



บทความวิจัย

การตรึงแลคเคสและเปรียบเทียบการใช้ในถังปฏิกรณ์แบบกะและแบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุสำหรับกำจัดพาราเซตามอล

Immobilization of Laccase and Comparative uses in Batch Reactor and Continuous Packed bed Column for Paracetamol Removal

สุพจน์ ปูนบุตร กรรณิกา รัตน์พงค์เลขา*

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

Supot Punbut Karnika Ratanapongleka*

Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Ubon Ratchathani University

* Corresponding author.

85 ถนนสดลมารค์ อำเภวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190

E-mail: karnika.r@ubu.ac.th; Telephone: 08 1544 7559

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสัดส่วนที่เหมาะสมในการตรึงแลคเคสด้วยแบเรียมแอลจิเนต และเปรียบเทียบการกำจัดพาราเซตามอลด้วยแลคเคสตรึงในถังปฏิกรณ์แบบกะและถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุ ภายใต้สภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแลคเคส ความเข้มข้นของพาราเซตามอล และค่าความเป็นกรด-ด่าง การศึกษาครั้งนี้ใช้เอนไซม์แลคเคสหายากที่สกัดจากเชื้อ *Lentinus polychous* Lev. มาตรึงแบบดักติดด้วยโซเดียมแอลจิเนตและแบเรียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 5%(w/v) และ 5%(w/v) ตามลำดับ เมื่อเพิ่มอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์ต่อโซเดียมแอลจิเนต ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การตรึงมีค่าเพิ่มขึ้นและการรั่วไหลของเอนไซม์มีค่าลดลง อัตราส่วนของแลคเคสต่อโซเดียมแอลจิเนตที่เหมาะสมคือ 1:8 (โดยปริมาตร) เมื่อนำแลคเคสตรึงมากำจัดพาราเซตามอลพบว่าประสิทธิภาพการกำจัดพาราเซตามอลสูงสุดเท่ากับ 78.64% และ 100% ในถังปฏิกรณ์แบบกะและถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุที่เวลา 120 นาที ที่ความเข้มข้นของพาราเซตามอล 1 mg/l ปริมาณเอนไซม์ 0.216 U/g-alginate ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 และอัตราการไหล 2 ml/min สำหรับถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุ โดยไม่มีการดูดซับของวัสดุติดติด ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์แลคเคสมีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้กำจัดพาราเซตามอลได้เป็นอย่างดี

คำสำคัญ

พาราเซตามอล แลคเคสตรึง ถังปฏิกรณ์หอบรรจุ แบเรียมแอลจิเนต

Abstract

The objective of this research was to investigate the optimum ratio for laccase immobilization using barium alginate and comparative paracetamol removal by immobilized laccase in batch reactor and continuous packed bed column reactor with three conditions, paracetamol concentrations, enzyme concentration, pH values. Crude laccase used in this work extracted from *Lentinus polychous* Lev. was entrapped in sodium alginate and barium chloride at concentration 5% (w/v) and 5% (w/v) respectively. Increasing in the ratio of enzyme to sodium alginate affected an increase in the percentage of immobilization yield and a decrease of enzyme leakage. The optimum ratio of laccase to sodium alginate was 1:8 (v/v). The study of paracetamol removal by immobilized laccase showed the best percentage of paracetamol removals were 78.64% and 100% in batch reactor and continuous packed bed column reactor, respectively at paracetamol concentration

1 mg/L, laccase concentration 0.216 U/g-alginate pH 7 and flow rate at 2 mL/min for continuous packed bed column reactor without the adsorb of paracetamol into entrapment material. The study indicates the potential of immobilized laccase for removal of paracetamol.

Keywords

paracetamol; immobilized laccase; packed bed column reactor; barium alginate

1. บทนำ

พาราเซตามอล (Paracetamol) หรือ อะเซตามิโนเฟน (Acetaminophen) เป็นยาที่สามารถใช้ได้ทั้งมนุษย์และสัตว์ โดยทั่วไปจะถูกใช้เป็นยาบรรเทาอาการปวดลดไข้ เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกขับออกประมาณ 58–68 % [1] โดยมีการตรวจพบการปนเปื้อนของพาราเซตามอลในแหล่งน้ำผิวดินและน้ำใต้ดิน [2] ซึ่งหากเกิดการปนเปื้อนในแหล่งน้ำสำหรับอุปโภคบริโภคทำให้เกิดความเสี่ยงที่มนุษย์และสัตว์จะได้รับเข้าไป พาราเซตามอลมีพิษส่งผลให้เกิดการทำลายตับ ดังนั้น การศึกษาวิธีการกำจัดการปนเปื้อนของพาราเซตามอลจึงมีความจำเป็น ซึ่งปัจจุบันกระบวนการบำบัดการปนเปื้อนพาราเซตามอลมีทั้งกระบวนการทางกายภาพและกระบวนการทางเคมี เช่น กระบวนการใช้โอโซน (Ozonation) [3] กระบวนการใช้แสง (Electro-Fenton process) [4] ซึ่งมีประสิทธิภาพสูง แต่ต้องใช้พลังงานและค่าใช้จ่ายที่สูงตามไปด้วย รวมทั้งอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ เนื่องจากโอโซนจะทำปฏิกิริยากับสารบางชนิดทำให้เกิดเป็นสารก่อมะเร็ง ดังนั้น กระบวนการทางชีวภาพโดยใช้ เอนไซม์จึงเป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจ โดยพบว่าเอนไซม์แลคเคสมีความน่าสนใจ เพราะสามารถกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของสับสเตรตได้หลากหลาย เช่น โพลีฟีนอล อะมิโนฟีนอล อะโรมาติกเอไมด์ เมทอกซีฟีนอล [5,6]

เอนไซม์แลคเคสจัดอยู่ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส (oxidoreductase) มีอะตอมทองแดงเป็นองค์ประกอบในโครงสร้าง พบได้ในพืช เชื้อราและจุลินทรีย์หลายกลุ่ม [6] เอนไซม์แลคเคสมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารประกอบจำพวกฟีนอลและอนุพันธ์ของฟีนอลรวมทั้งสารที่มีโครงสร้างคล้ายกลินินในเนื้อไม้ และสารพิษที่ย่อยสลายยากชนิดต่าง ๆ โดยการออกซิโดซ์ อิเล็กตรอนออกจากสับสเตรท พร้อมๆ กับการรีดิวซ์โมเลกุลออกซิเจนได้น้ำเป็นผลิตภัณฑ์ร่วม เอนไซม์แลคเคสถูกนำมาประยุกต์ใช้

หลากหลายในทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การบำบัดสารพิษจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษ สีย้อมผ้า [7,8] และปิโตรเคมี เป็นต้น แต่การใช้ในรูปเอนไซม์อิสระมีข้อจำกัดเนื่องจากไม่สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ จึงส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการบำบัดสูงขึ้น ด้วยเหตุนี้จึงมีความพยายามที่จะหาแนวทางแก้ปัญหาดังกล่าว โดยพบว่าการใช้เอนไซม์ตรึงรูปช่วยลดปริมาณการใช้เอนไซม์ สามารถใช้ได้อย่างต่อเนื่อง และนำกลับมาใช้งานกว่าความสามารถของเอนไซม์จะลดลง

