การสลายสีเมททิลีนบลูของเม็ดบีทที่ตรึงสารสกัดหยาบใบรางจืด

Methylene blue decolorization using bead immobilized *Thunbergia laurifolia* Linn. leaf extract

ฐิติกร พรหมบรรจง[1*] ธนากรณ์ ดำสุด[1] เขมมิการ์ โขมพัตร[2] และ สุวรรณา ผลใหม่[1]

[1] สาขาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย (วิทยาเขตนครศรีธรรมราช) นครศรีธรรมราช 80110

[2] สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ สงขลา 90110

Thitikorn Prombanchong[1*], Thanakorn Damsud[1], Khemmikar Khompatara[2] and Suwanna Pholmai[1]

[1] Division of Science, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya (Nakhon Si Thammarat campus), Nakhon Si Thammarat 80110

[2] Office of Agricultural Research and Development Region 8, Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Songkhla 90110

Received: 15 July 2019/ Revised: 8 December 2019/ Accepted: 24 December 2019

บทคัดย่อ

สีเมททิลีนบลูเป็นสีที่ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกย้อมเครื่องหนังและขนสัตว์ เป็นอุตสาหกรรมที่ก่อให้เกิดน้ำเสียที่มีสีปนเปื้อน ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตและระบบนิเวศในน้ำ งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเม็ดบีทที่ตรึงสารสกัดหยาบจากใบรางจืด ซึ่งมีเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่มีความสามารถในการสลายสีย้อม โดยศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และความสามารถในการสลายสีย้อมของเม็ดบีทรางจืดที่สภาวะพีเอช และอุณหภูมิต่าง ๆ สารสกัดหยาบใบรางจืดระยะใบกลางมีกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสสูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 21,911.25±270.08 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อตรึงด้วยแคลเซียม อัลจิเนทที่ความเข้มข้น 1.3 เปอร์เซ็นต์ มีร้อยละการตรึงโดยพิจารณาจากกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสเท่ากับ 18.03±1.10 เม็ดบีทรางจืดสามารถสลายสีเมททิลีนบลูที่เวลา 60 นาที ด้วยร้อยละการสลายสีเท่ากับ 91.35±1.41 สามารถทำงานได้ในช่วงกว้างแม้ถูกบ่มด้วยพีเอชและอุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 30 นาที โดยสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 10 ด้วยร้อยละการสลายสีย้อม เท่ากับ 95.80 ±0.70 และสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ด้วยร้อยละการสลายสีย้อมเท่ากับ 87.74±1.41 เม็ดบีทรางจืดสามารถนำกลับมาใช้ในการสลายสีได้ถึง 20 รอบ โดยในรอบที่ 20 มีร้อยละการสลายสีเท่ากับ 59.43±8.72 จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นศักยภาพของเม็ดบีทที่ตรึงสารสกัดหยาบรางจืดต่อความสามารถในการสลายสีเมททิลีนบลู เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมฟอกย้อมต่าง ๆ

คำสำคัญ: การสลายสี ใบรางจืด เม็ดบีท

Corresponding author: jubthiti@hotmail.com

Abstract

Methylene blue is a dye using for textile cotton wool silk and leather industries which causes coloring mill effluent resulting in bad effects to organisms and aquatic ecosystem. The objective of this study examined ability of bead immobilized *Thunbergia laurifolia* Linn. leaf extract to methylene blue decolorize. The polyphenol oxidase, the decolorize enzyme, was also determined. The crude leaf extract of middle leaf stage showed highest polyphenol oxidase activity with 21,911.25±270.08 unit/ml %immobilization using 1.3% w/v calcium alginate was 18.03±1.10%. It could decolorize methylene blue within 60 min with % decolorization of 91.35±1.41. The bead also decolorized methylene blue after incubation in various pHs and temperatures for 30 min. The optimum pH and temperature was pH 10 and 70°C with %decolorization of 95.80 ±0.70 and 87.74±1.41, respectively. The bead immobilized *Thunbergia laurifolia* Linn. was reusable for 20 repeated cycles with 59.43±8.72% decolorization. These result suggested that bead immobilized *Thunbergia laurifolia* Linn leaf extract has a high potential to apply for color mill effluent treatment from many textile industries.

