweet peroxidase in PEG/ammonium sulphate system

PEG/ $(NH_4)_2SO_4$	Volume (ml) Top/Bottom	Activity (U/ml) Top/Bottom	Protein (mg/ml) Top/Bottom	Partition Coefficient	Recovery (%)
Crude	80	25.27	325.05	-	-
11/12.5	3/86.5	57.057/29.66	29.33/119.60	1.92	34.20
15/10.1	20/73	32.45/33.52	17.34/156.06	0.98	50.81
20/8.9	9/86	7.32/37.51	19.58/149.57	0.20	83.68
24/7.5	10.5/90	11.31/42.56	17.27/195.78	0.27	79.01
27/6.0	17.5/83	4.12/47.48	18.39/219.61	0.09	92.01

Table 3 Effect of NaCl concentration on partitioning of *I. pes-caprae* (Linn) Sweet peroxidase in PEG/Ammoniumsulphate system at 27/6.0, w/v composition

NaCl (%)	Volume (ml) Top/Bottom	Activity (U/ml) Top/Bottom	Protein (mg/ml) Top/Bottom	Partition Coefficient	Recovery (%)
1	18.5/81.5	7.71/50.54	230.44/233.33	0.15	86.52
2	4.5/95.5	14.23/43.89	236.22/254.64	0.32	75.53
3	2/98	27.53/33.25	143.79/236.58	0.83	54.68

Table 4 Purification of *I. pes-caprae* (Linn) Sweet peroxidase using ATPS coupling gel filtration

Procedure	Total Enzyme (U)	Total Protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification factor	Recovery (%)
Crude enzyme	2,021.6	26,004	0.08	1	100
Aqueous two-phase		194.67			
Top phase	72.15		0.22	2.75	3.56
Bottom phase	1,860.07		1.02	12.75	92.01
Sephadex G-100	359.1		1.84	23	72.51
Chromatography					

ประสิทธิภาพการกำจัดฟีนอลในน้ำเสียจำลองโดยใช้เอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่าง ๆ

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แต่ละขั้นตอนมาบำบัดน้ำเสียจำลองที่มีความเข้มข้นของฟีนอล 1,000 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยใช้เอนไซม์ 15 ยูนิต ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 1 ทำปฏิกิริยาที่พีเอช 6 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์หยาบมีประสิทธิภาพมากที่สุด รองลงมาคือเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีเอเควียส ทู-เฟส เอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีเอเควียส ทู-เฟส และตามด้วยเจลฟิลเตรชั่น เอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและตามด้วยเจลฟิลเตรชั่น โดยสามารถบำบัดฟีนอลได้ร้อยละ 83.84 52.71 42.26 40.84 และ 14.25 ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกเอนไซม์หยาบไปใช้ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการบำบัดฟีนอลต่อไป (รูปที่ 2)

ปัจจัยที่มีผลต่อการบำบัดฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงาน

พีเอชที่เหมาะสมต่อการบำบัดน้ำเสียที่มีฟีนอล

การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการบำบัดฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงานซึ่งมีความเข้มข้นของฟีนอล 391.10 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยใช้เอนไซม์ 11 ยูนิต ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าการทำปฏิกิริยาที่พีเอช 7 ให้ประสิทธิภาพในการบำบัดสูงสุดร้อยละ 76.07 อย่างไรก็ตามในการบำบัดน้ำเสียที่มีพีเอช ระหว่าง 4-8 สามารถบำบัดฟีนอลได้มากกว่าร้อยละ 70 (รูปที่ 3a)

