

**Removal of Phenol Catalyzed by Peroxidase
from Local Thai Plants**
การเร่งปฏิกิริยาการกำจัดฟีนอลโดยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส
จากพืชพื้นบ้านไทย

C. Yimthin

Faculty of science and technology, Rajamangala University
of Technology Suvannabumi, Thailand.

E-mail : chuensumon_2007@hotmail.com

Abstract

This study focuses on the removal of phenol by crude peroxidase from winged bean, ivy gourd and swamp cabbage. The extraction of crude peroxidase from swamp cabbage with phosphate buffer exhibited the highest activity (6.31 units per gram of plant). The peroxidase activity was measured using a reaction mixture consisting of 4-aminoantipyrine, phenol and hydrogen peroxide. The conditions for removal of phenol using phenol concentration of 100 ppm, 1 % w/w of H_2O_2 , 50 minutes of reaction time, pH 7.0 and 3 units of crude enzyme and phosphate buffer as solvent at 30 °C. The efficiency of phenol removal by crude peroxidase from swamp cabbage was achieved to 90.23 %.

Keywords: phenol, peroxidase, winged bean, ivy gourd, swamp cabbage.

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มุ่งเน้นการเร่งปฏิกิริยาการกำจัดฟีนอลโดยสารสกัดหยาบของเอ็นไซม์เพอร์ออกซิเดสจากถั่วพู ตำลึง และผักบุ้งไทย สารสกัดหยาบของเอ็นไซม์เพอร์ออกซิเดสจากผักบุ้งไทยที่สกัดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จะมีปริมาณของเอ็นไซม์เพอร์ออกซิเดสสูงที่สุด (6.31 หน่วยต่อกรัมของพืช) ปริมาณของเอ็นไซม์เพอร์ออกซิเดสหาได้จากปฏิกิริยาของ 4-แอมิโนแอนทิไพรีน ฟีนอล และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ส่วนภาวะที่ใช้ในการกำจัดฟีนอลจะใช้ฟีนอลเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยาเท่ากับ 50 นาที พีเอช 7.0 และ 3 หน่วยของสารสกัดหยาบของเอ็นไซม์เพอร์ออกซิเดสที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นตัวทำละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาการกำจัดฟีนอลโดยสารสกัดหยาบของเอ็นไซม์เพอร์ออกซิเดสจากผักบุ้งไทยให้ผลการกำจัดสูงถึง 90.23 เปอร์เซ็นต์

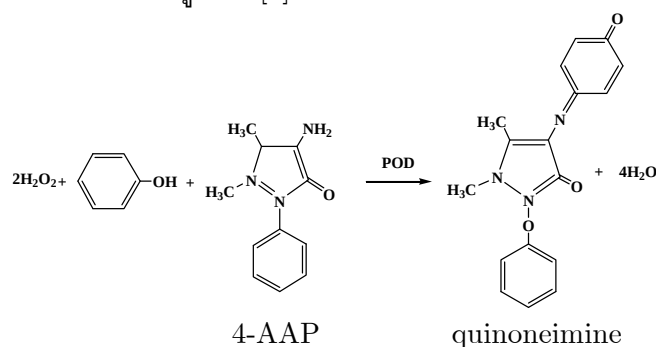
คำสำคัญ: ฟีนอล เพอร์ออกซิเดส ถั่วพู ตำลึง ผักบุ้งไทย

บทนำ

ฟีนอลเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูง และมีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมเรซิน พลาสติก อุตสาหกรรมปิโตรเคมี การผลิตสีย้อม โรงงานกระดาษ และอื่นๆ [3] อุตสาหกรรมต่างๆดังกล่าวข้างต้นนั้นมีการปล่อยน้ำทิ้งจากการผลิตที่อาจมีฟีนอลปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ถ้าในน้ำธรรมชาติมีปริมาณฟีนอลที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ มีผลทำให้ค่าความต้องการออกซิเจนทางชีวเคมี (BOD) สูงขึ้น และถ้าความเข้มข้นของฟีนอลสูงกว่นี้จะทำลายออกซิเจนในโมเลกุลของน้ำให้หมดไป ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ [1] ในปัจจุบันมีแนวทางหลายแนวทางที่จะใช้ในการกำจัดฟีนอลทั้งการสกัดด้วยตัวทำละลาย การดูดซับบนถ่านกัมมันต์ และการออกซิเดชันทางเคมี [3] แนวทางที่สนใจศึกษาในงานวิจัยนี้เป็นแนวทางที่เกี่ยวข้องกับการใช้สารเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ (เอนไซม์) โดยเลือกศึกษาเอ็นไซม์เพอร์ออกซิเดสที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบแทนที่จะใช้เอ็นไซม์ที่บริสุทธิ์มาเร่งปฏิกิริยาการกำจัดฟีนอล ซึ่งเป็นการลดทั้ง