Keywords: Decolorization, *Thunbergia laurifolia,* Bead

บทนำ

สีเมททิลีนบลูเป็นสีที่ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกย้อม รวมถึงอุตสาหกรรมการย้อมสีกระดาษ เส้นไหม ใยคอตตอน เครื่องหนัง และขนสัตว์ [1] มีความเป็นพิษต่อสัตว์ปานกลาง ทำให้หนูทดลองตายร้อยละ 50 เมื่อกินสีเมททิลีนบลู 1,180 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม [2] แม้จะมีความเป็นพิษไม่มากนัก แต่หากได้รับเข้าไปจะทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ เช่น หัวใจเต้นเร็ว อาเจียน ช็อค ผิวหนังเป็นสีเขียว เนื่องจากการขาดออกซิเจน (cyanosis) เกิดดีซ่านหรือตับเหลือง (jaundice) เป็นอัมพาต (quadriplegia) และการตายของเนื้อเยื่อในมนุษย์ (necrosis) ได้ [3] อุตสาหกรรมการฟอกย้อมมีการใช้สีย้อม กรด ด่าง และน้ำเป็นจำนวนมากในกระบวนการ ทำให้เกิดน้ำทิ้งที่เป็นกรดด่าง และมีสีปนเปื้อน สีย้อมส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอะโรมาติกเชิงซ้อน มีความเป็นพิษ และเป็นสาเหตุให้เกิดมะเร็งในสิ่งมีชีวิต [4] สีที่ปนเปื้อนในน้ำเสียนอกจากเป็นมลพิษต่อสายตา ยังส่งผลเสียต่อระบบนิเวศในน้ำ โดยบดบังแสง ส่งผลต่อการลดจำนวนของสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์แสงในน้ำ เป็นสาเหตุให้ปริมาณออกซิเจนในน้ำลดลง [5] ปัจจุบันการบำบัดน้ำเสียที่มีสีปนเปื้อนในอุตสาหกรรมฟอกย้อมมี 3 กระบวนการ คือ กระบวนการบำบัดทางกายภาพ เช่น การกรองด้วยเยื่อแผ่นหรือการดูดซับโดยใช้ถ่านกัมมันต์ กระบวนการบำบัดทางเคมี เช่น การแลกเปลี่ยนประจุ การสร้างการรวมตะกอน และกระบวนการบำบัดทางชีววิทยา เช่น การใช้จุลินทรีย์ พืช หรือสาหร่ายในการช่วยสลายหรือดูดซับ [6] ซึ่งทั้ง 3 กระบวนการเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายสูง ปัจจุบันมีการศึกษาการใช้เอนไซม์จากพืชในการกำจัดสีในน้ำเสียซึ่งมีค่าใช้จ่ายที่น้อยกว่า และให้ประสิทธิภาพดีในการบำบัด

เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสเป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่ใช้ในการบำบัดสิ่งปนเปื้อน พบได้ทั้งในจุลินทรีย์ สัตว์ และพืช โดยในพืชมีความสำคัญต่อกระบวนการต่าง ๆ เช่น การเกิดสีน้ำตาลในผักผลไม้หลังการเก็บเกี่ยว [7] กระบวนการการแก่ และการต้านทานโรคในพืช [8] โครงสร้างเป็นไฮโดรฟิลิกโปรตีนที่มีส่วนไฮโดรโฟบิกสั้น ๆ เกาะที่เยื่อหุ้มเซลล์ [9] มีคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบ เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันสารประกอบโมโนฟีนอลหรือไดฟีนอล ร่วมกับออกซิเจน [10] นอกจากนี้ยังเป็นเอนไซม์ที่สามารถใช้สับสเตรทที่หลากหลาย เช่น โพลีฟีนอล อะโรมาติก เอมีน และ

เบนซีนไธออล เป็นต้น ดังนั้นเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจึงสามารถสลายสีหรือสารประกอบอินทรีย์ที่ปนเปื้อนจากแหล่งต่าง ๆ ได้ [11, 12] โดยเอนไซม์ที่ได้จากแหล่งที่ต่างกันมีความสามารถในการสลายสีได้แตกต่างกัน เช่น เอนไซม์จากใบควินซ์ สามารถสลายสี Telon Yellow ARB ได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 90 นาที [11] เอนไซม์จากกล้วยสามารถสลายสี direct red 5B ได้ 90 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 48 ชั่วโมง และสามารถสลายสี direct blue GLL ได้ 85 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 90 ชั่วโมง [13] แต่อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ชนิดนี้ยังไม่ได้ถูกนำมาใช้งานจริง เนื่องจากการทำบริสุทธิ์เอนไซม์มีราคาสูง ทำให้เทคโนโลยีการตรึงเข้ามามีบทบาทเนื่องจากการลดค่าใช้จ่ายในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ การหมุนเวียนกลับมาใช้ซ้ำ และมีแนวโน้มในการใช้งานได้จริง [11]

การสร้างเม็ดบีทโดยการตรึงสารสกัด คือ การใช้เทคโนโลยีการตรึงมาช่วยลดข้อเสียของการทำงานของเอนไซม์อิสระ ซึ่งขาดความคงตัวขณะช่วยเร่งปฏิกิริยา และไม่สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ การตรึงสามารถทำให้เอนไซม์มีความคงตัวขณะช่วยเร่งปฏิกิริยา ต่อสภาวะสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ หรือพีเอช สามารถควบคุมการเกิดปฏิกิริยา และสามารถนำเอนไซม์มาใช้ซ้ำได้ เทคโนโลยีการตรึงจึงเข้ามามีบทบาทและใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ โดยเฉพาะการตรึงเพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ ทั้งการตรึงเอนไซม์ หรือการตรึงจุลินทรีย์ [14] ซึ่งจะช่วยในการประหยัดค่าใช้จ่าย เนื่องจากสามารถนำเอนไซม์มาใช้ซ้ำได้หลายครั้ง [14, 15] การใช้การตรึงมีหลายรูปแบบทั้งการตรึงโดยใช้สารที่ช่วยตรึงได้หลายชนิด เช่น โพลีอะคริลาไมด์ เจลาติน อะกาโรส และแคลเซียมอัลจิเนท เป็นต้น [14] ในงานวิจัยนี้เลือกการตรึงด้วยแคลเซียม อัลจิเนท ซึ่งเป็นสารที่มีราคาถูก และสามารถตรึงสารสกัดได้ง่าย