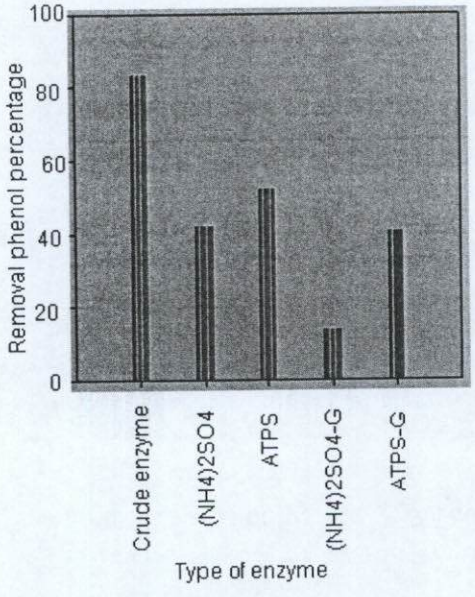

Fig. 2 Phenol removal using different type of enzyme ($(NH_4)_2SO_4$: ammoniumsulphate precipitation, ATPS: Aqueous two phase, $(NH_4)_2SO_4$_G: ammoniumsulphate precipitation coupling gel filtration, ATPS_G : ATPS: Aqueous two phase coupling gel filtration

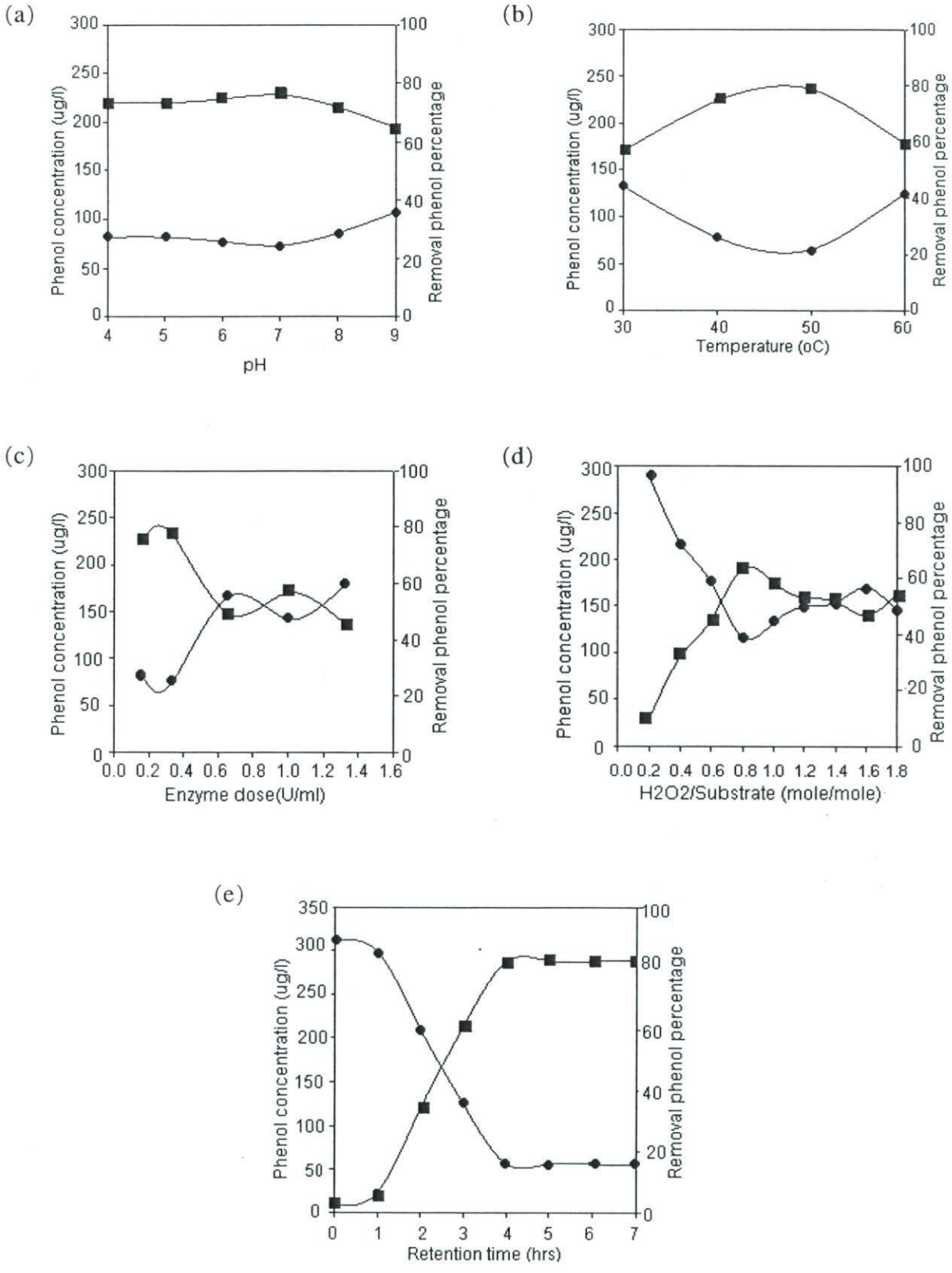

Fig. 3 Effect of pH (a), temperature (b), H_2O_2/substrate (c), enzyme dose (d), and retention time (e) on the removal of phenol in waste water initiating containing of 391.10 µg/l phenol (● Remaining phenol, ■ Removal phenol percentage)

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการบำบัดน้ำเสียที่มีฟีนอล

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการบำบัดฟีนอลในน้ำเสียที่ได้จากโรงงานซึ่งมีความเข้มข้นของฟีนอล 391.10 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยใช้เอนไซม์ 11 ยูนิต ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ร้อยละ 1 ทำปฏิกิริยาที่พีเอช 7 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า การทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการบำบัดฟีนอลสูงสุด รองลงมาคือ 40, 60 และ 30 องศาเซลเซียส โดยมีประสิทธิภาพการบำบัดร้อยละ 78.84 74.69 59.47 และ 56.71 ตามลำดับ (รูปที่ 3b)

ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการบำบัดน้ำเสียที่มีฟีนอล

การศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการบำบัดฟีนอลในน้ำเสียที่ได้จากโรงงานที่มีความเข้มข้นของฟีนอล 391.10 ไมโครกรัมต่อลิตร ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 1 ทำปฏิกิริยาที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า การทำปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ปริมาณเพิ่มมากขึ้นมีผลให้ประสิทธิภาพการบำบัดฟีนอลสูงขึ้น โดยความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.33 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการบำบัดมากที่สุดร้อยละ 77.62 ที่ความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมประสิทธิภาพการบำบัดลดลง (รูปที่ 3c)

อัตราส่วนระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อสับสเตรตที่เหมาะสมต่อการบำบัดน้ำเสียที่มีฟีนอล

การศึกษาอัตราส่วนระหว่างไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ต่อสับสเตรตที่เหมาะสมต่อการบำบัดฟีนอลในน้ำเสียจากโรงงานซึ่งมีความเข้มข้นของฟีนอล 391.10 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยใช้เอนไซม์ 0.33 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่า การทำปฏิกิริยาโดยใช้อัตราส่วนระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อสับสเตรตเพิ่มขึ้นมีผลให้ประสิทธิภาพการบำบัดฟีนอลเพิ่มขึ้นที่อัตราส่วนเท่ากับ 0.8 ประสิทธิภาพในการบำบัดฟีนอลมากที่สุดร้อยละ 63.74 และ เมื่ออัตราส่วนสูงขึ้นประสิทธิภาพการบำบัดลดลง (รูปที่ 3d)

ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมต่อการบำบัดน้ำเสียที่มีฟีนอล

การศึกษาระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาต่อการบำบัดฟีนอลในน้ำเสียที่ได้จากโรงงานซึ่งมีความเข้มข้นของฟีนอล 391.10 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยใช้เอนไซม์ 0.33 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นประสิทธิภาพการบำบัดฟีนอลเพิ่มขึ้นจนกระทั่งระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาถึง 4 ชั่วโมง ซึ่งมีประสิทธิภาพในการบำบัดสูงสุดร้อยละ 82.34 และเมื่อเพิ่มเวลาในการทำปฏิกิริยาประสิทธิภาพในการบำบัดคงที่ (รูปที่ 3e) นั่นคือ การเพิ่มเวลาในการทำปฏิกิริยาหลังจุดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการบำบัดฟีนอล

วิจารณ์

องค์ประกอบของระบบเอเควียส-ทู-เฟส มีผลต่อประสิทธิภาพการแยกส่วนของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากผักบุ้งสายพันธุ์ต่างกันเนื่องจากผักบุ้งต่างสายพันธุ์กันผลิตเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติต่างกัน [11] ดังผลการทดลองที่แตกต่างจากการศึกษาของ Srinivas, *et.al.* [8] ซึ่งพบว่า องค์ประกอบของระบบ มี PEG และ แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 24/7.5 w/v ให้สัมประสิทธิ์ของการแยกส่วนเท่ากับ 0.167 และสามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้ร้อยละ 61.37 โซเดียมคลอไรด์มีผลต่อการแยกชั้นของเอนไซม์โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการแยกส่วนของระบบและทำให้คุณสมบัติของสารละลายในส่วนที่แยกได้นั้นเปลี่ยนแปลงมีผลให้ค่าสัมประสิทธิ์การแยกต่ำ การเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 ช่วยให้การแยกส่วนของระบบดีกว่าการใช้เกลือที่ความเข้มข้นสูง ถ้าความเข้มข้นของเกลือสูงจะทำให้ความจำกัดในการละลายของโปรตีนสูงและจะส่งผลทำให้สัมประสิทธิ์การแยกสูง Srinivas, *et.al.* [12]

เอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีต่างกันมีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียต่างกัน เอนไซม์หยาบซึ่งมีส่วนของเศษผักบุ้งและองค์ประกอบอื่นมีผลในการป้องกันเอนไซม์ในระหว่างการทำปฏิกิริยาทำให้เอนไซม์มีความคงตัวระหว่างการทำปฏิกิริยาการเกิดโพลีเมอร์ของฟีนอลส่งผลให้มีประสิทธิภาพการบำบัดสูงสุด Flock *et.al.* [2] รายงานว่า การใช้เอนไซม์หยาบจากเปลือกถั่วเหลืองให้ผลในการกำจัดฟีนอลและ 2-chlorophenol ดีกว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ [13] รายงานว่า การใช้เอนไซม์หยาบจากรากพืชฮอสเรดิสมีประสิทธิภาพในการกำจัดฟีนอลในน้ำเสียจำลองที่มีความเข้มข้น 1-10 มิลลิโมลต่อลิตร โดยมีประสิทธิภาพการกำจัดร้อยละ 99 แม้ว่าการใช้เอนไซม์เปอร์-ออกซิเดสจากรากพืชฮอสเรดิสหยาบจะเป็นการเพิ่มสารอินทรีย์ในน้ำเสียแต่ค่า COD ลดลงร้อยละ 50 เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการบำบัดสูงสุด อีกทั้งเป็นเอนไซม์ที่ไม่ต้องผ่านการทำบริสุทธิ์ซึ่งจะเป็นการลดต้นทุนการผลิตเพื่อการนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสียต่อไป

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากผักบุ้งทะเลสามารถใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีฟีนอลที่มีพีเอชในช่วงกว้างเช่นเดียวกับเอนไซม์เปอร์-ออกซิเดสจากรา *Coprinus cinereus* (CiP) สามารถบำบัดฟีนอลในน้ำเสียที่มีความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร พีเอช 7-9 ได้ร้อยละ 65 Sakurai *et.al.* [8] และ Masuda *et.al.* [14] รายงานว่า กรณีที่มีปริมาณเอนไซม์จำกัดพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 9 แต่ในกรณีที่มีปริมาณเอนไซม์มากเกินพอพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5-9