การตรึงเอนไซม์ (enzyme immobilization) เป็นการเปลี่ยนสถานะของเอนไซม์จากสารเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลวให้กลายเป็นสารเร่งปฏิกิริยาที่ยึดเกาะกับของแข็งไม่ละลายน้ำหรือละลายได้น้อย ซึ่งมีเทคนิคหลัก 3 วิธีคือ การยึดด้วยตัวนำ (binding to supports) เช่น วิธีดูดซับทางกายภาพหรือการทำพันธะโควาเลนต์กับตัวกลาง (covalent binding method) วิธีเชื่อมขวาง (cross-linking) และการดักติด (entrapment method) ซึ่งใช้ในงานวิจัยนี้ การดักติดเป็นการเก็บเอนไซม์ทางกายภาพไว้ในพอลิเมอร์ซึ่งยอมให้สารตั้งต้นและสารผลิตภัณฑ์ผ่านเข้าออกเอนไซม์ตรึงได้ ซึ่งมีข้อดีคือ เอนไซม์จะถูกแยกจากสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ได้ง่าย สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้งานได้จนกว่าความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะลดลง และยังทำให้เสถียรภาพของเอนไซม์ดีขึ้น สามารถใช้เอนไซม์ตรึงในการทำปฏิกิริยาที่สภาวะแตกต่างไปจากเอนไซม์อิสระดั้งเดิมได้ และยังสามารถควบคุมการดำเนินระบบได้ง่ายขึ้น จากสมบัติดังกล่าวทำให้เอนไซม์ที่อยู่ในรูปของเอนไซม์ตรึงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้กว้างขวางมากกว่าการใช้เอนไซม์อิสระ

จากเหตุผลข้างต้น จึงมีความเป็นไปได้ที่เอนไซม์แลคเคสจะสามารถออกซิโดซ์พาราเซตามอลซึ่งมีโครงสร้างคล้ายฟีนอลได้ ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีงานวิจัยที่ศึกษาในเรื่องดังกล่าว โดยเฉพาะการใช้เอนไซม์แลคเคสตรึงบำบัดน้ำที่ปนเปื้อนพาราเซตามอลในสภาวะต่างๆ และการประยุกต์ใช้เอนไซม์แลคเคส

ตรึงร่วมกับถังปฏิกรณ์แบบแพคเบด (packed-bed reactor) เพื่อดำเนินระบบได้ต่อเนื่องเสมือนกับการใช้งานจริงกับน้ำเสียที่มีการเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง การดำเนินระบบในถังปฏิกรณ์แบบแพคเบดยังช่วยลดผลกระทบต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จากสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากสารผลิตภัณฑ์จะถูกแยกออกทันทีไม่เกิดการตกค้างในระบบ และไม่ต้องแยกเอนไซม์ออกจากถังปฏิกรณ์ในแต่ละรอบการทำงาน นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสและระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างสาร ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้มีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์แลคเคส การใช้เอนไซม์แลคเคสหยาดตรึงเพื่อย่อยสลายพาราเซตามอลที่ปนเปื้อนในน้ำและประยุกต์ใช้ร่วมกับถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุที่สภาวะการทำงานต่างๆ

2. ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเอนไซม์ตรึง เช่น แบริยมคลอไรด์ ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) จากบริษัท Ajax ประเทศออสเตรเลีย โซเดียมแอลจีเนต (sodium alginate) จากบริษัท Fluka ประเทศอังกฤษ สารเคมีที่ใช้ในการวัดกิจกรรมเอนไซม์แลคเคส เช่น ABTS, sodium acetate, trichloroacetic acid (TCA) จากบริษัท Sigma-aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา และสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน Bradford reagent ใช้สารละลายสำเร็จรูปของบริษัท Applichem ประเทศเยอรมันนี

2.2 การเตรียมเอนไซม์แลคเคสจากเชื้อ *Lentinus polychrous* Lev.

การเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ด *L. polychrous* และการสกัดเอนไซม์แลคเคสหยาดทำตามวิธีของ Khammuang (2007) [9] โดยนำเชื้อดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารแข็ง ประกอบด้วย แกลบและรำ 1:2 โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ในที่มืดและอุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาสกัดเอนไซม์หยาดด้วยการเติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตรต่ออาหารแห้งเชื้อ 1 g และกวน 45 min กรองกากอาหารแห้งเชื้อออกโดยใช้ผ้าขาวบาง และนำสารละลายมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 min จะได้ส่วนที่เป็นสารละลาย เรียกว่าเอนไซม์แลคเคสหยาด และนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

2.3 การเตรียมเอนไซม์ตรึง

เอนไซม์แลคเคสถูกนำมาตรึงด้วยสารละลายโซเดียมแอลจีเนต 5% (w/v) และสารละลายแบริยมคลอไรด์ 5% (w/v) เอนไซม์ที่ใช้ศึกษามีสองรูปแบบ คือ เอนไซม์ที่อยู่ในสภาพทำงานและเอนไซม์ที่เสื่อมสภาพการทำงาน

การเตรียมเอนไซม์ตรึงที่อยู่ในสภาพทำงาน เตรียมโดยนำสารละลายโซเดียมแอลจีเนตผสมกับเอนไซม์แลคเคสที่ทำการวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์และโปรตีนแล้ว จากนั้นหยดสารละลายเอนไซม์แอลจีเนตลงไปนสารละลายแบริยมคลอไรด์ ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแข็งตัวเป็นเวลา 60 min ที่อุณหภูมิห้อง สำหรับเอนไซม์ตรึงเสื่อมสภาพมีวิธีตรึงเช่นเดียวกัน แต่ก่อนที่จะนำมาตรึงเอนไซม์จะถูกนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 10 min

2.4 การศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการตรึงเอนไซม์แลคเคสหยาด

การศึกษาอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์แลคเคสหยาดต่อสารละลายโซเดียมแอลจีเนตที่เหมาะสมในการเตรียมเอนไซม์แลคเคสหยาดตรึง ด้วยแบริยมแอลจีเนต (Ba-alginate) โดยทำการศึกษาที่อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารละลายโซเดียมแอลจีเนต 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 และ 1:10 โดยปริมาตร ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมแอลจีเนตและแบริยมคลอไรด์ (BaCl_2) คือร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเวลาที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์แลคเคส คือ 60 min

โดยการตรึงที่เหมาะสมจะพิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์การตรึงและการรั่วไหลของเอนไซม์ สำหรับการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การตรึงเอนไซม์สามารถคำนวณได้จากผลต่างของปริมาณเอนไซม์ตั้งต้นที่ใช้กับปริมาณเอนไซม์ที่พบในสารละลายแบริยมคลอไรด์ หลังครบระยะเวลาในการตรึงเปรียบเทียบกับปริมาณเอนไซม์ตั้งต้น ส่วนการวิเคราะห์การรั่วไหลของเอนไซม์จากเม็ดตรึงจะวัดในรูปของปริมาณโปรตีนทำโดยนำเอนไซม์ตรึงมาแช่ในบัฟเฟอร์ที่พีเอช 7 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การรั่วไหลของโปรตีนคำนวณจากปริมาณโปรตีนที่พบในบัฟเฟอร์เทียบกับปริมาณโปรตีนที่ถูกอยู่ในเม็ดตรึง

2.5 การกำจัดพาราเซตามอลด้วยเอนไซม์ตรึงในถังปฏิกรณ์แบบกะและถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุ

การศึกษาในถังปฏิกรณ์แบบกะและแบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุ โดยสำหรับถังปฏิกรณ์แบบกะความเร็วรอบที่ใช้กวนผสม 150 รอบต่อนาที และถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุ คอลัมน์ที่ใช้มีความสูง 50 cm เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 cm บรรจุเอนไซม์แลคเคสตรึงสูง 45 cm อัตราการไหลของสารละลายพาราเซตามอลที่ออกจากหอบรรจุเท่ากับ 2 ml/min โดยเอนไซม์ตรึงมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 mm อุณหภูมิทดลองถูกควบคุมที่อุณหภูมิห้อง โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้เอนไซม์เสื่อมสภาพการทำงาน ปัจจัยที่ศึกษาได้แก่