รางจืด (*Thunbergia laurifolia* Linn.) เป็นพืชในวงศ์เหงือกปลาหมอ (Acanthaceae family) มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย [16] เป็นพืชเถาหรือไม้เลื้อย มีดอกสีขาวหรือสีม่วง แต่ที่นิยมนำมาใช้มากคือ ชนิดดอกสีม่วง พบได้ทั่วไปในแถบเอเชียรวมถึงประเทศไทย มีสรรพคุณเกี่ยวกับการแก้พิษ ต้านการอักเสบ ลดไข้ รักษาตับ ต้านเบาหวาน และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีประโยชน์ในการป้องกันมะเร็ง [17] งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสลายสีย้อมของสารสกัดหยาบรางจืดเมื่อนำมาตรึงเป็นเม็ดบีท เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์ใช้ในการบำบัดสีในน้ำเสียแก่อุตสาหกรรมต่าง ๆ ที่มีการใช้สีย้อม ทั้งอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ และระดับชุมชน เช่น การทำผ้ามัดย้อม การทำผ้าบาติก และการทำเสื่อกระจูด เพื่อให้การพัฒนาเศรษฐกิจท้องถิ่นควบคู่กับการรักษาสิ่งแวดล้อม

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัดหยาบใบรางจืดระยะใบต่าง ๆ

ใบรางจืดเก็บจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย (วิทยาเขตนครศรีธรรมราช) ช่วงเดือนพฤศจิกายน 2561 จำแนกเป็น 3 ระยะ คือ ใบอ่อน ใบกลาง และใบแก่ ตามการจำแนกของใบ [18] ทำการล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ซับให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่โกร่งเติมไนโตรเจนเหลว จากนั้นบดให้ละเอียด แล้วเติมสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.8 ที่ผสม Triton X-100 ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) และโพลีไวนิลโพลีไพโรลิโดน ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ด้วยอัตราส่วนน้ำหนักใบต่อบัฟเฟอร์เท่ากับ 1:3 เพื่อสกัดสารสกัดหยาบรางจืด กรองสารสกัดที่ได้ด้วยผ้าขาวบาง 4 ชั้น แล้วนำสารสกัดที่ได้หมุนเหวี่ยงเพื่อเอาตะกอนออกอีกครั้งที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บสารละลายส่วนใสที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าทำการทดลองขั้นต่อไป

2. การวัดปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

การวัดปริมาณโปรตีนในสารสกัดหยาบของใบรางจืดระยะต่าง ๆ ใช้วิธีการของ Bradford [19] ปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายแบรดฟอร์ด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารตัวอย่าง ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่ม

ในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมิน ช่วงความเข้มข้น 0-0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดวัดโดยดัดแปลงวิธีการของ Altunkaya and Gökmen [20] ปฏิกิริยาประกอบด้วยคะทีคอล ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.8 ปริมาตร 1,460 ไมโครลิตร และสารสกัด ปริมาตร 40 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นทุก ๆ 10 วินาที ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เป็นเวลา 1 นาที กิจกรรมของเอนไซม์ 1 ยูนิต (Unit, U) คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น 0.001 OD ต่อนาที ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

โดยในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในเม็ดบีทรางจืดประกอบด้วย เม็ดบีทรางจืดหนัก 0.5 กรัม และคะทีคอล ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.8 ปริมาตร 1,460 ไมโครลิตร ทำการบ่มเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการแยกเม็ดบีทออก นำสารละลายที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร กิจกรรมของเอนไซม์ 1 ยูนิต (Unit, U) คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น 0.001 OD ต่อนาที ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

3. การตรึงสารสกัดหยาบใบรางจืดและการศึกษาความสามารถในการสลายสีเมทิลีนบลูของเม็ดบีท

3.1 การตรึงสารสกัด

การตรึงสารสกัดหยาบใบรางจืดเพื่อสร้างเป็นเม็ดบีท ดัดแปลงจากวิธีการของ Bilal และ Asgher [21] โดยผสมโซเดียมอัลจิเนต ความเข้มข้น 1.3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และสารละลายกลูตาราลดีไฮด์ ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในสารสกัดหยาบรางจืด คนให้เข้ากัน จากนั้นนำไปหยดผ่านเข็มฉีดยา nipro ขนาด 18Gx1” (1.2x25 มิลลิเมตร) ลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เพื่อให้เกิดการสร้างตัวเป็นเม็ดบีท บ่มเม็ดบีทที่ได้ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที เพื่อให้เม็ดบีทเกิดความคงตัว จากนั้นนำมากรอง แล้วล้างเม็ดบีทด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง ปริมาตรครั้งละ 500 มิลลิลิตร เพื่อเอาสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ส่วนเกินออก แล้วซับน้ำออกให้แห้ง ทำการเก็บเม็ดบีทที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ทดสอบในการทดลองต่อไป สำหรับเม็ดบีทชุดควบคุมใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.8 แทนสารสกัดหยาบใบรางจืด คำนวณร้อยละการตรึง โดยใช้สูตรดังนี้

ร้อยละการตรึง = (กิจกรรมเอนไซม์โพลีฟีนอลในเม็ดบีท/กิจกรรมเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดหยาบ) x 100