กระบวนการ ค่าใช้จ่าย และเวลาที่ใช้ในการแยกเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังเป็นการลดปัญหามลพิษทางน้ำ

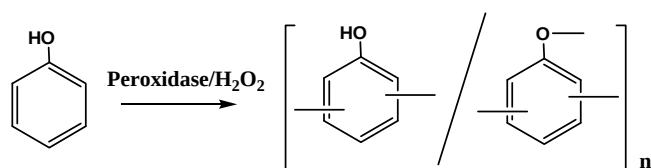
การหาปริมาณของเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสนั้นหาจากการเกิดปฏิกิริยาของฟีนอล 4-อะมิโนแอนทิไพรีน และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยมีเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ ดังแสดงในรูปที่ 1 [2]



รูปที่ 1 แสดงปฏิกิริยาของฟีนอลกับ 4-อะมิโนแอนทิไพรีน โดยมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส

จากรูปที่ 1 ฟีนอลจะทำปฏิกิริยากับ 4-อะมิโนแอนทิไพรีน โดยมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัวออกซิไดส์ ซึ่งจะได้สารประกอบ quinoneimine ที่มีสีแดง นำสารประกอบ quinoneimine ไปวัดปริมาณที่เกิดขึ้น

ส่วนปฏิกิริยาการกำจัดฟีนอลจะใช้ปฏิกิริยาของฟีนอลกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยมีเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารพวกลิกโพลิเมอร์ที่มีความเป็นพิษน้อยกว่าฟีนอล ดังแสดงในรูปที่ 2 [5]



รูปที่ 2 แสดงปฏิกิริยาของฟีนอลกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยมีเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ในปัจจุบันได้มีการนำเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่มีความบริสุทธิ์ต่ำมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยากำจัดฟีนอลโดยให้ประสิทธิภาพในการกำจัดฟีนอลค่อนข้างสูง [4] ในบางครั้งวัตถุดิบที่นำมาอาจหาได้ไม่มากนัก ในขณะที่ถั่วพู ตำลึง และผักบุ้งไทย เป็นพืชพื้นบ้านที่หาได้ง่ายมาก สำหรับการนำพืชพื้นบ้านมาสกัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในรูปสารสกัดหยาบ

งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาเกี่ยวกับการใช้สารเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ โดยเลือกศึกษาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในรูปสารสกัดหยาบจากถั่วพู ตำลึง และผักบุ้งไทย มาใช้ในการกำจัดฟีนอล เพื่อลดปัญหามลพิษทางน้ำ และเป็นการเพิ่มมูลค่าของถั่วพู ตำลึง และผักบุ้งไทยให้เกิดการนำมาใช้ประโยชน์ให้มากขึ้น นอกจากนี้การกำจัดฟีนอลโดยเอนไซม์ยังไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

วัสดุและวิธีการวิจัย

วัสดุ

ใช้เครื่องยูวีวิสิเบิลสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ของ Thermo Scientific Evolution 300 UV-Vis วัดการดูดกลืนแสงในการหาปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และหาปริมาณของฟีนอล ส่วนสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่ ฟีนอล และ 4-อะมิโนแอนทิไพรีนของ Fluka ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของ Ajax Finechem ไตรโพรแทสเซียมเฮกซะไฮยาโนเฟอร์เรตของ Carlo erba ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ของ J.T. Baker Philipsburg สารเคมีที่ใช้เป็นสารเคมีเกรดวิเคราะห์ (AR Grade)

วิธีการวิจัย

การสกัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในรูปสารสกัดหยาบจากถั่วพู ตำลึง และผักบุ้งไทย โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่เตรียมจากไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตกับโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ในการสกัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสใช้พืชสดที่ปั่นละเอียดหนัก 20 กรัมต่อสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 200 กรัม แล้วกรอง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงจนได้สารละลายใส นำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากปฏิกิริยาของ 4-อะมิโน

