รายงานการวิจัย

การกำจัดสีย้อมโดยใช้สารสกัดหยาบจากใบรางจืดและการประยุกต์ใช้บำบัดสีน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันปาล์ม

Dye Decolorization Using Crude Extract from *Thunbergia laurifolia* Linn. Leaves and Its Application on Palm Oil Mill Effluent Decolorization

ฐิติกร พรหมบรรจง Thitikorn Prombanchong

สุวรรณา ผลใหม่ Suwanna Pholmai

ธนากรณ์ ดำสุด Thanakorn Damsud

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบประมาณเงินรายได้ ประจำปี พ.ศ. 2561

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

รายงานการวิจัย

การกำจัดสีย้อมโดยใช้สารสกัดหยาบจากใบรางจืดและการประยุกต์ใช้บำบัดสีน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันปาล์ม

Dye Decolorization Using Crude Extract from *Thunbergia laurifolia* Linn. Leaves and Its Application on Palm Oil Mill Effluent Decolorization

ฐิติกร พรหมบรรจง Thitikorn Prombanchong

สุวรรณา ผลใหม่ Suwanna Pholmai

ธนากรณ์ ดำสุด Thanakorn Damsud

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบประมาณเงินรายได้ ประจำปี พ.ศ. 2561

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประมาณเงินรายได้ ประจำปี พ.ศ. 2561 เป็นงานวิจัยพื้นฐาน โดยสร้างเม็ดบีทสลายสีย้อมจากสารสกัดใบรางจืดซึ่งเป็นพืชที่กาง่ายในท้องถิ่นภาคใต้ที่ปลอดภัยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จึงเป็นองค์ความรู้พื้นฐานในการนำไปประยุกต์ใช้ในการสร้างคอลัมน์บำบัดสีในน้ำเสียทั้งจากบ้านเรือน ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ และกลุ่มวิสาหกิจชุมชนที่มีการใช้สีย้อม เช่น กลุ่มผ้ามัดย้อมต่าง ๆ หรือจากโรงงานอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับสีย้อม รวมถึงกลุ่มโรงงานที่มีสีในน้ำเสียปนเปื้อน เช่น โรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม เป็นต้น

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัยที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้ รวมถึงคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี โดยเฉพาะสาขาวิทยาศาสตร์ที่อำนวยความสะดวกสำหรับพื้นที่การทำวิจัย และเครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย รวมถึงเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือเป็นอย่างดี

ฐิติกร พรหมบรรจง
ธนากรณ์ ดำสุด
สุวรรณา ผลใหม่
เมษายน 2562

บทคัดย่อ

สีเป็นมลพิษอย่างหนึ่ง ทั้งสีสังเคราะห์ และสีธรรมชาติ เมื่อปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมจะส่งผลเสียต่อระบบนิเวศ เช่น ลดการสังเคราะห์แสง และมีผลต่อปริมาณการละลายของออกซิเจนในน้ำ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถของสารสกัดหยาบจากใบรางจืดในการสลายสีย้อมและสีจากน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์ม โดยวิเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายสีย้อมในสารสกัดหยาบใบรางจืด 3 ระยะ คือ ใบอ่อน ใบกลาง และใบแก่ คือ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยใช้สับสเตรทเป็น guaiacol syringaldazine และ pyrrogallol ร่วมกับ H_2O_2 พบว่าในใบระยะกลางมีกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงที่สุดโดยสับเสตรทดังกล่าวเท่ากับ 0.040±0.001 1.97±0.003 และ 0.039±0.0006 U/ g fresh weight ตามลำดับ และกิจกรรมเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสพบมากสุดในระยะใบกลางเช่นกัน โดยใช้สับเสตรทเป็น pyrocatechol มีกิจกรรมเท่ากับ 9,991.68±135.00 U/ g fresh weight เมื่อนำสารสกัดหยาบรางจืดผลิตเม็ดบีทสลายสีย้อมโดยการตรึงสารสกัดหยาบใบรางจืดด้วยแคลเซียมอัลจิเนต พบว่าการใช้เม็ดบีทเพียงอย่างเดียวไม่ร่วมกับ H_2O_2 สามารถสลายสีย้อมได้ โดยสามารถสลายสีย้อม methylene blue ได้ดีที่สุด ในเวลา 45 นาที โดยเม็ดบีทขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.03 ± 0.06 มิลลิเมตร ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในเม็ดบีทมากที่สุด และสลายสีย้อมได้ร้อยละ 91.07 ±2.39 เมื่อนำเม็ดบีทไปบ่มใน pH ต่าง ๆ (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10) พบว่าเม็ดบีทมีการพองตัวในทุกค่า pH โดยค่า pH ที่มีการพองตัวของเม็ดบีทมากที่สุด คือ pH 9 โดยพองตัวมีขนาดเม็ดบีทใหญ่ขึ้น 1.9 เท่า เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่บ่มใน pH ใด ๆ กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสเมื่อบ่มใน pH ต่าง ๆ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อบ่มที่ pH 3 และ 4 และกิจกรรมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อบ่มใน pH 7-10 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม เมื่อศึกษาความสามารถในการสลายสีย้อม พบว่า ความสามารถในการสลายสีย้อมของเจลมีค่าใกล้เคียงกันแม้ผ่านการบ่มด้วย pH ที่แตกต่างกัน เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อเม็ดบีท โดยการนำเม็ดบีทบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ (40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส)พบว่าโครงสร้างของเม็ดบีทที่สังเกตด้วยตาเปล่าไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่ากิจกรรมลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น แต่ยังมีความสามรถในการสลายสีย้อม methylene blue โดยเม็ดบีทที่บ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสมีร้อยละการสลายสีย้อมเท่ากับ 79.08 เมื่อนำเม็ดบีทรางจืดมาสลายสีย้อมซ้ำ พบว่า สามารถสลายสีย้อม methylene blue ซ้ำได้ถึง 20 รอบ โดยรอบที่ 20 มีร้อยละการสลายสีย้อมเท่ากับ 59 เมื่อทดสอบการสลายสีจากน้ำเสียโรงงานน้ำมันปาล์มของเม็ดบีทรางจืดพบว่าเม็ดบีทรางจืดไม่สามารถาลายสีในน้ำเสียโรงงานน้ำมันปาล์มได้ ผลการศึกษาในครั้งนี้เม็ดบีทรางจืดสามารถประยุกต์ใช้ในการสลายสีย้อมได้ ซึ่งเป็นวิธีการที่ปลอดภัยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

Abstract

Both synthetic dyes and natural dyes contaminating in water are pollution. These dyes give the deep color in wastewater. It causes many affects to the ecosystem such as reducing photosynthetic activity and affecting dissolved oxygen concentration. This research was objective to study decolorization ability of crude leaf extract from *Thumbergia laurifolia* on dye contaminated in water and palm oil mill effluent. The three stages of leaves (young, middle and mature leaf stage) extracts were analyzed 2 enzymes relating dye decolorization (peroxidase and polyphenol oxidase). The peroxidase activity was determined using guaiacol syringaldazine and pyrogallol as substrate presenting H_2O_2. The result showed the highest activity in middle stage leaf extract of 0.040±0.001, 1.97±0.003 and 0.039±0.0006 U/ g fresh weight using guaiacol syringaldazine and pyrrogallol as substrate, respectively. The polyphenol oxidase (PPO) activity was estimated using pyrocatechol as substrate and the result also showed highest activity in middle leaf extract of 9,991.68±135.00 U/ g fresh weight. The leaf extract was immobilized by calcium alginate. The *Thumbergia laurifolia* bead was determined decolorization ability. The result showed only *Thumbergia laurifolia* bead without H_2O_2 could decolorize dye in water. The methylene blue dye was rapid decolorized by *Thumbergia laurifolia* bead (within 45 min). The 2.03 ± 0.06 mm diameter of bead showed highest activity of PPO and %decolorization of 91.07 ±2.39 when compared to other large bead sizes. The bead was incubated in various pH buffer (pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10) for 30 min before the PPO activity and %decolorization were determined. The bead swelled in every pH test. The highest swell of the bead presented in pH 9 with the size larger 1.9 times than control (without any incubation). The PPO activity was decrease when incubated in pH 3 and 4 buffer and increase when incubated in pH 5-10 buffer; however, the %decolorization was equal to control after incubation in every pH buffer. The bead was incubated in various temperatures (40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100°C) after determination PPO activity and dye decolorization. The

physical appearance bead after incubation was not change. PPO activity in the bead was decrease when the bead was incubated in higher temperature, however, the ability of decolorization after 100°C incubation presented the % decolorization of 79.08. The *Thumbergia laurifolia* bead was used for methylene blue decolorization up to 20 cycles with 59 %decolorization. The bead was also estimated palm oil mill effluent decolorization. The result showed it could not decolorize this waste water.

This research presented this bead has ability to apply in dye decolorization. It is the safe and friendly to environment method.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อ ..... ข
Abstract ..... ค
สารบัญ ..... จ
สารบัญภาพ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ช
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 2
1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4
บทที่ 2 วิธีการดำเนินการวิจัย 5
บทที่ 3 ผลการวิจัย และวิจารณ์ผล 9
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 36
บรรณานุกรม 37
ภาคผนวก 40