3.2 การศึกษาความสามารถในการสลายสีเมทิลีนบลูของเม็ดบีท

สารละลายสีเมททิลีนบลูละลายในน้ำกลั่นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 662 นาโนเมตร เริ่มต้นเท่ากับ 1.000±0.200 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมเม็ดบีทรางจืดหนัก 1 กรัม ในหลอดทดลอง เขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 15, 30, 45 และ 60 นาที จากนั้นนำสารละลายวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 662 นาโนเมตร ชุดควบคุมใช้เม็ดบีทควบคุมแทนเม็ดบีทรางจืด คำนวณค่าร้อยละการสลายสีโดยใช้สมการดังนี้

$$\text{ร้อยละการสลายสี} = [(A_0 - A_{c/t})/A_0] \times 100$$

เมื่อ A_0 คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายสีเมททิลีนบลู

$A_{c/t}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายหลังบ่มสีเมททิลีนบลูด้วยเม็ดบีทควบคุมหรือเม็ดบีทรางจืด

4. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในเม็ดบีทและการสลายสีย้อมเมทิลีนบลู

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในเม็ดบีทรางจืดที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง (32 องศาเซลเซียส) 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส โดยการบ่มเม็ดบีทรางจืดหนัก 0.5 กรัม ในหลอดทดลองปิดฝาที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลานาน 30 นาที ชุดควบคุมใช้เม็ดบีทควบคุมแทนเม็ดบีทรางจืด จากนั้นนำเม็ดบีทวัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส โดยใช้ปฏิกิริยาเช่นเดียวกับข้อที่ 2 ส่วนการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการสลายสีย้อมทำโดยบ่มเม็ดบีทที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 30 นาที เช่นเดียวกับการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในเบื้องต้น แต่ใช้เม็ดบีทรางจืด และเม็ดบีทควบคุม (ชุดควบคุม) ในการบ่มหนัก 1 กรัม จากนั้นนำมาสลายสีเมททิลีนบลูโดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับข้อที่ 3.2 โดยใช้เวลาในการสลายสี เป็นเวลานาน 45 นาที

5. การศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในเม็ดบีทและการสลายสีเมททิลีนบลู

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในเม็ดบีทที่ผ่านการบ่มในบัฟเฟอร์พีเอชต่าง ๆ ทำที่อุณหภูมิห้องโดยนำเม็ดบีทรางจืดหนัก 0.5 กรัม บ่มในบัฟเฟอร์พีเอชต่าง ๆ (พีเอช 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10) เป็นเวลานาน 30 นาที จากนั้นล้างบัฟเฟอร์ออกด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ซับน้ำออกให้เม็ดบีทแห้ง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดบีทที่เปลี่ยนแปลงไป จากนั้นนำเม็ดบีทวัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส โดยใช้ปฏิกิริยาเช่นเดียวกับข้อที่ 2 ส่วนการศึกษาผลของพีเอชต่อการสลายสีเมททิลีนบลูของเม็ดบีทรางจืดทำเช่นเดียวกับการศึกษากิจกรรมโพลีฟีนอลออกซิเดสของเม็ดบีทรางจืดที่ผ่านการบ่มด้วยพีเอชต่าง ๆ เช่นเดียวกัน แต่ใช้เม็ดบีทรางจืดและเม็ดบีทควบคุม (ชุดควบคุม) หนัก 1 กรัม สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเม็ดบีท แล้วนำไปสลายสีย้อมเช่นเดียวกับข้อที่ 3.2 โดยใช้เวลาในการสลายสี 45 นาที

6. การศึกษาจำนวนรอบการสลายสีเมททิลีนบลูของเม็ดบีท

เม็ดบีทรางจืดและเม็ดบีทควบคุมถูกนำมาใช้ในการสลายสีเมททิลีนบลูซ้ำที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้สีเมททิลีนบลูที่มีค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้นที่ความยาวคลื่น 662 นาโนเมตร เท่ากับ 1.000±0.200 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมกับเม็ดบีทรางจืดจำนวน 1 กรัม ชุดควบคุมใช้เม็ดบีทควบคุมแทน จากนั้น ทำการเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 45 นาที ดูดสารละลายออกทั้งหมด แล้วนำสารละลายที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 662 นาโนเมตร คำนวณร้อยละการสลายสีย้อม แล้วนำมาทดสอบการสลายซ้ำเช่นเดิมอีกครั้ง โดยใช้เม็ดบีทเดิมที่ไม่ผ่านการล้างใด ๆ

7. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

การทดลองแต่ละขั้นตอนทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ รายงานผลในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistic 21 ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว One-Way ANOVA ด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$)

ผลการวิจัย

1. ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในใบรางจืดระยะต่าง ๆ

สารสกัดใบรางจืดที่สกัดด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ มีสีน้ำตาลแดง มีความหนืดมาก ปริมาณโปรตีนของสารสกัดที่ได้ในใบรางจืดระยะใบอ่อน ใบกลาง และใบแก่เท่ากับ 65.61±6.18, 72.98±15.29 และ 68.44±8.35 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่อุณหภูมิห้อง (32 องศาเซลเซียส) เท่ากับ 8,850.96±77.64 21,911.25±270.08 และ 8,618.04±0.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ คิดเป็นกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะเท่ากับ 135.73±13.26, 310.14±71.00 และ 127.12±14.67 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

2. การตรึงสารสกัดหยาบใบรางจืดและศึกษาความสามารถในการสลายสีเมทิลีนบลูของเม็ดบีทรางจืด