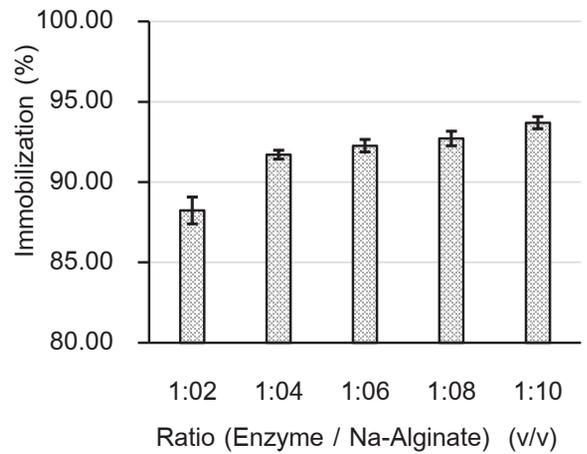
การศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของปริมาณพาราเซตามอลที่ 1, 5, 10, 50 และ 100 mg/l ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ 0.216 U/g-alginate และค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายเท่ากับ 7

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.010, 0.021, 0.043, 0.108 และ 0.216 U/g-alginate โดยเตรียมสารละลายพาราเซตามอลป้อนที่ความเข้มข้น 1 mg/l และค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายเท่ากับ 7

การศึกษาการเปลี่ยนค่าความเป็นกรด-ด่าง ของสารละลายพาราเซตามอล 4-8 (พีเอช 4-5 เตรียมโดยใช้โซเดียมเตตราโบรไมด์ พีเอช 6-7 ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และพีเอช 8 ใช้ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์) ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ 0.216 U/g-alginate และความเข้มข้นสารละลายพาราเซตามอล 1 mg/l

2.6 การตรวจวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของแลคเคสและปริมาณโปรตีน

การวัดกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ทดสอบโดยวัดการออกซิไดซ์ของ ABTS ตามวิธีที่กล่าวในงานวิจัยของ Khammuang (2007) [9] โดยเติมเอนไซม์ตัวอย่างลงใน 0.1 M โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอช 4.5 และสารละลาย 10 mM ABTS เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 32 °C เป็นเวลา 10 min หยุดปฏิกิริยาด้วย 80% w/v TCA จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm



รูปที่ 1 เปรียบเทียบการตรึงเอนไซม์แลคเคสที่ยาบที่อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์แลคเคสต่อยาบต่อสารละลายโซเดียมแอลจีเนต

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใช้วิธีของ Bradford (1976) [10] โดยเปิดสารละลายตัวอย่างมาทำปฏิกิริยากับ Bradford reagent เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับเส้นกราฟโปรตีนมาตรฐานซึ่งเตรียมจาก Bovine Serum Albumin (BSA)

2.7 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณพาราเซตามอล

การวิเคราะห์ปริมาณพาราเซตามอลด้วยเทคนิคการเทียบสี (Colorimetric Method) ที่ความยาวคลื่น 715 nm [11] เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของพาราเซตามอลที่มีความเข้มข้น 0-10 mg/l

2.8 การศึกษาลักษณะพื้นผิวของเอนไซม์แลคเคสตรึง

เม็ดเอนไซม์แลคเคสตรึงถูกนำมาล้างด้วยแบเรียมคลอไรด์และมาทำให้คงสภาพด้วยกลูตาโรลดีไฮด์ เป็นเวลา 5 วัน ที่อุณหภูมิ 4 °C และทำการล้างอีกครั้งด้วยแบเรียมคลอไรด์ ผ่าเม็ดแลคเคสตรึงจากนั้นนำไปทำให้แห้งและนำมาเคลือบทองโดยการพ่นไอออน (Balzers, SCD 040, Liechtenstein) แล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) ที่กำลังขยาย 3,500 เท่า

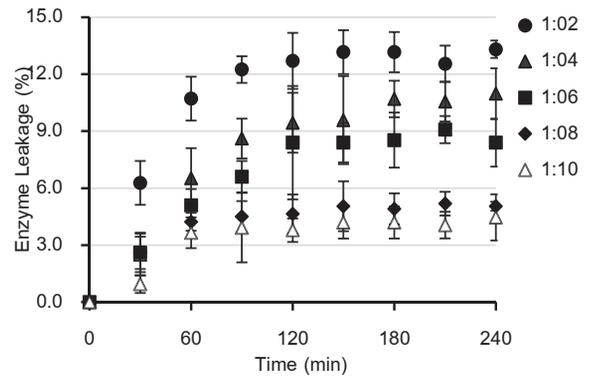
3. ผลการวิจัย

3.1 ศึกษาอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์แลคเคสหยาบต่อโซเดียมแอลจิเนตที่เหมาะสม

การศึกษาอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์ต่อโซเดียมแอลจิเนตที่เหมาะสมในการเตรียมเอนไซม์แลคเคสตรังนั้นสามารถพิจารณาได้จาก เปอร์เซ็นต์การตรึง (% immobilization) ร่วมกับเปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของเอนไซม์ (enzyme leakage)

ผลการศึกษาในรูปที่ 1 แสดงถึงเปอร์เซ็นต์การตรึงเอนไซม์แลคเคสหยาบเมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์แลคเคสต่อสารละลายโซเดียมแอลจิเนต (1:2, 1:4, 1:6, 1:8 และ 1:10 โดยปริมาตร) พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์แลคเคสต่อสารละลายโซเดียมแอลจิเนตส่งผลให้ประสิทธิภาพการตรึงเอนไซม์เพิ่มขึ้น โดยที่อัตราส่วน 1:10 ให้เปอร์เซ็นต์การตรึงสูงสุดที่ 93.70 ± 0.38 เปอร์เซ็นต์ และต่ำสุดที่อัตราส่วน 1:2 ที่ 88.24 ± 0.83 เปอร์เซ็นต์ โดยที่อัตราส่วน 1:4 – 1:10 โดยปริมาตร เปอร์เซ็นต์การตรึงมีแนวโน้มใกล้เคียงกันที่ 88.24 ± 0.83 , 91.7 ± 0.27 , 92.26 ± 0.39 , 92.72 ± 0.45 และ 93.70 ± 0.38 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตราส่วน 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 และ 1:10 โดยปริมาตร ตามลำดับ

และเมื่อพิจารณาถึงเสถียรภาพของเม็ดเอนไซม์แลคเคสตรังที่อัตราส่วนต่างๆ ในรูปของการรั่วไหลของเอนไซม์จากเม็ดเอนไซม์ตรึง โดยนำเม็ดเอนไซม์ตรึงไปแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7 (รูปที่ 2) ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์แลคเคสหยาบต่อสารละลายโซเดียมแอลจิเนตส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของเอนไซม์ตรึงมีแนวโน้มลดลง เมื่อเวลาในการทดสอบเพิ่มขึ้นพบว่าเปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของเอนไซม์มีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องสำหรับอัตราส่วน 1:2 และ 1:4 แต่พบว่าที่อัตราส่วน 1:6 การรั่วไหลของเอนไซม์เริ่มคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 90 นาที และเริ่มคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาทีสำหรับอัตราส่วน 1:8 และ 1:10 โดยมีการรั่วไหลของเอนไซม์ที่ 4.46 ± 1.22 , 5.05 ± 0.24 , 8.39 ± 1.26 , 10.97 ± 1.34 และ 13.32 ± 0.46 เปอร์เซ็นต์ที่อัตราส่วน 1:10, 1:8, 1:6, 1:4 และ 1:2 โดยปริมาตรตามลำดับที่เวลา 240 นาที และเมื่อแช่เม็ดเอนไซม์แลคเคสตรังเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการรั่วไหลของเอนไซม์เพิ่มขึ้นน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์สำหรับอัตราส่วน 1:4–1:10 โดยปริมาตร