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 เถาและดอกรางจืด 2
รูปที่ 2 ใบรางจืดระยะต่าง ๆ ที่นำมาสกัด 10
รูปที่ 3 สารสกัดใบรางจืด 10
รูปที่ 4 สารสกัดใบรางจืดเมื่อชะสีใบออกด้วยเมทานอล 10
รูปที่ 5 ปริมาณโปรตีนในใบรางจืดระยะต่าง ๆ 11
รูปที่ 6 การสลายสีย้อมของสารสกัดหยาบจากใบรางจืด 15
รูปที่ 7 การสลายสีย้อมของสารสกัดหยาบใบรางจืดร่วมกับ H_2O_2 18
รูปที่ 8 การตรึงสารสกัดหยาบรางจืดด้วยแคลเซียมอัลจิเนทที่ความเข้มข้น 1, 2 , 3 และ 4% w/v 19
รูปที่ 9 การสลายสีย้อมโดยการตรึงสารสกัดหยาบใบรางจืด 20
รูปที่ 10 กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ในเม็ดบีทรางจืดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่าง ๆ 21
รูปที่ 11 ร้อยละการสลายสี methylene blue ของเม็ดบีทขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่าง ๆ 22
รูปที่ 12 การสลายสี methylene blue โดยใช้เม็ดบีทรางจืดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่าง ๆ 22
รูปที่ 13 ร้อยละการสลายสีของเม็ดบีทเมื่อให้สลายสีที่เวลาต่าง ๆ 23
รูปที่ 14 ผลการสแกนความยาวคลื่นสี methylene blue เมื่อบ่มด้วยเม็ดบีทรางจืดที่ 24
รูปที่ 15 กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสของเม็ดบีทที่บ่มใน pH ต่าง ๆ 26
รูปที่ 16 ร้อยละการสลายสีย้อมของเม็ดบีทเมื่อบ่มที่ pH ต่าง ๆ 26
รูปที่ 17 เม็ดบีทรางจืด และเม็ดบีทควบคุมหลังสลายสี methylene blue 27
รูปที่ 18 กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในเม็ดบีทรางจืดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ 28
รูปที่ 19 ร้อยละการสลายสีย้อมของเม็ดบีทเมื่อบ่มเจลที่อุณหภูมิต่าง ๆ 29
รูปที่ 20 ร้อยละการสลายสีของเม็ดบีทควบคุมและเม็ดบีทรางจืดเมื่อนำเม็ดบีทมาใช้ซ้ำ 30
รูปที่ 21 การสลายสีในน้ำเสียน้ำมันปาล์มโดยใช้เม็ดบีทรางจืด 31
รูปที่ 22 น้ำเสียจากโรงงานน้ำมันปาล์มหลังการสลายสีย้อมด้วยเม็ดบีทรางจืด 31
รูปที่ 23 ผลการสแกนความยาวคลื่นของน้ำเสียโรงงานน้ำมันปาล์มที่ผ่านการสลายสีด้วยเม็ดบีท 32
รูปที่ 24 แถบกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและโพลีฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดหยาบที่ย้อมด้วยสับเสตรทชนิดต่าง ๆ 42

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในสารสกัดหยาบจากใบระยะต่าง ๆ 12

ตารางที่ 2 กิจกรรมเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดหยาบใบรางจืดระยะต่าง ๆ 13

ตารางที่ 3 กลุ่มสีย้อมที่ทดสอบ และโครงสร้างของสีย้อม และความสามารถในการสลายสีย้อมของสารสกัดหยาบร่วมกับ H_2O_2 16

ตารางที่ 4 ขนาดของเม็ดบีทเมื่อผ่านการบ่มในบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆเป็นเวลานาน 30 นาที 25

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

อุตสาหกรรมหลายชนิดในปัจจุบันนี้ได้เกิดของเสียหลากหลายชนิด หนึ่งในของเสียเหล่านั้น คือ น้ำเสียที่เป็นสี ซึ่งมาจากอุตสาหกรรมสีย้อม อุตสาหกรรมการฟอกย้อม อุตสาหกรรมการสกัดน้ำมันปาล์ม เป็นต้น โดยของเสียเหล่านี้ถูกกำจัดโดยการใช้สารเคมี ซึ่งส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมตามมาภายหลัง จึงทำให้การกำจัดสีโดยการใช้วิธีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมได้รับความสนใจมากยิ่งขึ้น หนึ่งในวิธีนั้นคือการใช้สิ่งมีชีวิต เช่น จุลินทรีย์ที่อยู่ในธรรมชาติ แต่ข้อเสียของการใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ที่สามารถสลายสีได้มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น มีต้นทุนสูง และสภาวะแวดล้อมที่ต้องปรับให้กับจุลินทรีย์ซึ่งไม่สะดวกต่อการใช้งาน อีกทั้งการสลายสีโดยจุลินทรีย์ถูกพบว่าเมื่อสลายสีแล้วทำให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีความเป็นพิษมากขึ้น จึงเป็นทางเลือกที่มีข้อด้อย ดังนั้นการใช้เอนไซม์ที่สกัดได้จากพืช เช่น เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และโพลีฟีนอลออกซิเดสที่สกัดจากพืชจึงเป็นทางเลือกที่ได้รับความสนใจ ซึ่งทำให้การกำจัดสีมีประสิทธิภาพและปลอดภัยต่อผู้ใช้งาน ทั้งยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน พบได้ในพืช สัตว์ และแบคทีเรีย โดยมีบทบาทในการช่วยป้องกันเซลล์จากอนุมูลของออกซิเจนที่เกิดขึ้นในกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์ เช่น ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) ไนตริกออกไซด์ (NO) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นต้น และยังมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการสลายสารประกอบจำพวกฟีนอลซึ่งเป็นสับสเตรทร่วมของอนุมูลที่กล่าวมาข้างต้น ซึ่งสารที่ใช้เป็นสีย้อมในอุตสาหกรรม และในห้องปฏิบัติการมักเป็นสารประกอบจำพวกฟีนอล ดังนั้นจึงมีการศึกษาผลของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ในการสลายสีย้อมซึ่งพบผลการศึกษาที่ดีในเอนไซม์ที่ได้มาจากพืช

รางจืดเป็นพืชที่สามารถพบได้ง่ายในทุกภาคของประเทศไทย และเป็นพืชที่ใช้เป็นยารักษาโรคได้ อีกทั้งยังมีคุณสมบัติที่รู้จักกันดีว่าเป็นสมุนไพรที่สามารถแก้พิษได้ จึงเป็นพืชที่น่าสนใจในการใช้ในการสลายสีย้อม ซึ่งการวิจัยในครั้งนี้สนใจการใช้สารสกัดจากรางจืดเป็นสารที่ใช้ในการสลายสีย้อม โดยทำการสกัดสารเป็นสารสกัดหยาบ แล้วทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายสีย้อม และสีในน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันปาล์ม

1.2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

รางจืด

รางจืดเป็นพืชสมุนไพรที่เป็นไม้เลื้อย เป็นเถา มีดอกสีครามอ่อน (รูปที่ 1) มีสรรพคุณในการถอนพิษต่าง ๆ มีชื่ออื่น ๆ ว่า กำลังช้างเผือก เครือเขาเขียว ขอบชะนาง ยาเขียว (ภาคกลาง) คาย รางเย็น (ยะลา) จอลอดิเออ ซั้งกะ ปั้งกะล่ะ พอหน่อเตอ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) ดุเหว่า (ปัตตานี) ทิดพุด (นครศรีธรรมราช) น้ำนอง (สระบุรี) ย่ำแย้ แอดแอ (เพชรบูรณ์) สามารถจำแนกทางอนุกรมวิธานได้ดังนี้

อาณาจักร (Kingdom): Plantae

อันดับ (Order): Lamiales

วงศ์ (Family): Acanthaceae

สกุล (Genus): *Thumbergia*

สปีชีส์ (Species): *T. laurifolia*

รูปที่ 1 เถาและดอกรางจืด

รางจืดเป็นสมุนไพรที่ “กระทรวงสาธารณสุขรณรงค์ให้เกษตรกรหรือบุคคลทั่วไปเลือกใช้เพื่อใช้แก้พิษต่าง ๆ เช่น พิษจากยาฆ่าแมลง ยาเบื่อ สารตะกั่ว ฯลฯ” โดยส่วนของรางจืดที่นิยมนำมาใช้ในการถอนพิษ ได้แก่ ใบ ราก และเถา มีรายงานวิจัยว่า หนูที่ได้รับใบรางจืดแห้งสามารถต้านพิษที่เกิดจากสารฆ่าแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตได้ (สุชาสินี และคณะ, 2551) นันทวัน และคณะ (2554) ศึกษาผลของน้ำต้มใบรางจืดสดต่อกลุ่มเกษตรกรที่มีผลตรวจเลือดมีสารเคมีอยู่ในระดับที่เป็นอันตราย ผลการทดลองพบว่ากลุ่มตัวอย่างเกษตรกรที่ได้รับสารสกัดใบรางจืดมีระดับสารเคมีอยู่ในระดับที่ไม่เป็นอันตรายมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดจากใบรางจืด

เอนไซม์กลุ่มออกซิโดรีดักเตสในพืช (Oxidoreductase in plant)

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) EC 1.11.1.7 เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มออกซิโดรีดักเตส เป็นเอนไซม์ที่มีหมู่พรอสเทติกเป็นฮีม เรียก ฮีโมโปรตีน (hemoprotein) การแลกเปลี่ยนหมู่ต่าง ๆ ที่ตำแหน่งที่มีเหล็กอยู่ทำให้เปอร์ออกซิเดสสามารถใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนและออกซิไดส์สารประกอบที่ให้อิเล็กตรอนดังสมการ

$$2HA + H_2O_2 \xrightarrow{\text{peroxidase}} 2H_2O + 2A \text{ (ให้สี)}$$

โดยมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาดังนี้

$$E + H_2O_2 \longrightarrow \text{compound I} + H_2O \qquad \text{สมการที่ 1}$$

$$\text{compound I} + AH_2 \longrightarrow \text{compound II} + AH \qquad \text{สมการที่ 2}$$

$$\text{compound II} + AH_2 \longrightarrow E + AH + H_2O \qquad \text{สมการที่ 3}$$

โดยที่ E คือ ferric enzyme ที่เป็นรูปแบบในระยะพัก (resting)

AH_2 คือ สับสเตรทในสภาวะที่ถูกรีดิวซ์

AH คือ สับสเตรทที่ถูกออกซิไดซ์

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จะออกซิไดส์สับสเตรทในสภาวะที่มี H_2O_2 ซึ่งสามารถใช้สับสเตรทในกลุ่มฟีนอลิกได้หลายชนิด เช่น guaiacol parogallol (Vianello et al., 1997)

เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase) EC.1.10.3.1) เป็นเอนไซม์ที่มีโลหะทองแดงบริเวณเร่งปฏิกิริยา สับสเตรทส่วนใหญ่ของเอนไซม์จะเป็น O-dihydroxyphenols ไปเป็น O-benzoquinone ซึ่งเกิดจากการออกซิไดส์ที่หมู่ OH โดยมีออกซิเจนเป็นสับสเตรทตัวที่ 2 (Martinez and Whitaker, 1995)

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและการสลายสี

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (EC 1.11.1.7) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกซิเดชัน สามารถพบได้ในพืช สัตว์ และแบคทีเรีย โดยทำหน้าที่ในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ในกระบวนการเมทาบอลิซึมในสิ่งมีชีวิต โดยในพืชพบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเกี่ยวข้องกับระบบต่าง ๆ ในพืช โดยเฉพาะเกี่ยวข้องกับกระบวนการป้องกันตนเองในพืช เช่น การสร้างลิกนินและซูเบอริน การสร้างสารประกอบในผนังเซลล์ การสังเคราะห์ไฟโตอเล็กซิน เกี่ยวข้องกับกระบวนการสลายรีแอคทีฟออกซิเจนสปีชีส์ (reactive oxygen species) รีแอคทีฟไนโตรเจนสปีชีส์