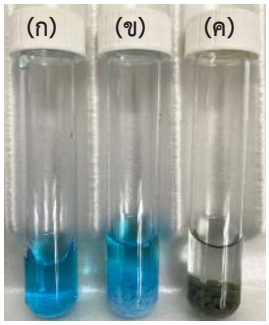
จากการทดสอบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสพบว่าระยะใบกลางมีกิจกรรมเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสสูงสุด จึงนำสารสกัดหยาบมาตรึงเป็นเม็ดบีทด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.8 มาตรึงเป็นเม็ดบีทควบคุม ซึ่งได้เม็ดบีทควบคุมสีขาว และเม็ดบีทรางจืดที่ตรึงสารสกัดหยาบรางจืดได้เม็ดบีทสีน้ำตาล มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของ เม็ดบีทควบคุมและเม็ดบีทรางจืดเท่ากับ 1.8±0.26 และ 1.95±0.28 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 1) เม็ดบีทรางจืดมีร้อยละการตรึงเมื่อคิดจากเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสเท่ากับ 18.03±1.10 เม็ดบีทรางจืดสามารถสลายสีที่เวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที ได้ร้อยละ 79.27±0.00, 90.49±1.52, 90.29±3.45 และ 91.35±1.41 ตามลำดับ ส่วนเม็ดบีทควบคุมสามารถสลายได้ร้อยละ 31.94±2.32, 38.33±1.82, 40.77±0.37 และ 40.36±0.38 ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และ ภาพที่ 2)

ภาพที่ 1 เม็ดบีทที่ได้จากการตรึง โดย (ก) คือ เม็ดบีทควบคุม และ (ข) คือเม็ดบีทรางจืด

ตารางที่ 1 ร้อยละการสลายสีเมททิลีนบลูของเม็ดบีทที่เวลาต่าง ๆ

ชนิดเม็ดบีท	ร้อยละการสลายสีเมทิลีนบลู			
	เวลาที่ใช้ในการสลาย (นาที)			
	15	30	45	60
เม็ดบีทควบคุม	31.94±2.32[a]	38.33±1.82[b]	40.77±0.37[b]	40.36±0.38[b]
เม็ดบีทรางจืด	79.27±0.00[c]	90.49±1.52[d]	90.29±3.45[d]	91.35±1.41[d]

หมายเหตุ ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรพิมพ์เล็กภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 2 การสลายสีเมททิลีนบลูของเม็ดบีทที่เวลา 45 นาที โดย ก-ค คือ สีย้อม สีย้อมผสมเม็ดบีทควบคุม และสีย้อมผสมเม็ดบีท

3. ผลของอุณหภูมิต่อเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และการสลายสีเมทิลีนบลูของเม็ดบีทรางจืด

เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสเริ่มต้นในเม็ดบีทเท่ากับ 8,413.41±606.14 ยูนิตต่อกรัมเม็ดบีท เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ ต่าง ๆ สามารถสลายสีย้อมได้ไม่แตกต่างกัน โดยสลายได้ในช่วงร้อยละ 78.78-87.74 โดยที่กิจกรรมเอนไซม์โพลีฟีนอลออก ซิเดสในเม็ดบีทมีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น แต่ยังพบกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ขณะที่เอนไซม์ในสารสกัดหยาบมีกิจกรรมลดลงเรื่อย ๆ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เลยเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 2) และเม็ดบีทรางจืดที่บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ มีความสามารถในการสลายสีย้อมได้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเทียบกับเม็ดบีทควบคุม

ตารางที่ 2 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดหยาบ เม็ดบีทรางจืด และร้อยละการสลายสีเมททิลีนบลู

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	กิจกรรมเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส		ร้อยละการสลายสี	
	สารสกัดหยาบ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	เม็ดบีทรางจืด (ยูนิตต่อกรัมเม็ดบีท)	เม็ดบีทควบคุม	เม็ดบีทรางจืด
32	21,911.25±270.08^{e}	8,413.41±606.14^{e}	18.08±1.34^{a}	81.97±5.42^{b}
40	18,085.00±330.79^{f}	6,346.37±218.09^{d}	22.16±6.75^{a}	87.39±0.89^{b}
50	13,590.00±0.00^{d}	4,994.41±725.14^{c}	19.52±1.50^{a}	85.69±2.54^{b}
60	6,375.00±0.00^{c}	2,435.75±69.78^{b}	27.40±3.34^{a}	81.42±1.45^{b}
70	5,567.50±446.00^{b}	1,217.88±38.71^{a}	17.67±0.35^{a}	87.74±1.41^{b}
80	0.00±0.00^{a}	905.03±58.06^{a}	18.12±5.81^{a}	85.22±1.27^{b}
90	0.00±0.00^{a}	2,312.85±201.12^{b}	28.38±12.39^{a}	78.78±7.43^{b}
100	0.00±0.00^{a}	770.95±120.86^{a}	23.49±3.54^{a}	81.63±8.41^{b}

หมายเหตุ ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรพิมพ์เล็กภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

4. ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และการสลายสีเมททิลีนบลูของเม็ดบีทรางจืด