รูปที่ 2 เปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของเอนไซม์ที่อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์แลคเคสหยาบต่อสารละลายโซเดียมแอลจิเนต

แต่ที่อัตราส่วน 1:2 มีการรั่วไหลของเอนไซม์มากที่สุดโดยเอนไซม์มีการรั่วไหลเพิ่มขึ้นประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ โดยมีการรั่วไหลของเอนไซม์ที่ 28.78 ± 1.95 , 15.56 ± 1.05 , 12.25 ± 1.56 , 8.45 ± 2.33 , 7.43 ± 1.69 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตราส่วน 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 และ 1:10 โดยปริมาตรตามลำดับ โดยสภาพของเม็ดเอนไซม์แลคเคสตรังยังคงมีสภาพเช่นก่อนการทดสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงโดยไม่มีการแตกหรือบวมของเม็ดเอนไซม์ตรึง

ผลการศึกษาข้างต้นอธิบายได้ว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์แลคเคสต่อสารละลายโซเดียมแอลจิเนตส่งผลให้ปริมาณของโซเดียมแอลจิเนตสูงขึ้น จำนวนจุดเชื่อมของพอลิเมอร์ในเม็ดเอนไซม์ตรึงเพิ่มขึ้น และทำให้ความสามารถในการกักเก็บเอนไซม์เพิ่มขึ้นตามไปด้วย ในขณะที่ยวกันชั้นของเจลที่มีความหนาแน่นมากขึ้น ขนาดรูพรุนของเม็ดเอนไซม์ตรึงลดลง ทำให้เอนไซม์รั่วไหลลดลง ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การตรึงเอนไซม์เพิ่มขึ้นและเปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของเอนไซม์น้อยลงตามไปด้วย ซึ่งตรงข้ามกับในกรณีที่ใช้โซเดียมแอลจิเนตน้อย ทำให้จำนวนจุดเชื่อมของพอลิเมอร์น้อยลง โครงสร้างตาข่ายมีความไม่แข็งแรง ชั้นของเจลมีความบางลงทำให้รูพรุนของเม็ดตรึงมีจำนวนมากขึ้นหรือใหญ่ขึ้น ผิวของเม็ดเอนไซม์ตรึงจะเปราะบาง [12] จึงส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การตรึงของเอนไซม์ลดลงและเปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น [13] นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเอนไซม์แลคเคสต่อโซเดียมแอลจิเนตเช่นกัน ได้แก่ งานวิจัยของ Lei (2006) [14] ศึกษาอัตราส่วนที่

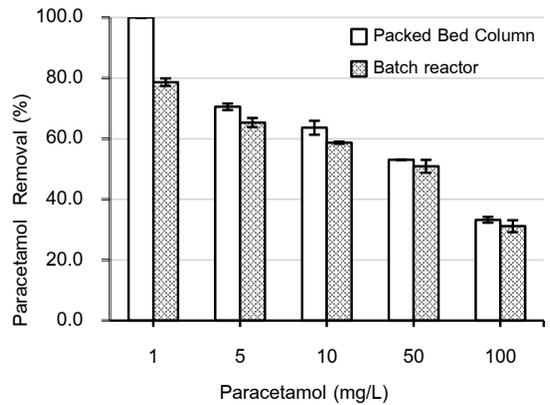
เหมาะสมระหว่างเอนพบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์และโซเดียมแอลจีเนตในการตรึงเอนไซม์คือ 1:8 โดยปริมาตร แต่งานวิจัยของ Daâssi (2014) [15] ศึกษาสภาวะอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์ต่อสารละลายโซเดียมแอลจีเนตที่เหมาะสมโดยใช้เอนไซม์แลคเคสจากเชื้อ *Coriopsis gallica* ผลการศึกษาพบว่าประสิทธิภาพการตรึงสูงสุดที่อัตราส่วน 1:4 โดยปริมาตร

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์ต่อโซเดียมแอลจีเนต ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การตรึงมีค่าเพิ่มขึ้นและเปอร์เซ็นต์การรั่วไหลของเอนไซม์มีค่าลดลง โดยอัตราส่วนของเอนไซม์แลคเคสต่อสารละลายโซเดียมแอลจีเนตที่เหมาะสมเลือกนำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป คือ 1:8 โดยปริมาตร ซึ่งถึงแม้ว่าค่าเปอร์เซ็นต์การตรึงและการรั่วไหลของเอนไซม์ที่อัตราส่วน 1:10 โดยปริมาตร จะดีกว่า (เพียงเล็กน้อย) เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรึงที่อัตราส่วน 1:8 โดยปริมาตร แต่เมื่อทดสอบค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่ปรากฏว่าจะลดลงเมื่อปริมาณของโซเดียมแอลจีเนตมากขึ้น (ไม่แสดงผล) ซึ่งส่วนหนึ่งอาจเกิดจากการที่ใช้โซเดียมแอลจีเนตมาก ความหนาของชั้นเจลสูงขึ้น การเคลื่อนที่ของสารตั้งต้นเข้าออกเม็ดตรึงทำได้ยากขึ้น ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ในเม็ดตรึงจึงลดลง

3.2 การศึกษาการกำจัดพาราเซตามอลด้วยแลคเคสตรึงในถังปฏิกรณ์แบบกะและถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุ

ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพาราเซตามอล

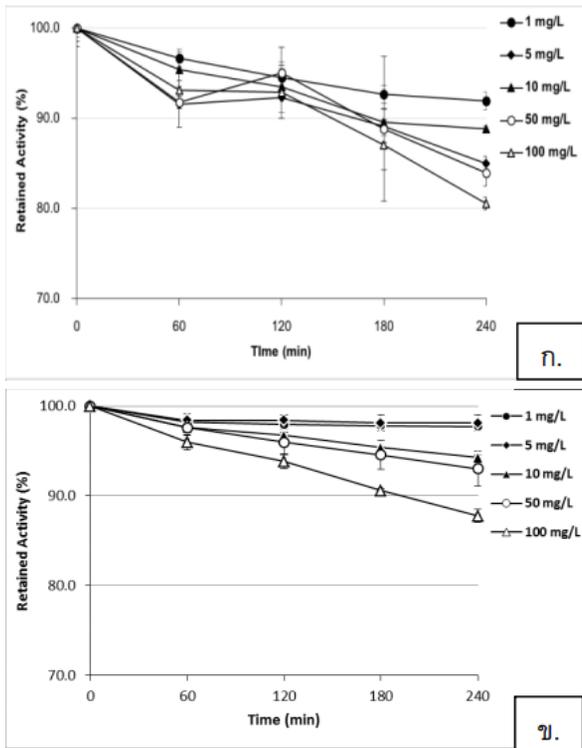
การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพาราเซตามอล (1-100 mg/L) ต่อการกำจัดพาราเซตามอลด้วยเอนไซม์แลคเคสตรึงซึ่งมีค่ากิจกรรมการทำงาน 0.216 U/g-alginate ความเข้มข้นของพาราเซตามอล 1 mg/L ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 ถูกใช้ศึกษาในชุดทดลองถังปฏิกรณ์แบบกะและชุดทดลองถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุ (รูปที่ 3) ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นพาราเซตามอลส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดมีแนวโน้มลดลงซึ่งสอดคล้องกันทั้งสองชุดการทดลอง โดยในชุดทดลองแบบกะมีเปอร์เซ็นต์การกำจัดที่เวลา 120 นาที ที่ 78.64 ± 1.98 , 65.34 ± 1.82 , 50.64 ± 1.89 , 35.74 ± 1.06 และ 28.34 ± 1.56 เปอร์เซ็นต์ และ