(reactive nitrogen species) เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการตอบสนองอย่างรวดเร็ว (hypersensitive response) การตายของเซลล์บริเวณที่เกิดการติดเชื้อเพื่อป้องกันการลุกลามของเชื้อ (Almagro et al., 2009) และมีการนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย โดยธรรมศักดิ์ (2547) ได้ทำการศึกษาผลของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากยางพาราต่อการสลายสารประกอบจำพวกฟีนอลร่วมกับระบบการกำจัดน้ำเสียในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม พบว่าการใช้เอนไซม์เปอร์ออกสิเดสร่วมกับระบบกำจัดน้ำเสียสามารถลดปริมาณสารประกอบฟีนอลได้ร้อยละ 95 Bilal และ Asgher (2015) ได้ทำบริสุทธิ์เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจากเห็ดหลินจือแล้วตรึงบนตัวกลางแล้วทำการศึกษาการสลายสีย้อมสังเคราะห์ (Sandal reactive dyes) พบว่า เอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ตรึงบนตัวกลางสามารถสลายสีย้อมที่ศึกษาได้สูงสุด 92.29% ในรอบแรก และได้ 60% เมื่อสลายสีย้อมครบ 6 รอบ และนอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของ แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ตรึงบนเม็ดบีทแคลเซียมอัลจิเนทต่อการกำจัดสีย้อม และการลดพิษ พบว่าเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ตรึงอยู่บนตัวกลางดังกล่าวสามารถสลายสีย้อม Sandal-fix Red C_4BLN, Sandal-fix Turq Blue GWF, Sandal-fix Foron Blue E_2BLN, Sandal-fix Black CKF and Sandal-fix Golden Yellow CRL dyes ได้ถึง 87.5 %, 82.1 %, 89.4 %, 95.7 % และ 83 % ตามลำดับ และยังสามารถลดค่า biochemical oxygen demand (BOD) ได้ 94.61-95.47 %, ค่า chemical oxygen demand (COD) ได้ 91.18-94.85 %, และ total organic carbon (TOC) ได้ 89.58-95 % ในลารละลายสีย้อม ทั้งยังสามารถมีประสิทธิภาพในการสลายได้ถึง 7 รอบการทำงาน

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและโพลีฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดหยาบจากใบรางจืด
2. เพื่อศึกษาความสามารถในการสลายสีย้อมของสารสกัดหยาบจากใบรางจืด
3. เพื่อทดสอบผลของสารสกัดหยาบของใบรางจืดต่อการสลายสีในน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันปาล์ม

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในสารสกัดหยาบใบรางจืด
2. ทราบกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดหยาบใบรางจืด
3. ทราบความสามารถในการสลายสีย้อมของสารสกัดหยาบใบรางจืดเมื่อถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนท

บทที่ 2
วิธีการดำเนินการวิจัย

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

ใบรางจืดได้จากการเก็บใบรางจืดในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช (ไสใหญ่) ช่วงเดือน สิงหาคม-ตุลาคม 2561

2. การสกัดสารจากใบรางจืด

การสกัดสารจากใบรางจืด ประยุกต์ใช้ตามวิธีการของ KAR และ MISHRA (1976) นำใบรางจืดที่ล้างสะอาด ผึ่งให้แห้ง จำนวน 10 กรัม บดด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด จากนั้นเติมสารละลาย 0.1 M phosphate buffer pH 6.8 ที่ผสม 0.25% v/v triton X-100 ปริมาตร 20 ml c และเติม PVPP 3% w/v จากนั้นกรองกากใบออกด้วยผ้าขาวบาง นำสารสกัดที่ได้หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm เป็นเวลานาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เก็บสารละลายส่วนใสที่ได้ แล้วเก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3. การวัดปริมาณโปรตีนในสารสกัดหยาบ

การวัดปริมาณโปรตีนของสารสกัดหยาบทำตามวิธีการของ Bradford (1976) โดยปฏิกิริยาในการทดสอบประกอบด้วยสารละลายแบรดฟอร์ดปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารตัวอย่างปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เทียบปริมาณโปรตีนด้วยกราฟมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้น 10-100 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร

4. การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสประยุกต์ตามวิธีการของ Fick และ Qualset (1975) และ KAR และ MISHRA (1976) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย ตัวอย่างปริมาณ 200 µL ในบัฟเฟอร์ 200 µL ที่ประกอบด้วย 50 mM phosphate buffer pH 6.8 10 mM H_2O_2 และ 10 mM pyrogallol บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 5 นาที แล้วเติม 200 µL ของ 5% H_2SO_4 เพื่อหยุดปฏิกิริยา และวัดค่าเอนไซม์ที่ไม่ทำงานโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วย 200 µL ของ 5% H_2SO_4 ก่อน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของ purpurogallin ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 430 nm ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมีเตอร์ กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสคำนวณโดยใช้สูตร $(\Delta A \times T)/(t \times v \times w)$ เมื่อ ΔA คือค่าการดูดกลืนแสงจากปฏิกิริยา ($A_{active} - A_{inactive}$) T คือปริมาตรทั้งหมด, t คือเวลาที่ใช้ในการบ่ม (5 นาที) v คือปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยา และ

w คือน้ำหนักของใบที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสรายงานอยู่ในหน่วย Unit $min^{-1}g^{-1}$ fresh weight (U min^{-1} g^{-1} FW).

5. การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

วัดโดยการดัดแปลงตามวิธีการของ Altunkaya and Gökmen (2008) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 200 µL ของ 0.01 M catechol ใน 1.5 mL ของ 0.1 M phosphate buffer pH 6.8 จากนั้นเติมสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 200 µL วัดค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 495 nm ทุก ๆ 15 วินาที เป็นเวลา 1 นาที กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปต่อนาทีต่อกรัมน้ำหนักใบรางจืดสด (OD min^{-1} g^{-1} FW)

6. การทดสอบความสามารถในการสลายสีย้อม

การทดสอบความสามารถในการสลายสีย้อมทำโดยในปฏิกิริยาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วยการสลายสีย้อมประกอบด้วยสีย้อม 10 mM H_2O_2 แล้วเติมสารสกัดหยาบจากใบรางจืดลงไปปริมาตร 100 µL ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเฉพาะของสีที่นำมาทดสอบ โดยชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัด คำนวณหา เปอร์เซ็นต์การสลายสีดังสมการ

$$\%\text{การสลายสี} = \frac{OD_c - OD_t}{OD_c} \times 100$$

โดยที่ OD_c คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม และ OD_t คือ ค่าการดูดกลืนแสงของในชุดที่มีสารสกัด

7. การตรึงสารสกัดหยาบด้วยแคลเซียมอัลจิเนท

การตรึงสารสกัดหยาบรางจืดดัดแปลงจากวิธีการของ Bilal and Asgher (2015) โดยการละลายโซเดียมอัลจิเนทในสารสกัดหยาบรางจืดที่ความเข้มข้น 2% w/v แล้วทำให้เกิดเม็ดบีทโดยการหยดผ่านไซริงค์ที่มีขนาดเข็มต่าง ๆ คือ 18Gx1" (1.2x25 mm) 21Gx1" (0.8x25 mm) และ 25Gx1" (0.5x25 mm) ลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 200 mM เพื่อให้เกิดการสร้างเป็นเม็ดบีท จากนั้นบ่มในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เจลมีการแข็งตัวเต็มที่ นำเจลมาล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง แล้วตั้งทิ้งไว้ให้สะเด็ดน้ำ วัดขนาดเจลที่เตรียมได้ขนาดต่าง ๆ เก็บเจลที่เตรียมได้ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบในขั้นตอนต่อไป เจลควบคุมทำโดยการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M phosphate buffer pH 6.8 แทนสารสกัดหยาบ

8. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในเม็ดบีท

ปฏิกิริยาทำเช่นเดียวกับการวัดกิจกรรมเอนไซม์ปอร์ออกซิเดสในสารสกัดหยาบ แต่เปลี่ยนระยะเวลาการวัดเป็น 1 นาที โดยการหยุดปฏิกิริยาด้วยการนำเม็ดบีทออก

9. การทดสอบการสลายสีย้อมของเม็ดบีท

การทดสอบการสลายสีย้อม ทำโดยการนำสีย้อมชนิดต่าง ๆ 4 กลุ่ม คือ 1) กลุ่ม triphenylmethane ได้แก่ Crystal violet (A589nm) Malachite green (A615nm) Bromocresol green (A615nm) และ Bromothymol blue (A612nm) 2) กลุ่ม Phenazine ได้แก่ Safranin-O (A527nm) 3) กลุ่ม Phenol ได้แก่ Phenol red (A578nm) และ Bromophenol blue (A594nm) และ 4) กลุ่ม Azo ได้แก่ Methyl orange (A482nm) Methyl blue (A662nm) และ Methyl red (A431nm) โดยค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นของสีแต่ละชนิดเท่ากับ 1.000 ± 0.200 ปริมาตร 3 ml ผสมกับเม็ดบีทปริมาณ 0.5 กรัม ในหลอดทดลอง เขย่าที่ความเร็ว 100 rpm จากนั้นสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสีชนิดต่าง ๆ เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสีที่ไม่มีเม็ดบีท รายงานผลเป็น %Decolorization ดังสมการ

$$\%\text{การสลายสี หรือ }\%\text{Decolorization} = \frac{OD_c - OD_b}{OD_t} X\ 100$$

โดยที่ OD_c คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดที่ไม่มีเม็ดบีท และ OD_b คือ ค่าการดูดกลืนแสงของในชุดที่มีเม็ดบีท

10. ผลของ pH ต่อกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และความสามารถในการสลายสีย้อม

เม็ดบีทรางจืดและเม็ดบีทบัฟเฟอร์ (เม็ดบีทควบคุม) ที่เตรียมได้ ถูกบ่มและไม่บ่มด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 เป็นเวลานาน 30 นาที จากนั้นจะถูกนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งก่อนนำไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และความสามารถในการสลายสีย้อม

11. ผลของ pH ต่อกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และความสามารถในการสลายสีย้อม

เม็ดบีทรางจืดและเม็ดบีทบัฟเฟอร์ (เม็ดบีทควบคุม) นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 50 60 70 80 90 และ 100 องศาเซลเซียส ชุดควบคุมบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 30 นาที จากนั้นนำเม็ดบีททดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และความสามารถในการสลายสีย้อม

12. การทดสอบความสามารถในการสลายสีน้ำเสียโรงงานน้ำมันปาล์มของเม็ดบีทรางจืด

นำน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่ผ่านการกรองเอาตะกอนออกแล้ว ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมกับเม็ดบีทรางจืดจำนวน 0.5 กรัม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง สังเกตการสลายสีของน้ำเสีย และสแกนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 360-800 nm

13. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย One-Way ANOVA ด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistic 21

บทที่ 3
ผลการวิจัย และวิจารณ์ผล

ผลการวิจัย

3.1 การสกัดสารสกัดหยาบใบรางจืดในระยะต่าง ๆ

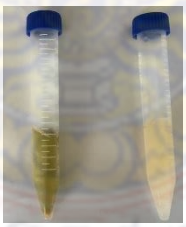
เมื่อนำใบรางจืดระยะต่าง ๆ ได้แก่ ระยะใบอ่อน ระยะใบกลาง และระยะใบแก่ (รูปที่ 2) มาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วสกัดด้วยสารละลาย 0.1 M phosphate buffer pH 6.8 แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4ºC พบว่าสารสกัดหยาบที่ได้มีสีเขียวเข้ม และมีความหนืดมาก (รูปที่ 3) ทั้ง 3 ระยะ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารสกัดหยาบจากใบทั้ง 3 ระยะ พบว่าสารสกัดจากใบรางจืดระยะใบกลางมีปริมาณโปรตีนมากที่สุด (2.75 ± 0.15 mg protein/g fresh weight) เมื่อเทียบกับทั้งใบอ่อน (1.79 ± 0.14 mg protein/g fresh weight) และใบแก่ (2.25 ± 0.39 mg protein/g fresh weight) แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนใบแก่มีปริมาณโปรตีนมากกว่าใบอ่อนอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 5) สารสกัดหยาบจากใบรางจืดที่ได้มีสีเข้มมากดังรูปที่ 3 ซึ่งไม่เหมาะกับการนำไปใช้ในการสลายสีย้อม จึงนำไปตกตะกอนด้วย 80% v/w เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) พบว่าสีสารสกัดจางลงเล็กน้อย และเมื่อนำไปทำไดอะไลซีสเพื่อกำจัดสารละลายเกลือจากสารสกัด พบว่าสีในสารสกัดยังไม่จางลง จึงนำใบรางจืดไปกำจัดสีโดยการชะสีออกด้วยเมทานอลความเข้มข้น 99% v/v โดยใช้ใบระยะกลาง แบ่งครึ่งใบตามความยาวของเส้นใบ โดยนำเส้นใบออกแล้วซีกหนึ่งไปชะด้วยเมทานอล ส่วนใบอีกซีกไม่ชะด้วยเมทานอล ใบแต่ละซีกที่ทำการแบ่งจะถูกตัดเป็นชิ้นขนาด 1.5 x 1.5 cm^2 แช่ในเมทานอล 3 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที เพื่อชะสีออกจากใบ ส่วนใบที่ไม่ชะจะถูกแช่ด้วยน้ำกลั่นแทน เมื่อชะเสร็จใบทั้งสองซีกจะถูกนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง ก่อนทำการสกัดใบรางจืดด้วยวิธีเดียวกับที่อธิบายไว้ข้างต้น ได้สารสกัดดังรูปที่ 4 เมื่อเทียบระหว่างใบที่ทำการสกัดสีออกโดยเมทานอลและไม่สกัดสีออก พบว่าใบที่สกัดสีออกด้วยเมทานอลรูปที่ 4 ข มีสีจางลงมากเมื่อเทียบกับใบที่ไม่สกัดสีออก รูปที่ 4 ก และเมื่อวัดปริมาณโปรตีนในใบที่ไม่ได้แช่เมทานอลก่อนการสกัดพบว่าปริมาณโปรตีนเฉลี่ยเท่ากับ 3.26 ± 1.1 mg protein/g fresh weight ส่วนใบที่แช่เมทานอลก่อนนำไปสกัดมีปริมาณโปรตีนเฉลี่ยเท่ากับ 0.66 ± 0.009 mg protein/g fresh weight ซึ่งปริมาณโปรตีนในใบที่ชะด้วยเมทานอลลดลงประมาณ 4.9 เท่า

ก ข ค

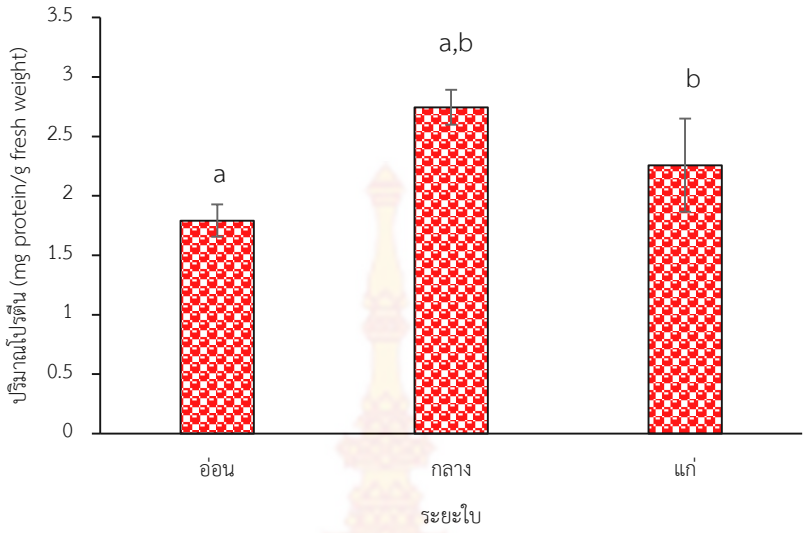
รูปที่ 2 ใบรางจืดระยะต่าง ๆ ที่นำมาสกัด โดย ก คือ ใบรางจืดระยะอ่อน มีลักษณะใบนิ่ม ข คือ ใบรางจืดระยะกลาง คือหมายถึงมีใบนิ่มกึ่งอ่อนกึ่งแข็ง และ ค คือ ใบรางจืดแก่ มีลักษณะใบที่แข็งหยาบ

รูปที่ 3 สารสกัดใบรางจืด

ก ข



รูปที่ 4 สารสกัดใบรางจืดเมื่อชะสีใบออกด้วยเมทานอล โดย ก และ ข คือ สารสกัดใบที่ไม่ชะสีและชะสีด้วยเมทานอล ตามลำดับ



รูปที่ 5 ปริมาณโปรตีนในใบรางจืดระยะต่าง ๆ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) และ อักษรพิมพ์เล็กภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติของค่าในแต่ละคอลัมน์ ซึ่งวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวโดยใช้ One-way ANOVA ด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistic 21

3.2 กิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในสารสกัดหยาบ

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในสารสกัดหยาบระยะใบอ่อน ใบกลาง และใบแก่ วัดโดยใช้สับสเตรท 3 ชนิด คือ guaiacol, pyrogallol และ syringaldazine และสับสเตรทร่วม H_2O_2 ผลการทดลองดังตารางที่ 1 เมื่อใช้สับเสตรทแตกต่างกัน พบกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสแตกต่างกัน โดยใบระยะกลางมีปริมาณเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ทั้งที่ใช้สับสเตรทเป็น guaiacol pyrogallol และ syringaldazine สูงที่สุดเมื่อเทียบกับระยะใบอ่อน และใบแก่ และสับสเตรทที่ว่องไวกับกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในสารสกัดหยาบใบรางจืดมากที่สุด คือ pyrogallol (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในสารสกัดหยาบจากใบระยะต่าง ๆ

ระยะใบ	ปริมาณโปรตีน (mg protein/ g fresh weight)	Total activity POD-guaiacol (U/g fresh weight)	Total activity POD-pyrogallol (U/g fresh weight)	Total activity POD-syringaldazine (U/g fresh weight)	Specific activity POD-guaiacol (U/mg protein)	Specific activity POD-pyrogallol (U/mg protein)	Specific activity POD-syringaldazine (U/mg protein)
อ่อน	1.79±0.14[a]	0.026±0.001[a]	1.42±0.0003[b]	0.012±0.0008[a]	0.015±0.0006[a]	0.791±0.0002[b]	0.007±0.0004[a]
กลาง	2.75±0.15[a,b]	0.040±0.001[b]	1.97±0.003[c]	0.039±0.0006[b]	0.27±0.0081[b]	13.427±0.021[c]	0.269±0.0044[b]
แก่	2.26±0.39[b]	0.029±0.001[a]	1.26±0.002[a]	0.029±0.0002[a]	0.013±0.0004[c]	0.558±0.001[a]	0.013±0.0001[a]

*** ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ (mean) ± standard deviation (SD) และ อักษรพิมพ์เล็กภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติของค่าในแต่ละคอลัมน์ ซึ่งวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวโดยใช้ One-way ANOVA ด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistic 21

ตารางที่ 2 กิจกรรมเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดหยาบใบรางจืดระยะต่าง ๆ

ระยะใบ	ปริมาณโปรตีน (mg protein/ g fresh weight)	Total activity PPO (U/g fresh weight)	Specific activity POD (U/mg protein)
อ่อน	1.79±0.14[a]	4,377.60±38.40[a]	2,443.71±21.44[a]
กลาง	2.75±0.15[a,b]	9,991.68±135.00[c]	6,8287.5±922.66[b]
แก่	2.26±0.39[b]	5,344.00±27.71[b]	2,367.63±12.28[a]

*** ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ (mean) ± standard deviation (SD) และ อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติของค่าในแต่ละคอลัมน์ ซึ่งวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวโดยใช้ One-way ANOVA ด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistic 21

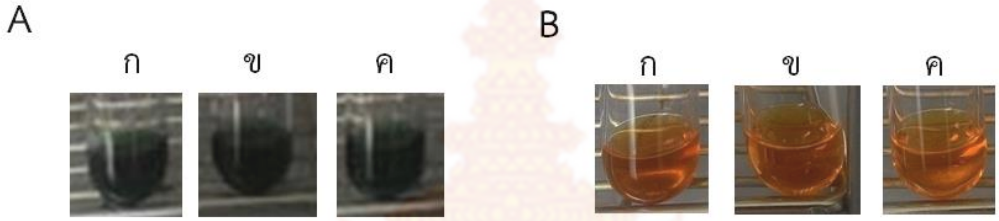
3.3 กิจกรรมเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดหยาบ

กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสวัดด้วยสับสเตรท pyrocatechol พบว่ามีกิจกรรมที่ว่องไว โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ดังตารางที่ 2 กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสระยะใบกลางมีค่ามากอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ในระยะใบอ่อนและใบกลาง ดังนั้นในการสกัดเพื่อนำไปทดสอบการสลายสีย้อมจึงเลือกใบระยะกลาง เนื่องจากมีปริมาณโปรตีน และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายสีย้อมมากกว่าในระยะใบอื่น ๆ