เม็ดบีทที่บ่มในบัฟเฟอร์พีเอชต่าง ๆ มีเส้นผ่านศูนย์กลางเปลี่ยนแปลงไป โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเพิ่มขึ้นเมื่อบ่มที่พีเอช 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 โดยมีการพองตัวมากที่สุดทั้งเม็ดบีทควบคุมและเม็ดบีทรางจืดเมื่อบ่มที่พีเอช 9 มีการพองตัว 1.92 และ 1.95 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเม็ดบีทที่ไม่บ่มที่พีเอชใด เมื่อศึกษาร้อยละการสลายสีพบว่าเม็ดบีทรางจืดสามารถสลายสีได้ร้อยละ 86.79-95.80 ในขณะที่เม็ดบีทควบคุมมีร้อยละการสลายสีเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเม็ดบีทที่ไม่บ่มที่พีเอชใด ๆ ร้อยละการสลายสีของเม็ดบีทควบคุมอยู่ในช่วง 56.17-80.72 ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสลดลงเมื่อบ่มเม็ดบีทที่พีเอช 3 และ 4 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสเท่ากับ 4,625.70±774.04 และ 5,983.24±959.27 ยูนิตต่อกรัมเม็ดบีท แต่เมื่อบ่มในพีเอช 5-10 มีกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น และกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มมากที่สุดเมื่อบ่มเม็ดบีทรางจืดในบัฟเฟอร์พีเอช 8 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสเท่ากับ 15,636.87±429.59 ยูนิตต่อกรัมเม็ดบีท (ตารางที่ 3)

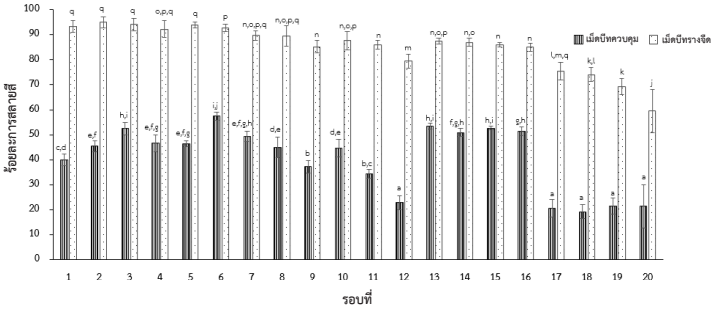
ตารางที่ 3 ผลของพีเอชต่อขนาดของเม็ดบีทและร้อยละการสลายสีเมททิลีนบลู

พีเอช	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดบีท (มิลลิเมตร)		ร้อยละการสลายสี		กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในบีทรางจืด (ยูนิตต่อกรัมเม็ดบีท)
	เม็ดบีทควบคุม	เม็ดบีทรางจืด	เม็ดบีทควบคุม	เม็ดบีทรางจืด	
ควบคุม	1.80±0.26^{a}	1.95±0.28^{a}	45.87±2.14^{a}	92.23±0.36^{g,h}	8,111.73±2,539.15 ^{b}
3	1.90±0.21^{a}	1.75±0.26^{a}	56.17±4.93^{b}	92.67±1.37^{g,h}	4,625.70±774.04 ^{a}
4	2.65±0.41^{b,c}	2.60±0.46^{b,c}	72.83±1.86^{e}	89.24±0.66^{g,h}	5,983.24±959.27 ^{a,b}
5	2.80±0.42^{c}	2.35±0.34^{b}	80.72±1.13^{f}	89.24±0.97^{g,h}	12,335.20±3,578.79 ^{c}
6	2.50±0.33^{b,c}	2.50±0.41^{b,c}	62.89±6.95^{c}	93.08±2.08^{g,h}	13,223.46±3,214.34 ^{c}
7	2.55±0.37^{b,c}	2.30±0.42^{b}	62.58±4.02^{c}	92.84±2.27^{g,h}	13,223.46±1,228.50 ^{c}
8	2.55±0.28^{b,c}	1.95±0.28^{a}	64.21±7.31^{c,d}	86.79±2.44^{f,g}	15,636.87±429.59 ^{c}
9	3.45±0.44^{d}	3.80±0.35^{e}	70.47±3.59^{d,e}	88.98±2.94^{g,h}	13,256.98±353.15 ^{c}
10	2.55±0.16^{b,c}	2.75±0.35^{c}	68.60±7.06^{c,d,e}	95.80±0.70^{h}	12,184.36±153.61 ^{c}

หมายเหตุ ค่าในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรพิมพ์เล็กภาษาอังกฤษแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

5. จำนวนรอบการสลายสีของเม็ดบีทรางจืด

เม็ดบีทรางจืดสามารถสลายสีย้อมได้ถึง 20 รอบ โดยสามารถแบ่งการสลายได้เป็น 3 ช่วง คือ ช่วงที่ 1 รอบที่ 1-6 สามารถสลายสีย้อมได้ร้อยละ 92.74-94.95 และช่วงที่ 2 คือ รอบที่ 7-16 สามารถสลายสีเมททิลีนบลูได้ลดลงเล็กน้อย มีการสลายได้ร้อยละ 79.47-89.79 และช่วงที่ 3 คือ รอบที่ 17-20 การสลายสีลดลงอย่างมีนัยสำคัญ มีร้อยละการสลายสี 59.43-75.35 โดยรอบที่ 20 สามารถสลายสีย้อมได้ร้อยละ 59.43 (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ร้อยละการสลายสีเมททิลีนบลูของเม็ดบีทเมื่อนำมาใช้ซ้ำ