รูปที่ 3 เปอร์เซ็นต์การกำจัดพาราเซตามอลเมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพาราเซตามอลที่เวลา 120 นาที

สำหรับชุดทดลองแบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุมีประสิทธิภาพการกำจัดที่ 100 , 70.52 ± 1.07 , 53.62 ± 2.01 , 40.09 ± 0.06 และ 33.26 ± 0.95 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของพาราเซตามอล 1-100 mg/L ตามลำดับ สำหรับชุดเอนไซม์เสื่อมสภาพการทำงาน ซึ่งทดสอบกับพาราเซตามอลที่ความเข้มข้น 100 mg/L พบว่าค่าการกำจัดของชุดเอนไซม์เสื่อมสภาพมีค่าลดลงน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการลดลงของปริมาณพาราเซตามอลไม่ได้เกิดจากพาราเซตามอลเข้าไปดูดซับในวัสดุติดแต่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์แลคเคสตรึง

การศึกษาข้างต้นสามารถอธิบายได้ว่า จากการเพิ่มความเข้มข้นของพาราเซตามอลสูงขึ้นส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดลดลง ผลอาจเกิดจากปริมาณของเอนไซม์ไม่เพียงพอต่อความเข้มข้นของพาราเซตามอลที่สูงขึ้นหรือเกิดจากเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นก่อให้เกิดสารผลิตภัณฑ์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นอาจจะเข้าไปเกาะกับเอนไซม์ขัดขวางการจับกันระหว่างสารตั้งต้นกับเอนไซม์ จึงส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดมีค่าลดลงตามไปด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ahmed Azizi [16] ซึ่งทำการศึกษาการกำจัดฟีนอลโดยใช้เอนไซม์เปอร็อกซิเดสจากหัวผักกาด (*Brassica rapa*) ตรึงด้วยเทคนิคการดักติดพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฟีนอลส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดฟีนอลลดลงซึ่งผลของการเพิ่มความเข้มข้นของฟีนอลยังส่งผลให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้นเพิ่มขึ้น



รูปที่ 4 กิจกรรมการทำงานของแลคเคสตรังในถังปฏิกรณ์แบบกะ (ก) และในถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุ (ข) เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของพาราเซตามอล

จากผลการศึกษาจะเห็นว่า การทดลองในถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องให้ประสิทธิภาพการกำจัดสูงกว่าการทดลองในถังปฏิกรณ์แบบกะ ผลดังกล่าวเกิดจากในชุดทดลองแบบกะ สารผลิตภัณฑ์เมื่อเกิดขึ้นยังคงค้างในระบบซึ่งอาจขัดขวางการจับกันระหว่างสารตั้งต้นกับเอนไซม์ แต่ในระบบการไหลแบบต่อเนื่องในหอบรรจุ สารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะถูกแยกออกทันทีไม่เกิดการตกค้างในระบบ ซึ่งอาจช่วยลดผลกระทบต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จากสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

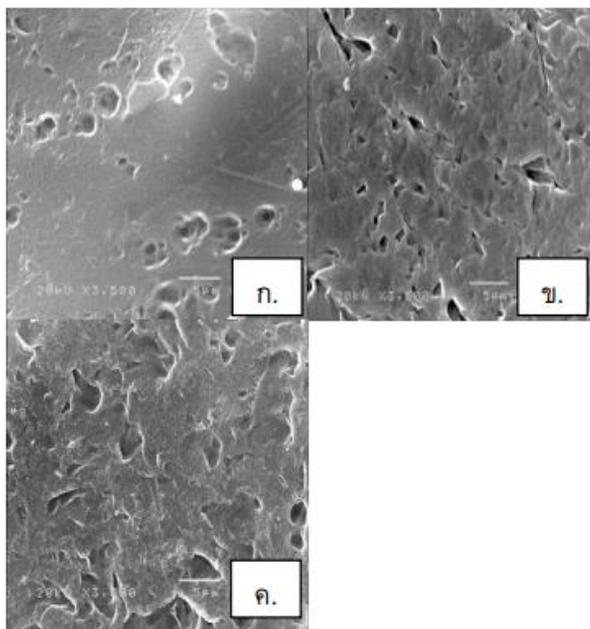
เมื่อพิจารณากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แลคเคสตรังเหลือ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพาราเซตามอล ส่งผลให้กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ลดลง ซึ่งอาจเกิดจากการรั่วไหลของเอนไซม์ออกจากเม็ดตริง และความเข้มข้นของพาราเซตามอลที่สูงขึ้นอาจส่งผลต่อโครงสร้างของวัสดุตัดกีด ทำให้เกิดรูพรุนเพิ่มขึ้นและขนาดรูพรุนใหญ่ขึ้น จึงส่งผลให้การรั่วไหลของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของพาราเซตามอล สำหรับการทดลองในถังปฏิกรณ์แบบกะ (รูปที่ 4ก) พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 240 นาที คงเหลือค่ากิจกรรมการ



รูปที่ 5 สีของเม็ดเอนไซม์ตริงเวลา 4 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 100 mg/L เทียบกับเม็ดเอนไซม์ตริงก่อนเข้าระบบ

ทำงานที่ 92.04 ± 4.98 , 85.00 ± 3.21 , 82.14 ± 4.09 , 81.06 ± 5.41 และ 75.69 ± 2.44 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของพาราเซตามอล 1-100 mg/L ตามลำดับ และในถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุ พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของพาราเซตามอล ส่งผลต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เช่นเดียวกัน โดยเมื่อเวลาผ่านไป 240 นาที มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เหลือที่ 98.11 ± 0.51 , 97.72 ± 0.91 , 94.23 ± 0.34 , 93.02 ± 1.97 และ 87.76 ± 0.73 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4ข) เมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมการทำงานที่เหลือของทั้ง 2 ถังปฏิกรณ์พบว่าในถังปฏิกรณ์แบบกะเหลือน้อยกว่าในถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุ โดยสาเหตุนอกจากการรั่วไหลของเอนไซม์และความเข้มข้นของพาราเซตามอลที่ส่งผลต่อโครงสร้างของเม็ดตริงที่กล่าวข้างต้นแล้ว อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของพาราเซตามอลที่สูงขึ้นก่อให้เกิดการสะสมของสารผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นในถังปฏิกรณ์แบบกะ สารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นอาจจะเข้าไปเกาะกับเอนไซม์ขัดขวางการจับกันระหว่างสารตั้งต้นกับเอนไซม์ ส่งผลให้กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ลดลง ในขณะที่ถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะไหลออกอย่างต่อเนื่องและไม่ถูกสะสมค้างในระบบจึงทำให้กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่เหลือสูงกว่าในถังปฏิกรณ์แบบกะ