3.4 การทดสอบความสามารถในการสลายสีย้อมของสารสกัดหยาบใบรางจืด

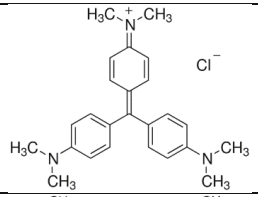
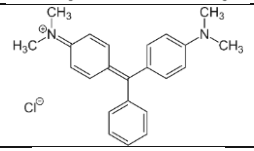
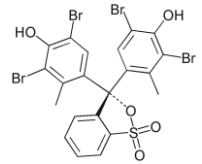
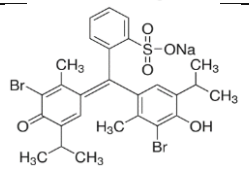
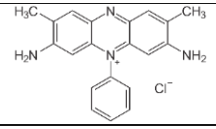
เมื่อนำสารสกัดใบรางจืดที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และโพลีฟีนอลออกซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีรายงานในพืชอื่น ๆ ว่ามีความสามารถในการสลายสีย้อม มาทดสอบความสามารถในการสลายสีย้อมเบื้องต้น โดยการผสมสารสกัดหยาบที่ได้กับสีย้อมผสมกับ H_2O_2 เพื่อทดสอบความสามารถในการสลายสีย้อมในแง่การทำงานของกิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสีที่หายไปในการทำปฏิกิริยา โดยค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดและตัวอย่าง จะถูกนำมาหักออกด้วยค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดเพื่อศึกษาการสลายสี เนื่องจากสารสกัดหยาบที่ใช้มีสีรงควัตถุปนอยู่ โดยให้เวลาในการสลายสีย้อม 24 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดหยาบจากใบรางจืดมีความสามารถในการสลายสีย้อมบางสีได้ และไม่สามารถสลายสีย้อมบางสีได้ (ดังตารางที่ 3 และรูปที่ 7) จากสีที่นำมาทดสอบการสลายด้วยสารสกัดหยาบจำนวน 10 สี ได้แก่ Crystal violet, Malachite green, Bromocresol green, Bromothymol blue, Safranin-O, Phenol red, Bromophenol blue, Methyl orange, Methyl blue และ Methyl red แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มตามโครงสร้าง คือ กลุ่ม triphenylmethane ได้แก่สี Crystal violet, Malachite green, Bromocresol green และ Bromothymol blue กลุ่ม Phenazine ได้แก่ สี Saffranin-O กลุ่ม Phenol ได้แก่ Phenol red, Bromophenol blue และ กลุ่ม Azo ได้แก่ สี Methyl orange, Methyl blue และ Methyl red เมื่อใช้สารสกัดหยาบจากใบรางจืดร่วมกับ H_2O_2 สามารถสลายสีย้อมได้จำนวน 6 สีได้แก่สี Phenol red, Bromophenol blue, Methyl orange, Methyl blue, Bromothymol blue และ Crystal violet โดยมี %Decolorization เท่ากับ 61.71±3.24, 54.26± 2.66, 52.50±2.59, 51.72±3.69, 44.72±0.50 และ 30.15±0.98% ตามลำดับ โดยผลการทดสอบเป็นผลการวิเคราะห์ที่แสดงให้เห็นถึงผลของสารสกัดร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่เมื่อพิจารณาการสลายสี พบว่าไดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียวก็มีความสามารถในการสลายสี และสารสกัดเพียงอย่างเดียวก็มีความสามารถในการสลายสีด้วย การสลายสีย้อมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์น่าจะมาจากการที่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็น oxidizing agent จึงทำให้สามารถสลายโครงสร้างของสีได้ ส่วนสารสกัดหยาบเพียงอย่างเดียวก็สามารถสลายสีย้อมได้เช่นเดียวกัน ซึ่งในสารสกัดหยาบของใบรางจืด มีกิจกรรมของเอนไซม์โพ

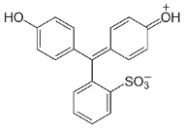
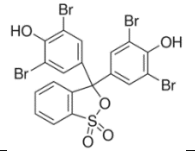
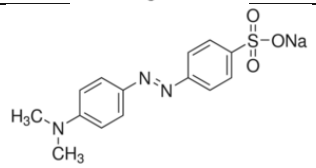
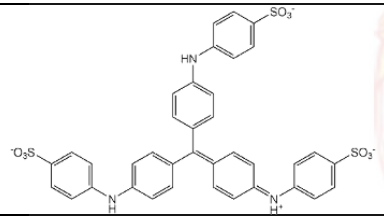
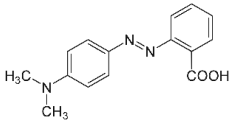
ลีฟีนอลออกซิเดส ซึ่งมีรายงานว่ามีความสามารถในการสลายสีย้อม แต่ในการทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบรางจืดโดยการใช้สารสกัดหยาบโดยตรงอาจทำให้ปัญหาสีปนเปื้อนเพิ่มขึ้นเนื่องจากมีสีของสารสกัดหยาบจากใบรางจืดเองรบกวนอยู่มากด้วย โดยเฉพาะเมื่อต้องใช้สารสกัดที่มีความเข้มข้นมากในการสลายสี ดังนั้นจึงนำสารสกัดไปตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 80% แล้วกำจัดเกลือออกด้วยการไดอะไลซีส พบว่าสีสารสกัดจางลงไปเพียงเล็กน้อย สารสกัดหยาบรางจืดจึงไม่เหมาะในการใช้งานโดยตรง



รูปที่ 6 การสลายสีย้อมของสารสกัดหยาบจากใบรางจืดโดยรูป A คือสี Malachite green และรูป B คือสี methyl orange โดย ก คือ ชุดทดสอบที่มีสีย้อมเพียงอย่างเดียว ภาพ ข คือชุดทดสอบที่มีสีย้อมและ H_2O_2 และภาพ ค คือ ชุดทดสอบที่มีสีย้อมและ H_2O_2 และสารสกัดหยาบจากใบรางจืด

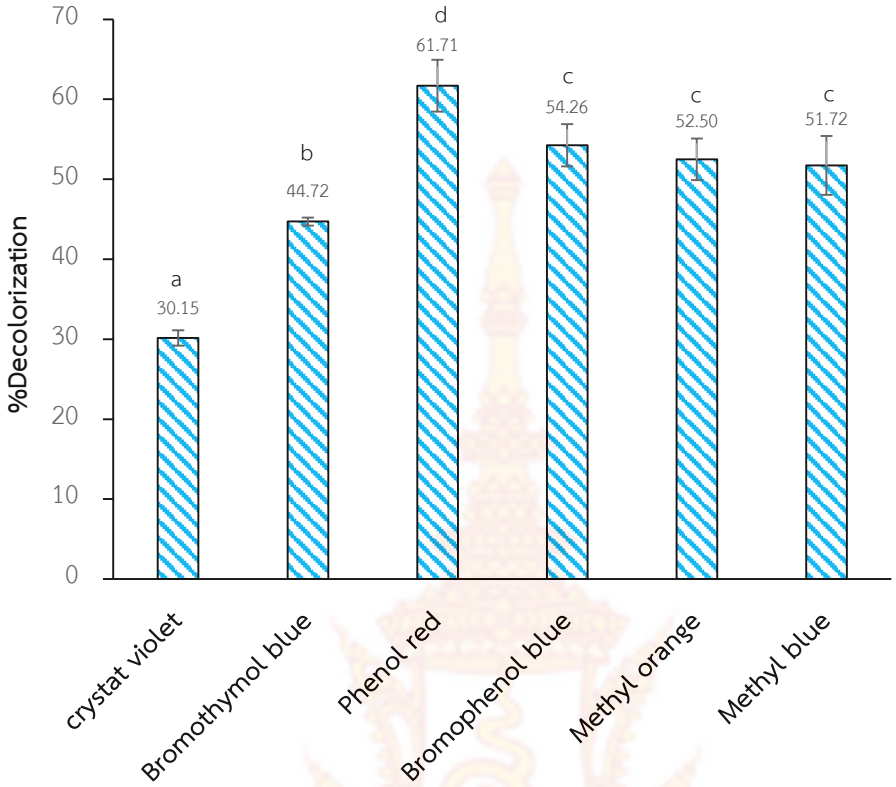
ตารางที่ 3 กลุ่มสีย้อมที่ทดสอบ และโครงสร้างของสีย้อม และความสามารถในการสลายสีย้อมของสารสกัดหยาบร่วมกับ H_2O_2

กลุ่มสีย้อม	**โครงสร้าง**	**สี**	**ความยาวคลื่นของสี (λ_{max})**	**ความสามารถในการสลายสีของสารสกัดหยาบร่วมกับ H_2O_2**
triphenylmethane		Crystal violet	A_{589}	+
		Malachite green	A_{615}	-
		Bromocresol green	A_{615}	-
		Bromothymol blue	A_{612}	+
Phenazine		Safranin-O	A_{527}	-

กลุ่มสีย้อม	โครงสร้าง	สี	ความยาวคลื่นของสี (λ_{max})	ความสามารถในการสลายสีของสารสกัดหยาบร่วมกับ H_2O_2
Phenol		Phenol red	A_{578}	+
		Bromophenol blue	A_{594}	+
Azo		Methyl orange	A_{482}	+
		Methyl blue	A_{662}	+
		Methyl red	A_{431}	-

*** + หมายถึง สารสกัดสามารถสลายสีย้อมได้

- หมายถึง ไม่สามารถสลายสีย้อมได้



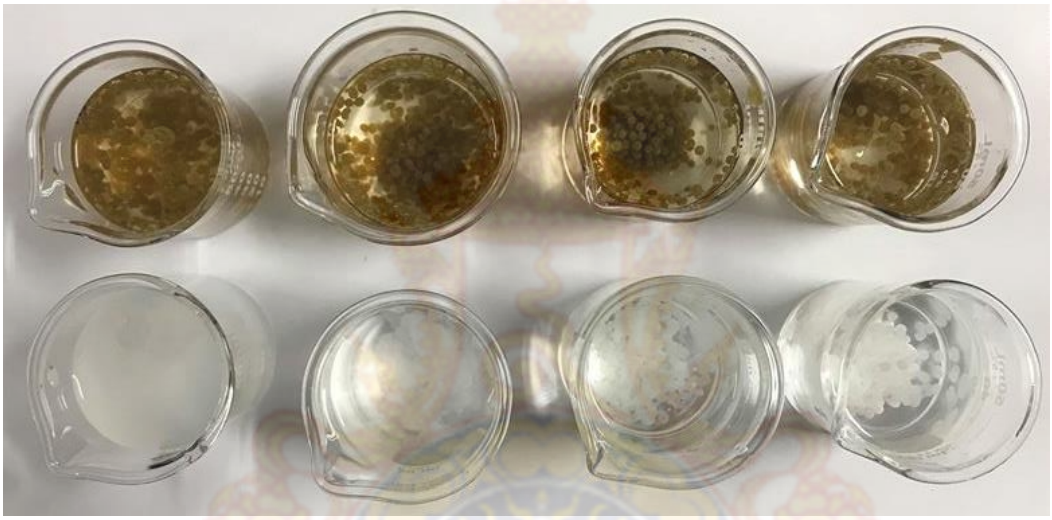
รูปที่ 7 การสลายสีย้อมของสารสกัดหยาบใบรางจืดร่วมกับ H_2O_2 โดย ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทำการทดสอบ 3 ซ้ำ ± standard deviation (SD) และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงให้เห็นความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวโดยใช้ One-way ANOVA ด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistic 21