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

สารสกัดหยาบใบรางจืดระยะกลางมีกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 21,911.25±270.08 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 1) สามารถตรึงเป็นเม็ดบีทด้วยแคลเซียมอัลจิเนตที่ความเข้มข้น 1.3 เปอร์เซ็นต์ ด้วยร้อยละการตรึง 18.03±1.10 และสามารถสลายสีเมททิลีนบลูได้ดีที่สุดที่เวลา 60 นาที (ร้อยละการสลายเท่ากับ 91.35±1.41) ทำให้สารสะลายสีย้อมใสไม่มีสี (ภาพที่ 2) เมื่อนำมาสแกนความยาวคลื่นในช่วง 260-800 นาโนเมตร ไม่พบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นใด ๆ (ข้อมูลไม่ได้แสดง) แต่เม็ดบีทควบคุมพบความยาวคลื่นที่ 662 นาโนเมตร แต่ค่าการดูดกลืนแสงลดลง และพบสีเมททิลีนบลูที่เม็ดบีทควบคุม แสดงให้เห็นว่าสีเมททิลีนบลูถูกสลายด้วยการดูดซับของเม็ดบีท โดยเม็ดบีทเป็นเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์ของน้ำตาลกรดแมนนูโรนิค (mannuronic acid) และน้ำตาลกรดกูลูโรนิก (guluronic acid) ซึ่งในโครงสร้างมีหมู่ฟังก์ชันไฮดรอกซิล สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับสีเมททิลีนบลู [22-24] และการสลายด้วยเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่อยู่ในเม็ดบีท โดยการสลายสีด้วยเอนไซม์มี 2 ลักษณะ คือ 1) การตกตะกอน มาจากการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ทำให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ละลายน้ำ เมื่อความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์มากขึ้นจึงเกิดเป็นโพลีเมอร์ แล้วตกตะกอนแยกออกมา และ 2) การทำลายโครงสร้างวงแหวนอะโรมาติกของสี [22, 23]

จากผลการทดลองการสลายของสีเมททิลีนบลูของเม็ดบีทเป็นรูปแบบการสลายโดยเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาทำลายโครงสร้างวงแหวนอะโรมาติกของสี เนื่องจากไม่พบการตกตะกอน และเมื่อสแกนความยาวคลื่นในสารสกัดที่สลายสีไม่พบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นใด ๆ ส่วนเม็ดบีทควบคุมสามารถสลายสีย้อมได้ร้อยละ 40.36±0.38 เมื่อเม็ดบีทถูกบ่มในบัฟเฟอร์พีเอชมากกว่า 3 ทำให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดบีทเพิ่มขึ้น เนื่องจากบีทแคลเซียมอัลจิเนตที่เป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลกรดแมนนูโรนิค (mannuronic acid) และน้ำตาลกรดกูลูโรนิก (guluronic acid) ซึ่งมีหมู่ฟังชันคาร์บอกซิล มีค่า pKa เท่ากับ 3.38 และ 3.65 ตามลำดับ [25, 26] เมื่อค่าพีเอชมากกว่า 3 จะทำให้หมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิลแตกตัวเป็นไอออนลบ เกิดแรงผลักกันระหว่างหมู่คาร์บอกซิลของน้ำตาลทั้งสอง ทำให้สูญเสียโครงสร้างตาข่าย [27] เม็ดบีทจึงเกิดการพองตัว เส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดบีทเพิ่มขึ้น ซึ่งผลการทดสอบพบว่าเม็ดบีทมีการพองตัวขึ้นทุกค่าพีเอชที่บ่ม และเม็ดบีทรางจืดสามารถสลายสีเมททิลีนบลูได้ร้อยละ 89.24-95.80 ในขณะที่การพองตัวของเม็ดบีททำให้เม็ดบีทควบคุมมีความสามารถในการสลายสีเพิ่มขึ้นเม็ดบีทยังสามารถทำงานได้เมื่อผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ โดยมีความสามารถในการสลายสีได้ไม่แตกต่างกัน แม้กิจกรรมเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในเม็ดบีทลดลงเมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูงขึ้น ส่วนสารสกัดหยาบเมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูงขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์ลดลง และไม่พบเลยเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าการตรึงทำให้สารสกัดหยาบรางจืดมีความคงตัวมากยิ่งขึ้น ซึ่งการตรึงเอนไซม์ทำให้เอนไซม์ถูกกักเก็บอยู่ในโครงสร้างภายใน ทำให้สิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น โปรตอนไฮดรอกไซด์ไอออน และอุณหภูมิ เกิดผลกระทบน้อยต่อการ

เปลี่ยนแปลงโครงรูปของเอนไซม์ ซึ่งมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ [23] เม็ดบีทสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ 20 รอบ โดยในรอบที่ 20 มีความสามารถในการสลายสีเมททิลีนบลูร้อยละ 59.43 จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าการสลายสีเมททิลีนบลูมาจากการทำงานของเม็ดบีทและสารสกัดหยาบร่วมกัน ซึ่งสารสกัดหยาบของเม็ดบีทรางจืดมีกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเตส ซึ่งสามารถใช้สับเสตรทได้หลายชนิด เช่น โพลีฟีนอล อะโรมาติกเอมีน เบนซีนไธออล เป็นต้น [12, 28] จึงเป็นเอนไซม์ที่ถูกนำมาใช้ในการสลายสี และกำจัดสารปนเปื้อนในแหล่งต่าง ๆ [11]

จากผลการวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นศักยภาพของเม็ดบีทที่ตรึงสารสกัดหยาบจากรางจืดที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการสลายสีเมททิลีนบลูได้ ทั้งในสภาวะที่มีพีเอชต่าง ๆ ความทนทานต่ออุณหภูมิ และความสามารถในการนำกลับมาใช้ซ้ำ โดยการสลายสีเมททิลีนบลูมาจากการสลายของเม็ดบีทที่ใช้ตรึงและสารสกัดหยาบรางจืดที่ตรึงไว้ ผลการศึกษาที่ได้นี้เป็นการวิจัยเบื้องต้น เพื่อเป็นข้อมูลในการสนับสนุนการวิจัยต่อยอด หรือศึกษาเพิ่มเติม เพื่อให้สามารถประยุกต์ใช้งานในน้ำเสียที่มีปริมาตรมากขึ้น เพื่อให้สอดคล้องในการใช้งานจริง เป็นทางเลือกในการบำบัดน้ำเสียที่ราคาถูก เป็นมิตรต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาในครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้ ปีงบประมาณ 2561 จากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย (วิทยาเขตนครศรีธรรมราช)