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียที่มีฟีนอลในช่วงอุณหภูมิกว้างที่ 40-50 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นข้อดีในแง่ของการลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสีย เนื่องจากไม่จำเป็นต้องปรับอุณหภูมิของน้ำเสีย อย่างไรก็ตามเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากรา *Coprinus cinereus* สามารถใช้บำบัดน้ำเสียที่มีฟีนอลได้ที่อุณหภูมิช่วงกว้างกว่าเอนไซม์จากผักบุ้งทะเลโดยบำบัดฟีนอลในน้ำเสียที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรได้อย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 0-60 องศาเซลเซียส [15] การใช้เอนไซม์จากราสายพันธุ์เดียวกันในปริมาณมากเกินพอบำบัดน้ำเสียที่มีฟีนอลที่อุณหภูมิ 0-60 องศาเซลเซียส สามารถบำบัดฟีนอลได้อย่างสมบูรณ์ได้ทุกอุณหภูมิ [14]

ปริมาณเอนไซม์มีผลต่อประสิทธิภาพในการบำบัดฟีนอล เช่นเดียวกันกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากรา *Coprinus cinereus* การเพิ่มปริมาณเอนไซม์มีผลให้ประสิทธิภาพในการบำบัดฟีนอลเพิ่มขึ้นจนถึงความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมจากนั้นประสิทธิภาพการบำบัดคงที่ [14] นอกจากนี้การเติมโพลีเอทธิลีนไกลคอลช่วยป้องกันเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากถั่วเหลืองทำให้ความเข้มข้นที่เหมาะสมลดลง [10]

ความเข้มข้นของไฮโดรเจนไฮดรอกไซด์มีผลต่อประสิทธิภาพการบำบัดฟีนอล ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมการเกิดโพลีเมอร์ของฟีนอลถูกจำกัดโดยความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เมื่อปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงเกินระดับที่เหมาะสมการเกิดโพลีเมอร์ลดลง เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีผลยับยั้งเอนไซม์ ทั้งนี้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากพืชและราต้องการ อัตราส่วนระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อสับสเตรตที่เหมาะสมต่อการบำบัดฟีนอลต่างกัน ดังเช่น เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากถั่วเหลือง 1.2 [10] เปลือกถั่วเหลือง 9.97 มิลลิโมลต่อลิตร [2] รา *Arthromomyces ramosus* (ARP) 0.9 โมลฟีนอลต่อโมลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ [16] รา *Coprinus cinereus* 1 โมลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อโมลฟีนอล [15]

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากผักบุ้งทะเลมีความสามารถในการบำบัดฟีนอลในเวลาที่แตกต่างจากเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากรา *Coprinus cinereus* ซึ่งสามารถบำบัดฟีนอลในน้ำเสียที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรได้ภายในเวลา 10 นาที [14-15] ทั้งนี้อาจเกิดจากปริมาณฟีนอลในน้ำเสียที่แตกต่างกัน

สรุป

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากผักบุ้งทะเลสามารถแยกและทำบริสุทธิ์โดยวิธีเอเควียส ทู-เฟส และตามด้วยเจลฟิลเตรชันโครมโตกราฟี ซึ่งเป็นวิธีการที่เพิ่มความบริสุทธิ์ของเอนไซม์และให้ผลได้สูง เอนไซม์หยาบมีประสิทธิภาพในการบำบัดฟีนอลสูงสุดในสภาวะที่เหมาะสมโดยไม่จำเป็นต้องปรับสภาพของน้ำเสียก่อนเข้าสู่ระบบบำบัด ซึ่งเป็นข้อดีในแง่ของต้นทุนการผลิต ดังนั้นเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากผักบุ้งทะเลเป็นทางเลือกใหม่ที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้บำบัดน้ำเสียที่มีฟีนอลจากในโรงงานอุตสาหกรรม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยชิ้นนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสภาวิจัยแห่งชาติผ่านมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล ศรีวิชัย คณะเกษตรศาสตร์นครศรีธรรมราช

เอกสารอ้างอิง

[7] น้อมจิตต์ แก้วไทย, ปนิตตา ศรีฟ้า และ สุพรรณี ไชยณรงค์. 2546. การแยก การทำบริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากผักบุ้ง. การประชุมสัมมนาทางวิชาการสถาบันเทคโนโลยีราชมงคลวิชาการครั้งที่ 20.