3.5 การตรึงสารสกัดหยาบใบรางจืดด้วยแคลเซียมอัลจิเนท

สารสกัดหยาบใบรางจืดถูกนำมาตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต โดยการเลือกความเข้มข้นของแคลเซียมอัลจิเนทที่ใช้ในการตรึงสารสกัด รวมถึงศึกษาลักษณะรูปร่างของสารสกัดภายหลังการตรึง โดยพิจารณาจากความสามารถในการคงรูปและความสามารถในการสลายสีย้อม โดยทำการผสมโซเดียมอัลจิเนทในสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 %w/v จากนั้นนำสารที่ได้ใส่ในกระบอกฉีดยา แล้วให้สารไหลผ่านเข็มฉีดยาขนาด 21Gx1” (0.8x25 mm) thin wall ยี่ห้อ nipro ผลการตรึงดังรูปที่ 8 เมื่อใส่โซเดียมอัลจิเนทในสารสกัดที่ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4 %w/v โดยใช้ชุดควบคุมเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้นเดียวกับสารสกัด เมื่อนำมาทำให้เกิดการตรึงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 200 mM พบว่า ความหนืดของสารละลายขึ้นกับความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนทที่เติม เมื่อให้เกิดการตรึงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์โดยการหยดสารละลายผ่านหลอดฉีดยาลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ พบว่าที่ความเข้มข้น 1% w/v ของ

สารละลายแคลเซียมอัลจิเนทไม่สามารถเกิดเม็ดบีทได้ ซึ่งจะเห็นได้ว่าสารละลายแคลเซียมคลอไรด์มีลักษณะขุ่นขาวในชุดควบคุม และสามารถเกิดเม็ดบีทได้ที่สารละลายโซเดียมอัลจิเนทที่ความเข้มข้น 2 3 และ 4% w/v ส่วนในสารสกัดสามารถเกิดเม็ดบีทได้ทุกความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนท โดยลักษณะของเม็ดบีทที่เกิดขึ้นจะมีความแข็งของเม็ดบีทขึ้นกับความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนท ในการทดลองการทดสอบการสลายสีย้อมจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนท 2% เนื่องจากความหนืดของสารละลายเมื่อผ่านหลอดฉีดยาสามารถเตรียมได้ง่าย

ก ข ค ง



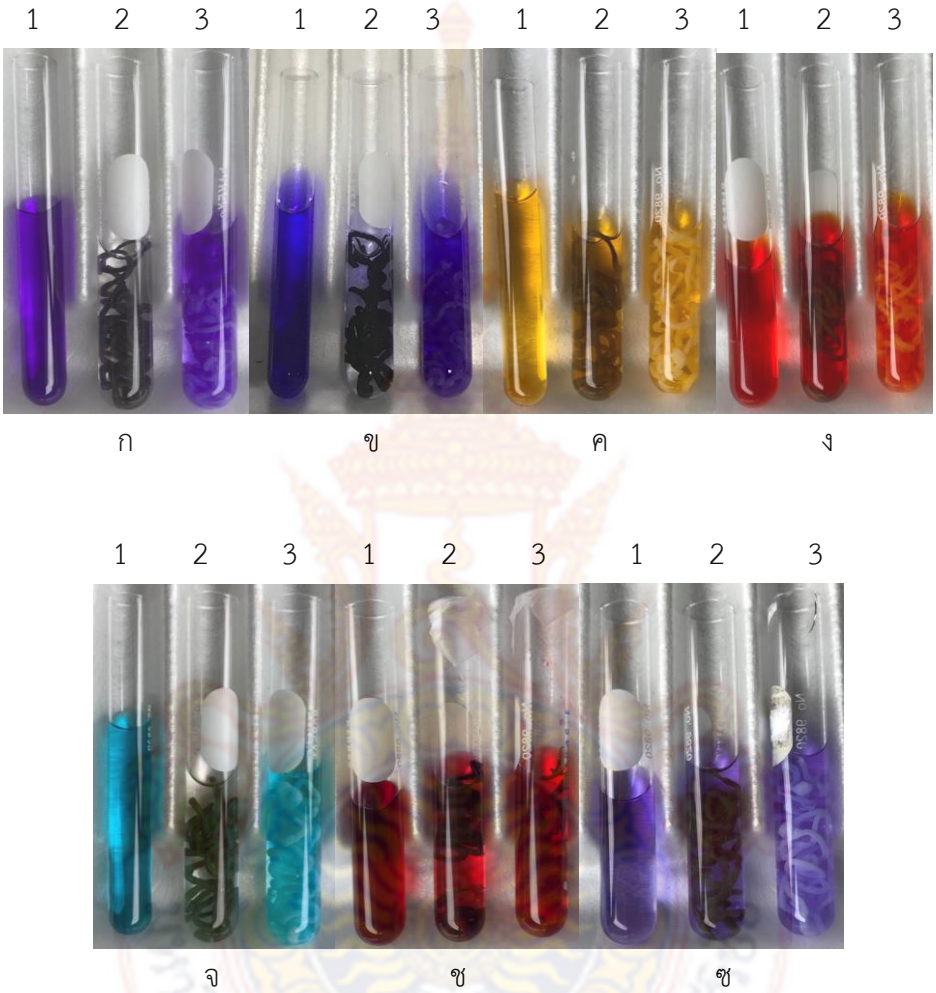
จ ฉ ช ซ

รูปที่ 8 การตรึงสารสกัดหยาบรางจืดด้วยแคลเซียมอัลจิเนทที่ความเข้มข้น 1, 2 , 3 และ 4% w/v โดย ก-ง คือสารสกัดที่ผสมโซเดียมอัลจิเนทที่ความเข้มข้น 1 2 3 และ 4% w/v ตามลำดับ ในสารละลาย 200 mM แคลเซียมคลอไรด์ ส่วน จ-ซ

3.6 การทดสอบความสามารถเบื้องต้นในการสลายสีย้อมของสารสกัดที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนท

การทดสอบการสลายสีย้อมเบื้องต้นโดยใช้การตรึงสารสกัดหยาบด้วยแคลเซียมอัลจิเนท ซึ่งสารสกัดภายหลังจากการตรึงที่ความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนท 4% v/v มีความหนืดมากจึงเตรียมได้เป็นเส้น จึงนำสารสกัดที่ตรึงได้ในรูปแบบเส้นทดสอบการสลายสีย้อมเบื้องต้น โดยเปรียบเทียบระหว่าง สีย้อม สีย้อม+สารสกัดที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนท และ สีย้อมและบัฟเฟอร์ที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนท จากผลการทดสอบพบว่า เมื่อบ่มไว้เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง สารสกัดหยาบใบรางจืดที่ตรึงด้วย

แคลเซียมอัลจิเนท สามารถสลายสี crystal violet, bromothymol blue และ methylene blue ได้ รูปที่ 9 โดยสีที่สามารถสลายได้ดีที่สุด คือ methylene blue ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกศึกษาการสลายสี methylene blue

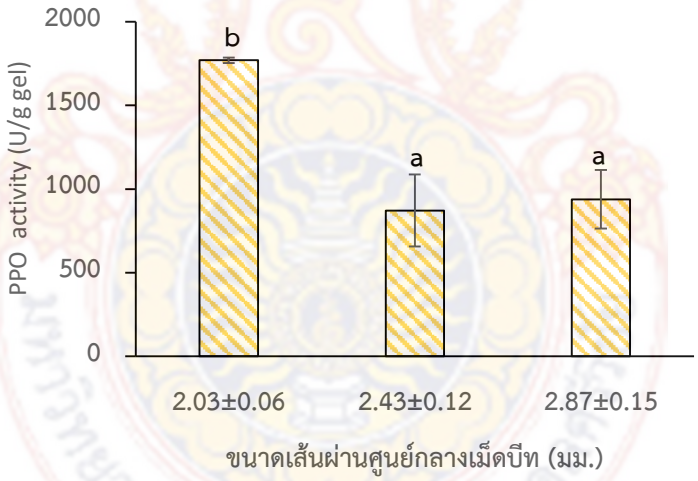


รูปที่ 9 การสลายสีย้อมโดยการตรึงสารสกัดหยาบใบรางจืด โดย ก-ซ คือ สี crystal violet, bromothymol blue, methyl orange, phenol red, methylene blue, safranin-O และ bromocresol green และหมายเลข 1-3 คือ สีย้อม สีย้อมและแคลเซียมอัลจิเนทที่ตรึงสารสกัดหยาบ และสีย้อมและแคลเซียมอัลจิเนทที่ตรึงบัฟเฟอร์ ตามลำดับ

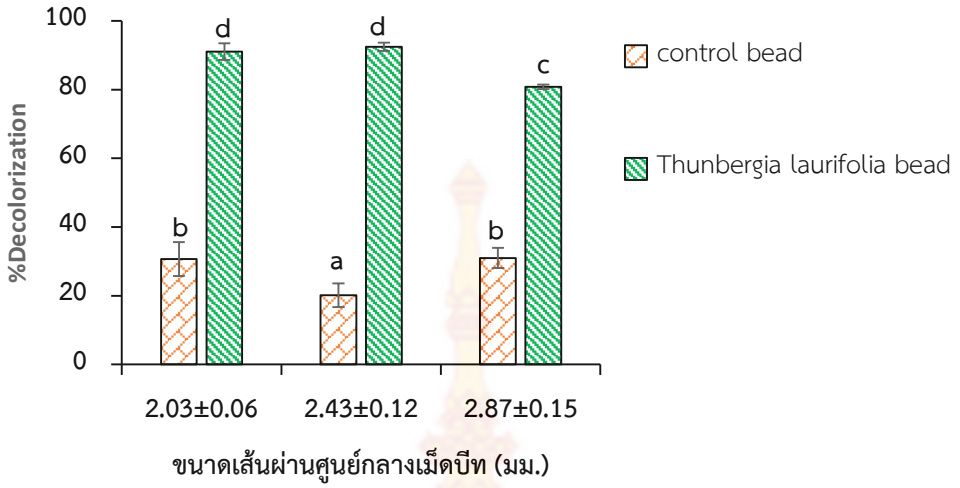
3.7 ขนาดของเม็ดบีทต่อกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และประสิทธิภาพในการสลายสี methylene blue