เอกสารอ้างอิง

1. Kushwaha AK, Gupta N, Chattopadhyaya MC. Removal of caionic methylene blue and malachite green dyes from aqueous solution by waste materials of *Daucus carota*. J Saudi Chem Soc 2014;18:200-7.
2. Seif C, Portillo FJM, Osmonov DK, Böhler G, Horst C, Leissner J, et al. Methylene blue staining for nerve- sparing operative procedures: An animal model. Urology 2004;63:1205-8.
3. Yi JZ, Zhang LM. Removal of methylene blue dye from aqueous solution by adsorption no to sodium humate/polyacrylamide/clay hybrid hydrogel. Bioresour Technol 2008;99:2182-6.
4. Nandi BK, Goswami A, Purkait MK. Adsorption characteristics of brilliant green dye on kaolin. J Hazard Mater 2009;161(1):387-95.
5. Champagne PP, Ramsay JA. Dye decolorization and detoxification by laccase immobilized on porous glass beads. Bioresour Technol 2010;101:2230-5.
6. วนิดา ชูอักษร. เทคโนโลยีการกำจัดสีในน้ำเสียอุตสาหกรรม. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา 2555;1:181-91.
7. Jiang Y, Duan X, Joyce D, Zhang Z, Li J. Advances in understanding of enzymatic browning in harvested litchi fruit. Food Chem 2004;88(3):443-6.
8. Mayer AM. Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. Phytochemistry 2006;67:2318-31.
9. Marqués L, Fleuriet A, Cleyet-Marela JC, Macheix JJ. Purification of an apple polyphenoloxidase isoform resistant to SDS-proteinase K digestion. Phytochemistry 1994;36(5):1117-21.
10. Mukherjee S, Basak B, Bhunia B. Dey A., Mondal B. Potential use of polyphenol oxidases (PPO) in the bioremediation of phenolic contaminants containing industrial wastewater. Rev Environ Sci Biotechnol 2013;12:61-73.

11. Arabaci G, Usluoglu A. The enzymatic decolorization of textile dyes by the immobilized polyphenol oxidase from quince leaves. Sci World J 2014;685975:1-5.
12. Husain Q, Jan U. Detoxification of phenols and aromatic amines from polluted wastewater by using phenol oxidases. J Sci Ind Res 2000;59:286-93.
13. Jadhav UU, Dawkar VV, Jadhav MU, Govindwar SP. Decolorization of the textile dyes using purified banana pulp polyphenol oxidase. Int J Phytoremediation 2011;13(4):357-72.
14. Bezerra CS, de Farias Lemos CMG, de Sousa M, Gonçalves LRB. Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: past, present, and future trends. J Appl Polym Sci 2015;132:1-15.
15. Yao J, Chen Q, Zhong G, Cao W, Yu A, Liu Y. 2014. Immobilization and characterization of tannase from a metagenomic library and its use for removal of tannins from green tea infusion. J Microbiol Biotechnol 2014;24:80-6.
16. Eric WC, Suit C, Eng Y, Ping Y, Zhiew T, Wong C. Phytochemistry and pharmacological properties of *Thunbergia laurifolia* : a review. Phcog J 2011;3(24):1-6.
17. Srida C, Hankete J, Aromdee C, Pese M. Antioxidant activity of *Thunbergia laurifolia* ethanolic extract. TJPS 2002;6:1-7.
18. Junsi M, Siripongvutikorn S. *Thunbergia laurifolia*, a traditional herbal tea of Thailand: botanical, chemical composition, biological properties and processing influence. Int Food Res J 2016;23(3):923-27.
19. Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72(1-2):248-54.
20. Altunkaya A, Gökmen V. Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactuca sativa*). Food Chem 2008;107:1173-79.
21. Bilal M, Asgher M. Dye decolorization and detoxification potential of Ca-alginate beads immobilized manganese peroxidase. BMC Biotechnol 2015;15(111):1-14.
22. Husain Q. Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review. Rev Environ Sci Biotechnol 2010;9:117-40.
23. Lu L, Zhao M, Wang Y. Immobilization of laccase by alginate–chitosan microcapsules and its use in dye decolorization. World J Microbiol Biotechnol 2007;23(2):159-66.
24. Li Y, Liu SJ, Chen FM, Zuo JE. High-strength apatite/attapulgite/alginate composite hydrogel for effective adsorption of methylene blue from aqueous solution. J Chem Eng 2019;64:5469-77.
25. Nussinovitch A. Hydrocolloid applications: gum technology in the food and other industries. 1st ed. London: Chamman & Hall.; 1997.
26. Huag A. Composition and properties of alginates. Master Thesis, Messay University. New Zealand; 1964.

27. Bu H, Khoniksen AL, Nystrom B. Effects of pH dynamics and rheology during association and gelation via the Ugi reaction of aqueous alginate. Eur Polym J 2005;41:1708-17.

28. Bhunia A, Durani S, Wangikar PP. Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. Biotechnol Bioeng 2001;72(5):562-7.