แอนทีไพรีน ฟีนอล และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยใช้เครื่องสเปกโตรสโกปี [2] ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร คำนวณปริมาณเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสในหน่วยยูนิตต่อกรัมของพืช

ส่วนการกำจัดฟีนอลจะใช้ฟีนอลเข้มข้น 100 พีพีเอ็ม ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาตร 5 มิลลิลิตรและ 3 ยูนิตของสารสกัดหยาบของเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นตัวทำละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เติมน้ำโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 โดยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ส่วนเวลาที่ใช้ในการกำจัดฟีนอลเท่ากับ 50 นาที นำสารละลายที่มีฟีนอลเหลืออยู่ไปทำปฏิกิริยากับ 4-อะมิโนแอนติไพรีน เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลายไตรโพรแทสเชื่อมเฮกซะไซยาโนเฟอร์เรต เข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา 15 นาที นำไปสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 460 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณของฟีนอลที่เหลืออยู่

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การสกัดเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสในรูปสารสกัดหยาบจากถั่วพู ตำลึง และผักบุ้งไทย นั้น จะถูกนำไปคำนวณหาปริมาณเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส จากค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไป ต่อเวลาที่ ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร ดังแสดงในตารางที่ 1

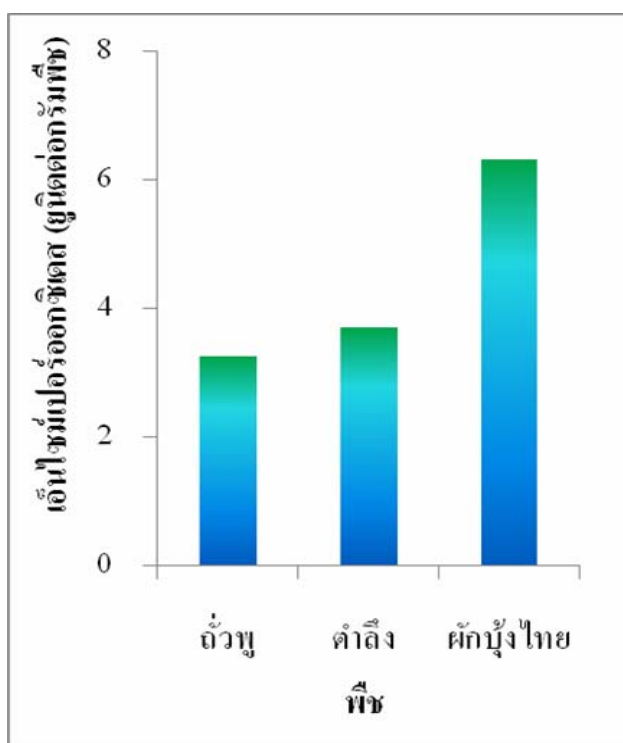
ตารางที่ 1 แสดงปริมาณเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสในพืช

พืช	ΔA_{510} ต่อนาที	ปริมาณเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส (ยูนิตต่อกรัมของพืช)
ถั่วพู	0.732	3.71
ตำลึง	0.643	3.26
ผักบุ้งไทย	1.246	6.31

จากตารางที่ 1 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปต่อนาที่ ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร นั้นผักบุ้งไทยมีค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปต่อนาที่สูงที่สุดคือ 1.246 รองลงมาคือ ถั่วพู และตำลึง ซึ่งมีค่า 0.732 และ 0.643 ตามลำดับ

จากค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปต่อนาที่ ที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร สามารถนำมาหาปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในพืชแต่ละชนิดซึ่งมีปริมาณที่แตกต่างกัน โดยปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในถั่วพู ตำลึง และผักบุ้งไทยมีปริมาณเท่ากับ 3.71, 3.26 และ 6.31 ยูนิตต่อกรัมของพืช ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3

ปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในพืชแต่ละชนิดซึ่งมีปริมาณที่แตกต่างกัน เนื่องมาจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน

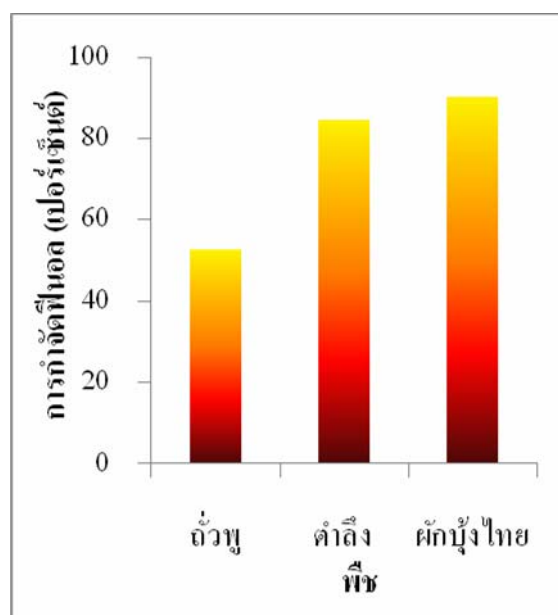


รูปที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของถั่วพู ตำลึง และผักบุ้งไทย

ส่วนการเร่งปฏิกิริยาการกำจัดฟีนอลของเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสจากถั่วพู ตำลึง และ ผักบุ้งไทยพบว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดฟีนอลเท่ากับ 52.78, 84.62 และ 90.23 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4

ประสิทธิภาพของการเร่งปฏิกิริยาการกำจัด ฟีนอลโดยเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสที่มีความแตกต่างกัน เนื่องจากเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นเอ็นไซม์ที่มีอยู่ในพืชหลายชนิด โดยเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสในพืชแต่ละชนิดจะอยู่ในกลุ่มที่แตกต่างกัน ทำให้ประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไม่เท่ากันนั่นเอง

จากผลการทดลอง พบว่าผักบุ้งไทยมีปริมาณเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสค่อนข้างสูง และยังมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาการกำจัดฟีนอลสูงทั้งที่เอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสอยู่ในรูปสารสกัดหยาบ แต่ถ้าต้องการผลิตเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสที่มีความบริสุทธิ์สูง ผักบุ้งไทย นับเป็นพืชพื้นบ้านไทยอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ เพราะมีราคาถูก และหาได้ง่ายมาก



รูปที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบการเร่งปฏิกิริยาการกำจัดฟีนอลของเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสในถั่วพู ตำลึง และผักบุ้งไทย

สรุป

การสกัดเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสในรูปสารสกัดหยาบจากผักบุ้งไทยมีปริมาณเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงกว่าตำลึงและถั่วพู โดยมีปริมาณสูงถึง 6.31 ยูนิตต่อกรัมของพืช) ส่วนการเร่งปฏิกิริยาการกำจัดฟีนอลนั้น พบว่าเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสจากผักบุ้งไทยมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาการกำจัดฟีนอลสูงที่สุดถึง 90.23 %

จากผลการวิจัยนี้พบว่าในพืชพื้นบ้านของไทย ซึ่งเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ง่าย หาง่าย ในท้องถิ่น มีราคาถูก เช่น ถั่วพู ตำลึง และผักบุ้งไทย ซึ่งสามารถนำมาสกัดเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส เพื่อนำมาไปใช้ในการกำจัดฟีนอล โดยไม่จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์ เป็นการลดต้นทุนในการกำจัดฟีนอล ซึ่งให้ประสิทธิภาพสูง และไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ ที่ให้การสนับสนุนด้านงบประมาณในการดำเนินงานวิจัย และขอขอบคุณสาขาวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่ เครื่องมือในการดำเนินงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- [1] วินัย อวงพิพัฒน์ และสุภาภรณ์ สุโพธิ์. มกราคม 2543. การกำจัดฟีนอลโดยใช้เอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสในพืช. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาทางวิชาการสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 17. ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพฯ, 766 – 771.
- [2] Chaplin, M.F. and Bucke, C. Enzyme Technology. Cambridge University Press. (1990). Retrieved November 25, 2003, from <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enzyme/practical2.html>.
- [3] Klivanov A.M., Alberti, B. N., Morris, E. D. and Felshin, L. M. Enzymatic Removal of Toxic Phenols and Anilines from Waste waters, *J. Appl. Biochem.* 2 (1980) 414 – 421.

- [4] Wilberg, K.Q., Nunes, D.G. and Rubio J. Removal of Phenol by Enzymatic Oxidation and Flotation, *Braz. J. Chem. Eng.* 17 (2000) 851-857.
- [5] Uyama, H., Kurioka, H. and Kobayashi, S. Preparation of Polyphenol Particles by Peroxidase-Catalyzed Dispersion Polymerization, *Colloids Surf. A.* 153 (1999) 189-194.