จากการทดลองความเข้มข้นของเจลที่สามารถเตรียมได้ที่ความเข้มข้น 2% v/w ของโซเดียมอัลจิเนท จึงทำการทดสอบโดยการเตรียมเป็นเม็ดบีท ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่าง ๆ ได้แก่

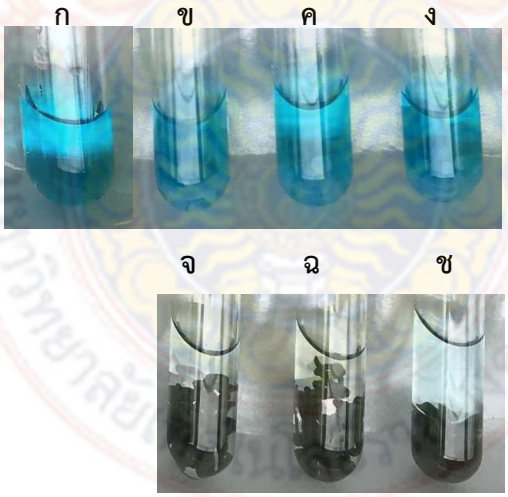
2.03 ± 0.06, 2.30±0.12 และ 2.90±0.15 มิลลิเมตร จากการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส พบว่า เม็ดบีทที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยที่สุด ในน้ำหนักที่เท่ากัน มีกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสมากที่สุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1,769.09 ± 16.13 U/ g gel รองลงมาคือ เม็ดบีทขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.87 ± 0.15 และ 2.43 ± 0.12 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 938.55±174.97 และ 871.51±214.70 U/ g gel ตามลำดับ (รูปที่ 10) ประสิทธิภาพในการสลายสี methylene blue ของเม็ดบีทควบคุมและเม็ดบีทรางจืด (รูปที่ 12) มีร้อยละการสลายสีของเม็ดบีทควบคุมเท่ากับร้อยละ 20.12-30.96 โดยเม็ดบีทควบคุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 2.03±0.06 มิลลิเมตร มีร้อยละการสลายสีมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 30.96±2.93 รองลงมาคือ เม็ดบีทขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.43±0.12 และ 2.87±0.15 มิลลิเมตร โดยมีค่าร้อยละการสลายสีเท่ากับ 30.70±4.94 และ 20.12±3.42 ตามลำดับ (รูปที่ 11) และเม็ดบีทรางจืดมีร้อยละการสลายสีย้อมเท่ากับ 80-91 โดยเม็ดบีทรางจืดขนาดเล็กมีร้อยละการสลายสีย้อมมากที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 91.07±2.39



รูปที่ 10 กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ในเม็ดบีทรางจืดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่าง ๆ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทำการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงให้เห็นความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวโดยใช้ One-way ANOVA ด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistic 21



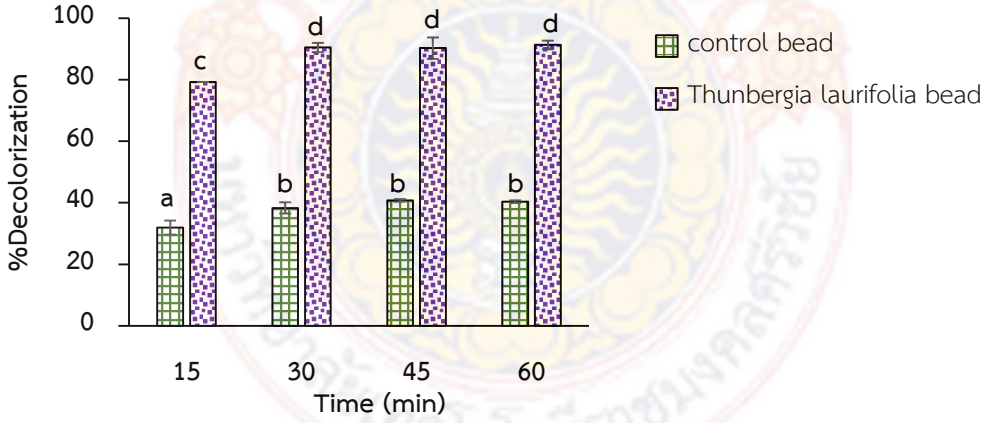
รูปที่ 11 ร้อยละการสลายสี methylene blue ของเม็ดบีทรางจืดและเม็ดบีทควบคุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่าง ๆ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบ 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) และตัวอักษรพิมพ์เล็กภาษาอังกฤษแสดงให้เห็นความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวโดยใช้ One-way ANOVA ด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistic 21



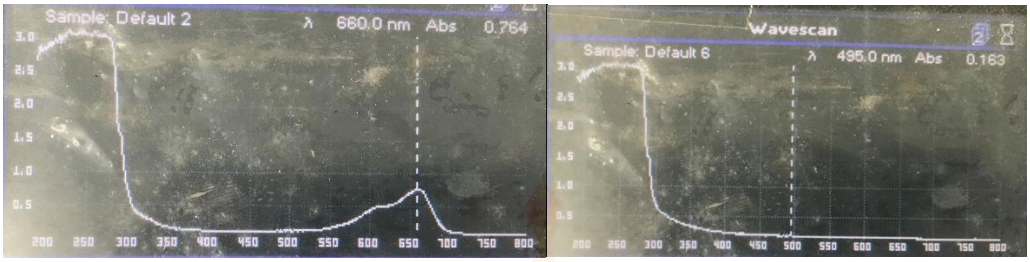
รูปที่ 12 การสลายสี methylene blue โดยใช้เม็ดบีทรางจืดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่าง ๆ โดย ก คือ สีย้อม ข-ง คือ สีย้อมและเม็ดบีทควบคุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.03±0.06, 2.43±0.12 และ 2.87±0.15 มิลลิเมตร ตามลำดับ และ จ-ช คือ สีย้อมและเม็ดบีทรางจืดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.03±0.06, 2.43±0.12 และ 2.87±0.15 มิลลิเมตร ตามลำดับ

3.9 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการสลายสี methylene blue ของเม็ดบีท

เมื่อนำเม็ดบีทรางจืดมาสลายสีที่เวลาต่าง ๆ (15 30 45 และ 60 นาที) โดยใช้การเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm พบว่า เม็ดบีทชุดควบคุมสามารถสลายสีย้อมในเวลา 45 และ 60 นาที ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ที่เวลา 30 นาที และ 15 นาที น้อยที่สุด โดยมีค่าร้อยละการสลายสีเท่ากับ 40.77±0.37 40.36±0.38 38.33±1.82 และ 31.94±2.32 ตามลำดับ โดยที่เวลา 30 45 และ 60 นาที ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่ เมื่อเทียบเวลาดังกล่าวกับที่เวลา 15 นาที มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนเม็ดบีทรางจืด สามารถสลายสีได้ดีที่สุดเมื่อใช้เวลาในการสลาย 60 นาที รองลงมา คือ 30 45 และ 15 นาที ตามลำดับ โดยมีค่าร้อยละการสลายสีเท่ากับ 91.35±1.41 90.49±1.52 90.29±3.45 และ 79.27±0.00 ตามลำดับ โดยที่เวลา 30 45 และ 60 นาที ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่ที่เวลาดังกล่าวมีค่าร้อยละการสลายสีมากกว่า 15 นาที อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 13) ดังนั้น ระยะเวลาที่เหมาะสมในการสลายสี methylene blue ของเม็ดบีทรางจืด คือ 45 นาที เมื่อสี methylene blue ที่ไม่ผ่านการบ่ม และ บ่มด้วยเม็ดบีทรางจืดมาสแกนความยาวคลื่นช่วง 360-800 นาโนเมตร พบว่าความยาวคลื่น 662 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นของสี methylene blue ในสีที่บ่มด้วยเม็ดบีทค่าการดูดกลืนแสงหายไปสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ใน รูปที่ 13



รูปที่ 13 ร้อยละการสลายสีของเม็ดบีทเมื่อให้สลายสีที่เวลาต่าง ๆ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบ 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) และตัวอักษรพิมพ์เล็กภาษาอังกฤษแสดงให้เห็นความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวโดยใช้ One-way ANOVA ด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistic 21



ก ข

รูปที่ 14 ผลการสแกนความยาวคลื่นเปรียบเทียบระหว่างสี methylene blue และสี methylene blue เมื่อบ่มด้วยเม็ดบีทรางจืดที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 380-800 นาโนเมตร

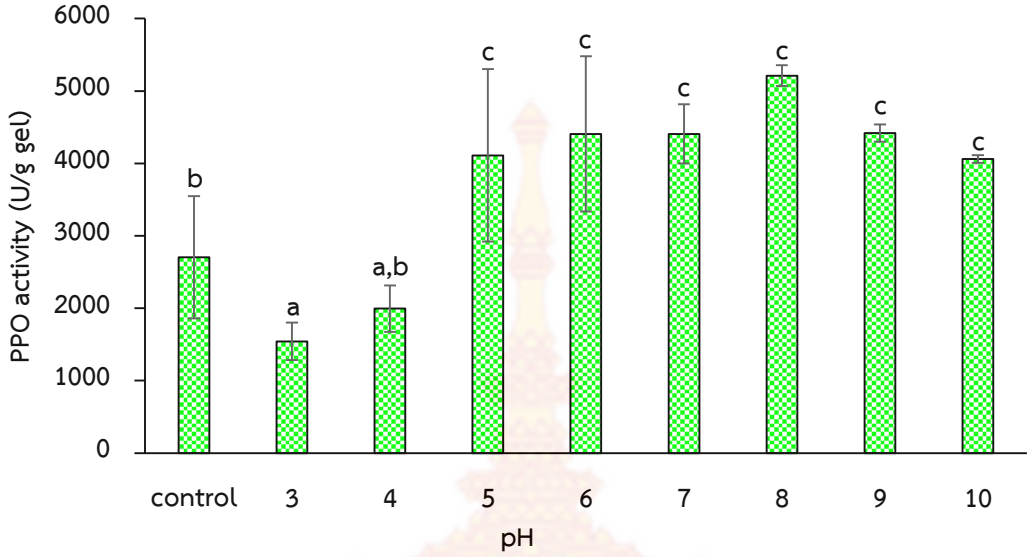
3.10 ผลของ pH ต่อกิจกรรมเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และประสิทธิภาพในการสลายสีย้อมของเม็ดบีทรางจืด