และจากการเพิ่มความเข้มข้นพาราเซตามอลส่งผลให้สีของเม็ดเอนไซม์แลคเคสตรังเข้มข้น (รูปที่ 5ข) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์เสื่อมสภาพการทำงานทดสอบที่ความเข้มข้น 100 mg/L (รูปที่ 5ก) พบว่าเอนไซม์แลคเคสตรังเสื่อมสภาพไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีของเม็ดเอนไซม์ตริง ผลดังกล่าวที่เกิดขึ้นเกิดจากสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเข้าไปจับใน

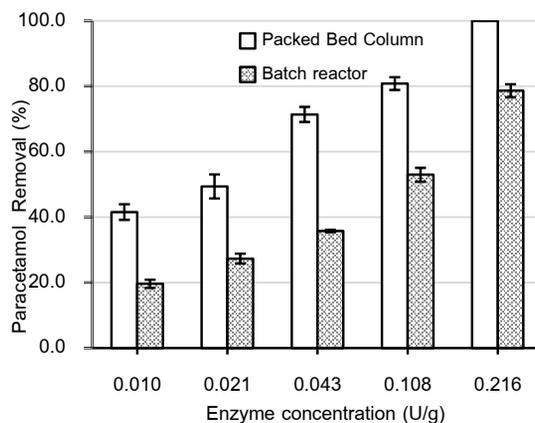


รูปที่ 6 ภาพพื้นผิวของเอนไซม์แลคเคสตรังก่อนนำไปใช้งาน (ก) หลังใช้งานกับพาราเซตามอลที่ความเข้มข้น 1 mg/L (ข) และหลังใช้งานกับพาราเซตามอลที่ความเข้มข้น 100 mg/L (ค) ภายใต้กล้อง SEM ที่กำลังขยาย 3500 เท่า

โครงสร้างของเม็ดเอนไซม์ตรึงจึงส่งผลให้มีพื้นที่เพิ่มขึ้นซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ahmed Azizi [16] ซึ่งทำการศึกษากำจัดฟีนอลด้วยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากหัวผักกาดโดยตรงด้วยเทคนิคการดักติดด้วยแคลเซียมแอลจีเนต พบว่าเม็ดเอนไซม์ตรึงแคลเซียมแอลจีเนตมีพื้นที่เพิ่มขึ้นซึ่ง Ahmed Azizi อธิบายว่าลักษณะของสีที่เกิดขึ้นดังกล่าวเกิดจากสารผลิตภัณฑ์ที่เข้าไปจับกับโครงสร้างของเม็ดแคลเซียมแอลจีเนต เมื่อนำเอนไซม์แลคเคสตรึงที่ผ่านการนำไปใช้ในการกำจัดพาราเซตามอลจากชุดการศึกษาความ

เข้มข้นของพาราเซตามอล 1 mg/l และ 100 mg/l เปรียบเทียบกับเอนไซม์แลคเคสตรึงที่ไม่ผ่านการใช้งานไปส่องดูพื้นผิวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่ กำลังขยาย 3500 เท่า (Scanning Electron Microscope; SEM) (รูปที่ 6)

พบว่าลักษณะของพื้นผิวของเอนไซม์แลคเคสตรึงก่อนใช้งานมีลักษณะพื้นผิวเรียบ มีรูเล็กน้อย (รูปที่ 6ก) และเมื่อนำเอนไซม์แลคเคสตรึงหลังใช้งานกับพาราเซตามอลที่ความเข้มข้น 1 mg/l (รูปที่ 6ข) มาส่องพบว่าลักษณะของพื้นผิวขรุขระเพิ่มขึ้นและลักษณะรูพรุนของเม็ดเอนไซม์แลคเคสตรึง

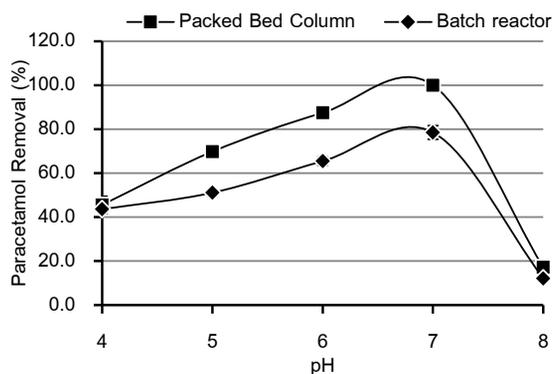


รูปที่ 7 เปรอ์เซ็นต์การกำจัดพาราเซตามอลเมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เวลา 120 นาที

ยังเหมือนก่อนการนำไปใช้งาน เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้งานที่ความเข้มข้นของพาราเซตามอล 100 mg/l (รูปที่ 6ค) พบว่าลักษณะผิวของเอนไซม์ตรึงผิวไม่เรียบและมีผิวขรุขระเพิ่มมากขึ้นและขนาดรูพรุนมีขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งลักษณะดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มพาราเซตามอลส่งผลต่อลักษณะโครงสร้างของเม็ดเอนไซม์ตรึง ซึ่งจะส่งผลให้เม็ดเอนไซม์ตรึงเสื่อมสภาพได้เมื่อมีการใช้งานเป็นระยะเวลานาน

ผลของการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์

การศึกษากำจัดพาราเซตามอลเมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเอนไซม์ โดยศึกษาที่ความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคส 0.010-0.216 U/g-alginate ถูกนำมาใช้ในถึงปฏิกรณ์แบบกะและถึงปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุ เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการกำจัดพาราเซตามอล โดยควบคุมสารละลายพาราเซตามอลที่ความเข้มข้น 1 mg/l ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย 7 จากการศึกษาพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคสมากขึ้นประสิทธิภาพการกำจัดมีค่าเพิ่มขึ้นซึ่งสอดคล้องกับที่เกิดขึ้นในถึงปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุ และเมื่อศึกษากำจัดในช่วงเวลาการทำปฏิกิริยาต่างๆ พบว่าการกำจัดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นและเริ่มคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 120 นาที (ไม่ได้แสดงผล) สำหรับในถึงปฏิกรณ์แบบกะพบว่าความเข้มข้นเอนไซม์แลคเคสตรึง 0.216 U/g-alginate ให้ประสิทธิภาพการกำจัดสูงสุดที่ 78.64 ± 1.98 และค่าการกำจัดต่ำสุดที่ 19.64 ± 1.26 เปรอ์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.216 และ 0.010 U/g-alginate ตามลำดับ และมีค่าการกำจัดที่



รูปที่ 8 เปรอเซ็นต์การกำจัดพาราเซตามอลเมื่อเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของสารละลาย ที่เวลา 120 นาที

52.95 ± 2.12, 35.77 ± 0.36 และ 27.35 ± 1.512 เปรอเซ็นต์เมื่อใช้เอนไซม์ 0.108, 0.043 และ 0.021 U/g-alginate ตามลำดับ สำหรับถึงปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุมีประสิทธิภาพการกำจัดที่ 100, 80.83 ± 1.95, 71.40 ± 2.30, 49.40 ± 3.67 และ 41.56 ± 2.39 เปรอเซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.216, 0.108, 0.043, 0.021 และ 0.010 U/g-alginate ตามลำดับ (รูปที่ 7)