[1] Aberti, N. B. and A. M. Klibanov. 1981. Enzymatic Removal of Dissolved Aromatics from Industrial Aqueous Effuent. Biotechnol. Bioeng. 11 : 373-390.

[10] Caza, N., J. K. Bewtra, N. Biswas and K. E. Taylor. 1999. Removal of Phenolic Compounds from Synthetic Wastewater Using Soybean Peroxidase. Wat. Res. 33 : 3012-3018.

[2] Flock, C., A. Bassi and M. Gijzen. 1999. Removal of Aqueous Phenol and 2-Chlorophenol with Purified Soybean Peroxidase and Raw Soybean Hulls. J. Chem. Technol. Biotechnol. 74:303-309.

[6] Lin, Z., L. Chen and W. Zhang. 1996. Peroxidase from *Ipomoea cairica* (L) SW. Isolatioon, Purification and Some Properties. J. Process. Biochem. 31(5) : 443-448

[9] Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

[14] Masuda, M., A. Sakurai, M. Sakakibara. 2001. Effect of Reaction Conditions on Phenol Removal by Polymerization and Precipitation Using *Coprius cinereus* Peroxidase. Enzyme and Microbiol. Technol. 28 : 295-300.

[5] Regalado, C., J.A. Asenjo and D.L. Pyle. 1996. Studies on the Purification of Peroxidase from Horsedish Roots Using Reverse Micelles. Enz. Micr.Tech. 18 : 332-329.

[15] Sakurai, A. S. Kawamoto, J. F. A. Montaya and M. Sakakibara. 1999. Decontamination of Phenol by Peroxidase-catalyzed Polymerization. Abtracts APBioChec 99, The 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1999 and The Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology.

[8] Srinivas, N. D., K. R. Rashmi and K. S. M. S. Raghavarao.1999. Extraction and Purification of a Plant Peroxidase by Aqueous Two-phase Extraction Coupled with Gel Filtration. J. Process Biochem. 35 : 43-48.

[12] Srinivas, N. D., R. S. Barhate, K. S. M. S. Raghavarao. 2002. Aqueous Two-phase Extraction in Combination with Ultrafiltration for Downstream Processing of *Ipomoea* Peroxidase. J. of Food Eng. 54 : 1-6.

[16] Villalobos, D.A. and I.D. Buchanan. 2002. Removal of Aqueous Phenol by *Arthromyces ramosus* peroxidase. J. Environ.Eng.Sci. 1 : 65-73.

[11] Vilter, H.1990. Aqueous Two-phase Extraction of Plant Enzymes from Sources Containing Large amounts of Tannins and Anionic Mucilages. Bioseparation. 1 : 283-292.

[13] Wilberg, K. Q., D. G. Nunes and J. Rubio. 2000. Removal of Phenol by Enzymatic Oxidation and Flotation. Braz.J.Chem.Eng. 17 : 4-7.

[3] Weng, Z., X. M. Handrick and G. Maesmans. 1991. Immobilized Peroxidase : A Potential Bioindicator for Evaluation of Thermal Process. J. Food Sci. 56 : 567-750.

[4] Wu, Y., K. E. Taylor, N. Biswas and J. K. Bewtra. 1999. Kinetic Model Aided Reactor Design for Peroxidase-catalysed Removal of Phenol in the Presence of Polyethylene Glycol. J. Chem. Technol. Biotechnol. 74: 519-526.