จากผลการศึกษาทั้งสองกรณีข้างต้นจะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพการกำจัดขึ้นอยู่กับปริมาณของเอนไซม์ที่เข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น ซึ่งพบว่าการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์แลคเคสส่งผลให้การกำจัดมากขึ้น ทำให้ปริมาณพาราเซตามอลเหลือในระบบน้อยลงตามไปด้วยซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ostadhadi-Dehkordi, Tabatabaei-Sameni [17] ซึ่งศึกษาการกำจัด benzodiazepines ด้วยเอนไซม์แลคเคสบริสุทธิ์ (*P. variabile*) ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคส (5–30 U/ml) ส่งผลให้ค่าประสิทธิภาพการกำจัดสูงขึ้นและงานวิจัยของ Maalej-Kammoun, Zouari-Mechichi [18] ทำการศึกษาการกำจัดสีมาลาไคท์กรีน (Malachite Green ; MG) ด้วยเอนไซม์แลคเคสจากเชื้อ *Trametes sp.* ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเอนไซม์ (0.01–1 U/ml) ที่ความเข้มข้นของสี MG 50 mg/l ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดเพิ่มขึ้น และประสิทธิภาพการกำจัดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 2 ชั่วโมงแรกและหลังจากนั้นจะเริ่มคงที่

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาในการกำจัดพาราเซตามอลต่อความเข้มข้นของเอนไซม์แลคเคสตรง พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์มีผลต่ออัตราเร็วเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยา กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เพิ่มตามไปด้วย โดยพบว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์เริ่มคงที่เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ 0.108 U/g-alginate มีอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาที่ 0.136 μM/min สำหรับการทดลองในถังปฏิกรณ์แบบกะ และ 0.222 μM/min ที่ความเข้มข้นเอนไซม์ 0.216 U/g-alginate สำหรับการทดลองในถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุ

ผลของการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลาย

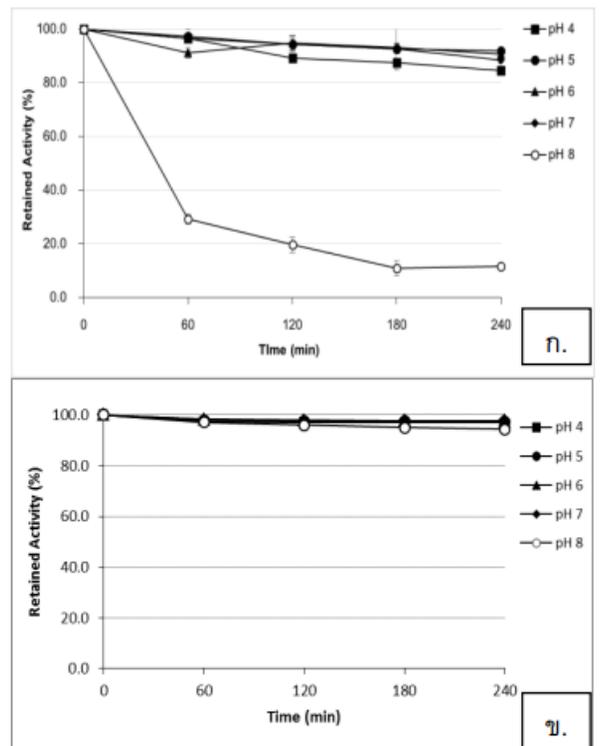
การศึกษากการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของพาราเซตามอลต่อการกำจัดพาราเซตามอลด้วยเอนไซม์แลคเคสตรง ทำการศึกษาที่ค่าพีเอช 4–8 ที่พาราเซตามอล ความเข้มข้น 1 mg/L ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 8 เมื่อเพิ่มค่าพีเอช (4 – 7) ส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดมีค่าเพิ่มขึ้นแต่เมื่อค่าพีเอชของน้ำป็นป้อนพาราเซตามอลเท่ากับ 8 ส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดลดลง โดยมีประสิทธิภาพกำจัดสูงสุดที่ค่าพีเอช 7 ผลการศึกษาสอดคล้องกันทั้งในถังปฏิกรณ์แบบกะและถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุ โดยสามารถเรียงประสิทธิภาพการกำจัดที่เวลา 120 นาที จากมากไปน้อยได้ดังนี้ 43.60 ± 1.59, 51.12 ± 1.53, 65.47 ± 1.89, 78.53 ± 3.07 และ 12.20 ± 0.92 เปรอเซ็นต์ ที่พีเอช 4, 5, 6, 7 และ 8 ตามลำดับ สำหรับการทดลองในถังปฏิกรณ์แบบกะ และที่ 45.59 ± 3.86, 69.84 ± 1.65, 87.48 ± 1.72, 100 และ 17.17 ± 1.97 เปรอเซ็นต์ ที่พีเอช 4, 5, 6, 7 และ 8 ตามลำดับ สำหรับการทดลองในถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุ

ผลการศึกษาอธิบายได้ว่าความสามารถของเอนไซม์ในการเข้าจับกับสารตั้งต้นและการเร่งปฏิกิริยาอาจขึ้นอยู่กับความสมดุลของประจุบริเวณเร่ง (active site) รวมทั้งประจุของสารตั้งต้นที่เข้าทำปฏิกิริยาด้วย โดยที่ค่าพีเอชสูงหรือต่ำเกินไปอาจทำให้ประจุเปลี่ยนจนไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากันได้หรือเกิดปฏิกิริยาได้น้อยลง และนอกจากนี้ที่ค่าพีเอช สูงมากหรือต่ำมาก อาจทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เสียสภาพได้

โดยทั่วไปเอนไซม์แลคเคสจากเชื้อราจะทำงานได้ดีที่ช่วงพีเอช 3-7 เมื่อใช้ทดสอบร่วมกับฟีนอลและอนุพันธ์ของฟีนอล [6]

สำหรับการศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อค่าพีเอชของสารละลาย พาราเซตามอลเพิ่มขึ้นจาก 4-7 ส่งผลให้ประสิทธิภาพการ กำจัดพาราเซตามอลสูงขึ้นตามไปด้วย แต่เมื่อเพิ่มค่าพีเอชเป็น 8 ทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดลดลงเนื่องจากค่าพีเอช ดังกล่าวทำให้ความเข้มข้นของ OH^- เพิ่มขึ้น ซึ่ง OH^- เป็นตัว ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ โดยจะเข้าไปจับกับ Cu^{2+} ที่ ตำแหน่ง T2/T3 ส่งผลให้ไม่สามารถรับอิเล็กตรอนจาก ตำแหน่ง T1 [6] จึงส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดมีค่าลดลง และ สำหรับงานวิจัยนี้พบว่าแลคเคสตรึงสามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 7 ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Sarnthima (2009) [19] ศึกษาการ พอกางสีเคมีสังเคราะห์ด้วยแลคเคสจากเชื้อ *L. polychrous* Lév. ผลการศึกษาพบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในช่วงพี เอช 3-4 และช่วงพีเอช 7-9 โดยมีคาร์้อยละการกำจัดสูงสุด ที่ร้อยละ 98.1 ที่พีเอช 7 เมื่อเวลาผ่านไป 16 ชั่วโมง และ งานวิจัยของ Modaressi (2005) [20] ศึกษาการกำจัดบิส ฟีนอลเอ (bisphenol-A) ด้วยแลคเคสจากสายพันธุ์ SP504 พบว่าสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 4-5 และช่วงพีเอช 7- 10 และงานวิจัยของ Maalej Kammoun (2009) [18] ทำการศึกษาการกำจัดสีมาลาไคท์กรีน (Malachite Green ; MG) ด้วยแลคเคสจากเชื้อ *Trametes sp.* ศึกษาการ เปลี่ยนแปลงพีเอชที่ 2-8 ผลการศึกษาพบว่าแลคเคสทำงานได้ ดีที่พีเอช 5 และ 6 โดยที่พีเอช 6 ให้ค่าการกำจัดสูงสุด ประมาณร้อยละ 80 เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง และงานวิจัย ของ Daassi (2014) [15] พบว่าเอนไซม์แลคเคสจาก *Coriolopsis gallica* ตรึงด้วยแคลเซียมแอลจีเนต (Ca-alginate) มีเสถียรภาพในการทำงานได้ดีที่ค่าพีเอช 6-7 เมื่อ ใช้ ABTS เป็นสารตั้งต้น

เมื่อพิจารณาถึงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชต่อกิจกรรมการ ทำงานของเอนไซม์แลคเคสตรึงในถังปฏิกรณ์แบบกะ (รูปที่ 9 ก) ผลการศึกษาพบว่าเอนไซม์แลคเคสตรึงมีเสถียรภาพที่ค่าพี เอชในช่วง 4-7 โดยมีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เมื่อ เวลาผ่านไป 240 นาที คงเหลือมากกว่าร้อยละ 80 แต่เมื่อเพิ่ม ค่าพีเอชเป็น 8 ส่งผลให้ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ แลคเคสตรึงลดลงอย่างรวดเร็ว ต่ำกว่าร้อยละ 20 ซึ่งเกิดจาก OH^- ที่เพิ่มขึ้นและส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของแลค



รูปที่ 9 กิจกรรมการทำงานของแลคเคสตรึงในถังปฏิกรณ์แบบกะ (ก) และในถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุ (ข) เมื่อมีการ เปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของสารละลาย

เคส ในขณะที่กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์ แบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุที่เวลา 240 นาที (รูปที่ 9ข) มีค่า กิจกรรมคงเหลือมากกว่าร้อยละ 90 ที่ค่าพีเอช 4-8 แสดงให้ เห็นว่าเมื่อใช้แลคเคสตรึงในถังปฏิกรณ์แบบกะถูกแช่ใน สารละลายที่พีเอชต่างๆ ทำให้เสถียรภาพเอนไซม์เปลี่ยนแปลง ได้อย่างชัดเจน ส่วนในถังปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุ เสถียรภาพการทำงานของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงน้อยอาจ เนื่องจากสารละลายไหลผ่านเอนไซม์ตรึงอย่างต่อเนื่อง ระยะเวลาสัมผัสของเอนไซม์ตรึงกับสารละลายจึงน้อยกว่า อย่างไรก็ตามถึงแม้เสถียรภาพของเอนไซม์ที่พีเอช 8 ในถัง ปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุจะลดลงเพียงเล็กน้อย แต่ ความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยากับพาราเซตามอลที่พีเอช ดังกล่าวมีค่าน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับที่ค่าพีเอช 4-7

4. สรุป

การศึกษากำจัดพาราเซตามอลด้วยเอนไซม์แลคเคส ตรึงด้วยแบเรียมแอลจีเนตในถังปฏิกรณ์แบบกะและถังปฏิกรณ์ แบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุ พบว่าเอนไซม์แลคเคสตรึง

สามารถกำจัดพาราเซตามอลได้ถึงร้อยละ 78.64 สำหรับถึงปฏิกรณ์แบบกะ และร้อยละ 100 สำหรับถึงปฏิกรณ์แบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุ ที่พาราเซตามอลความเข้มข้น 1 mg/l เอนไซม์แลคเคสตรึง 0.216 U/g-alginate ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์แลคเคสตรึงมีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้กำจัดพาราเซตามอลได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนบางส่วนจากศูนย์ประสานงานนักเรียนทุนรัฐบาลทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (รหัสโครงการ SCH-NR2012-242) และขอขอบคุณหลักสูตรบัณฑิตศึกษา สาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่วิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- [1] Muir N, Nichols JD, Stillings MR, Sykes J. Comparative bioavailability of aspirin and paracetamol following single dose administration of soluble and plain tablets. *Current Medical Research and Opinion*. 1997; 13(9): 491-500.
- [2] Stumpf M, Ternes TA, Wiken RD, Rodrigues SV, Baumann W. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Science of The Total Environment*. 1999; 225(1-2): 135-141.
- [3] Andreozzi R, Caprio V, Marotta R, Vogna D. Paracetamol oxidation from aqueous solutions by means of ozonation and H₂O₂/UV system. *Water Research*. 2003; 37(5): 993-1004.
- [4] Su C-C, Chang A-T, Bellotindos LM, Lu M-C. Degradation of acetaminophen by fenton and electro-fenton processes in aerator reactor. *Separation and Purification Technology*. 2012; 99: 8-13.
- [5] Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G. Laccases: A never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2010; 67(3): 369-385.
- [6] Madhavi V, Lele SS. Laccase: Properties and applications. *BioResources*. 2009; 4(4): 1694-1717.
- [7] Khelifi R, Belbahri L, Woodward S, Ellouz M, Dhouib A, Sayadi S, et al. Decolourization and detoxification of textile industry wastewater by the laccase-mediator system. *Journal of Hazardous Materials*. 2010; 175(1-3): 802-808.
- [8] Zeng X, Cai Y, Liao X, Zeng X, Li W, Zhang D. Decolorization of synthetic dyes by crude laccase from a newly isolated *Trametes trogii* strain cultivated on solid agro-industrial residue. *Journal of Hazardous Materials*. 2011; 187(1): 517-525.
- [9] Khammuang S, Sarnthima R. Laccase from spent mushroom compost of *Lentinus polychrous* Lev. and its potential for remazol brilliant blue R decolourisation. *biotechnology*. 2007; 6(3): 408-413.
- [10] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72(1-2): 248-254.
- [11] Nagendra P. Spectrophotometric estimation of Paracetamol in bulk and pharmaceutical formulations. *E-Journal of Chemistry*. 2011; 8(1): 149-152.
- [12] Niladevi KN, Prema P. Immobilization of laccase from *Streptomyces psammoticus* and its application in phenol removal using packed bed reactor. *World Journal Microbiol Biotechnol*. 2008; 24: 1215-1222.
- [13] Riaz A, Ul Qader SA, Anwar A, Iqbal S. Immobilization of a thermostable α - amylase on Calcium alginate beads from *Bacillus subtilis* KIBGE-HAR. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2009; 3(3): 2883-2887.

- [14] Lei L, Min Z, Yan W. Immobilization of laccase by alginate–chitosan microcapsules and its use in dye decolorization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2006; 23(2): 159–166.
- [15] Daâssi D, Rodriguez-Couto S, Nasri M, Mechichi T. Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from *Corioloopsis gallica* into Ca-alginate beads. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2014; 90: 71–78.
- [16] Azizi A, Abouseoud M, Ahmedi A. Phenol removal by soluble and alginate entrapped turnip peroxidase. *Journal of Biochemical Technology*. 2014; 5(4): 795–800.
- [17] Ostadhadi-Dehkordi S, Tabatabaei-Sameni M, Forootanfar H, Kolahdouz S, Ghazi-Khansari M, Faramarzi MA, Degradation of some benzodiazepines by a laccase-mediated system in aqueous solution. *Bioresource Technology*. 2012; 125: 344–347.
- [18] Maalej-Kammoun M, Zouari-Mechichi H, Belbahri L, Woodward S, Mechichi T. Malachite green decolourization and detoxification by the laccase from a newly isolated strain of *Trametes* sp. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2009; 63(5): 600–606.
- [19] Sarnthima R, Khammuang S, Svasti J. Extracellular ligninolytic enzymes by *Lentinus polychrous* Lév. under solid-state fermentation of potential agro-industrial wastes and their effectiveness in decolorization of synthetic dyes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2009; 14(4): 513–522.
- [20] Modaressi K, Taylor KE, Bewtra JK, Biswas N. Laccase-catalyzed removal of bisphenol-A from water: protective effect of PEG on enzyme activity. *Water Res*. 2005; 39(18): 4309–4316.