เมื่อทดสอบความสามารถในการทนต่อ pH ของเม็ดบีทที่เตรียมได้ โดยการนำเม็ดบีทไปแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH ต่าง ๆ (3, 4, 5, 6, 7 , 8, 9 และ 10) โดยเม็ดบีทควบคุมเป็นเม็ดบีทที่ไม่บ่มใน pH ใด ๆ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงขนาดของเม็ดบีททั้งในเม็ดบีทควบคุมและเม็ดบีทรางจืด โดยที่ pH ที่ทำให้เม็ดบีทควบคุมมีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด (เม็ดบีทมีการพองตัว) คือ pH 9 โดยมีการพองตัวมากถึงร้อยละ 91.67 และ 99.99 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) เมื่อนำเม็ดบีทรางจืดที่ผ่านการบ่มใน pH ต่าง ๆ ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (รูปที่ 15) พบว่า เม็ดบีทที่บ่มที่ pH 8 มีกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมากที่สุด โดยมีกิจกรรมเท่ากับ 5,212.29±143.20 U/g gel โดยภายหลังการบ่มด้วย pH ตั้งแต่ 5-10 กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสมีค่ามากกว่าชุดควบคุม โดยมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นคิดเป็นร้อยละ 50.21-92.77 ซึ่งแตกต่างกับการบ่มที่ pH 3 และ 4 ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์มีค่าลดลงร้อยละ 43 และ 26.24 เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่บ่มใน pH ใด ๆ เมื่อศึกษาความสามารถในการสลายสีย้อมของเม็ดบีทที่ผ่านการบ่มที่ pH ต่าง ๆ (รูปที่ 16) พบว่าเม็ดบีทควบคุมสามารถสลายสีย้อมได้โดยมีค่าร้อยละการสลายสีย้อมอยู่ในช่วง 50.66-84.82 และเม็ดบีทรางจืดสามารถสลายสีได้ในช่วงร้อยละ 88.00-98.47 แสดงให้เห็นว่าเม็ดบีทสามารถทนต่อ pH ต่าง ๆ ได้และสามารถทำงานได้ดี โดยการสลายสีของเม็ดบีทอาจมาจากการซับสีของเม็ดบีทร่วมกับการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส สังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงของเม็ดบีทหลังการสลายสี (รูปที่ 17)

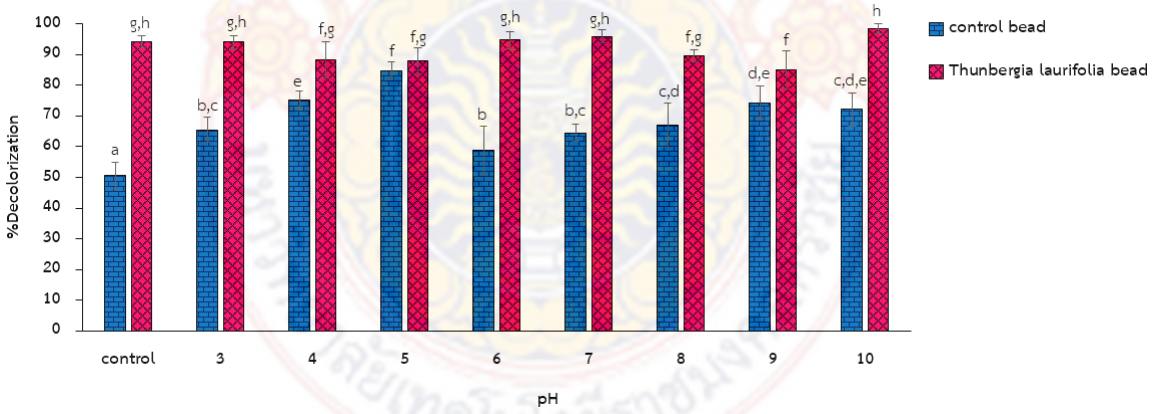
ตารางที่ 4 ขนาดของเม็ดบีทเมื่อผ่านการบ่มในบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆเป็นเวลานาน 30 นาที

pH	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเจลเฉลี่ยหลังบ่มนาน 30 นาที (มิลลิเมตร)	
	เม็ดบีทควบคุม	**เม็ดบีทรางจืด**
Control	1.80±0.26[a]	1.95±0.28[a]
3	1.90±0.21[a]	1.75±0.26[a]
4	2.65±0.41[b,c]	2.60±0.46[b,c]
5	2.80±0.42[c]	2.35±0.34[b]
6	2.50±0.33[b,c]	2.50±0.41[b,c]
7	2.55±0.37[b,c]	2.30±0.42[b]
8	2.55±0.28[b,c]	1.95±0.28[a]
9	3.45±0.44[d]	3.80±0.35[e]
10	2.55±0.16[b,c]	2.75±0.35[c]

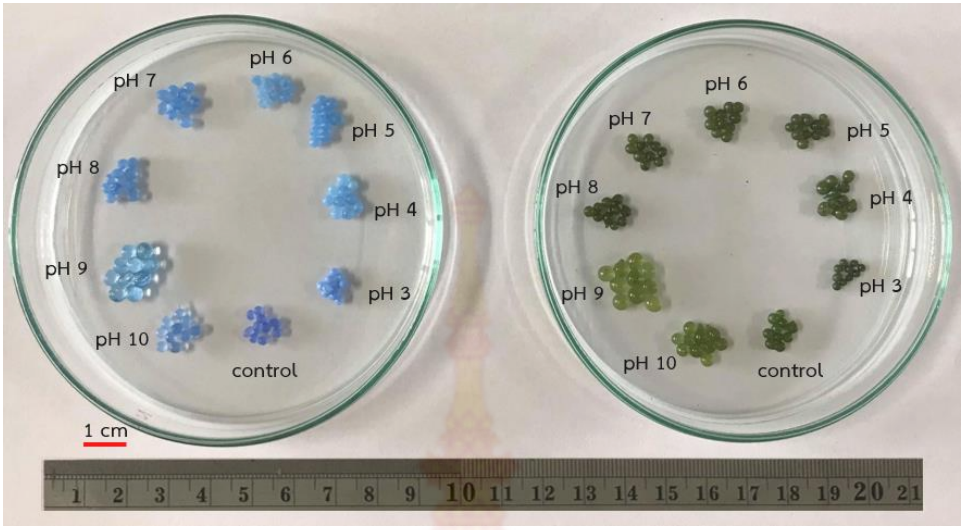
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการสุ่มวัดเส้นผ่านศูนย์กลางเม็ดบีทแต่ละ pH จำนวน 10 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) และตัวอักษรพิมพ์เล็กภาษาอังกฤษแสดงให้เห็นความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวโดยใช้ One-way ANOVA ด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistic 21



รูปที่ 15 กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสของเม็ดบีทที่บ่มใน pH ต่าง ๆ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบ 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) อักษรพิมพ์เล็กภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



รูปที่ 16 ร้อยละการสลายสีย้อมของเม็ดบีทเมื่อบ่มที่ pH ต่าง ๆ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบ 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) และตัวอักษรพิมพ์เล็กภาษาอังกฤษแสดงให้เห็นความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวโดยใช้ One-way ANOVA ด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistic 21



รูปที่ 17 เม็ดบีทรางจืด และเม็ดบีทควบคุมหลังสลายสี methylene blue โดยก่อนนำมาสลายสีเม็ดบีทถูกบ่มด้วยบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ เป็นเวลา 30 นาที โดยด้านซ้ายคือเม็ดบีทควบคุม และรูปด้านขวาคือเม็ดบีทรางจืด

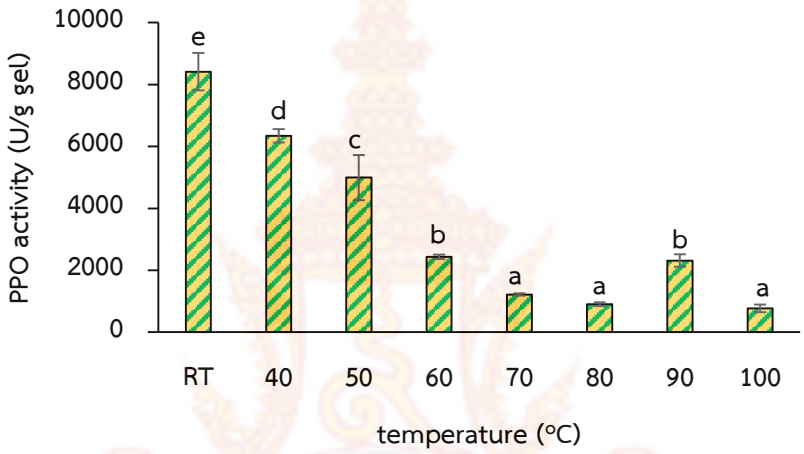
3.12 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และประสิทธิภาพในการสลายสีย้อม

จากการทดสอบผลของอุณหภูมิต่อเม็ดบีท โดยการบ่มเม็ดบีทที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง 40 50 60 70 80 90 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที ก่อนนำมาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และความสามารถในการสลายสี methylene blue พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสลดลง เมื่อบ่มที่อุณหภูมิที่สูงขึ้น โดยกิจกรรมของเอนไซม์มีค่ามากที่สุดที่อุณหภูมิห้อง โดยมีกิจกรรมเท่ากับ 8,413.41±606.14 U/ g gel รองลงมาคืออุณหภูมิ 40 50 60 90 70 80 และ 100 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยมีค่าเท่ากับ 6,346.37±218.09, 4,994.41±725.14, 2,435.75±69.78, 2,312.85±201.12, 1,217.88±38.71, 905.03±58.06 และ 770.95±120.86 U/ g gel ตามลำดับ (รูปที่ 18) เมื่อศึกษาประสิทธิภาพการสลายสีย้อมของสารสกัดรางจืด พบว่า ร้อยละการสลายสีย้อมของเม็ดบีทชุดควบคุมที่บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ มีค่าใกล้เคียงกัน มีค่าอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 13.68 – 22.36 โดยมีค่าต่ำกว่าเม็ดบีทรางจืดอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อบ่มเม็ดบีทรางจืดที่อุณหภูมิต่าง ๆ (อุณหภูมิห้อง (32 องศาเซลเซียส), 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 30 นาที แล้วศึกษาการสลายสีย้อมพบว่า ความสามารถในการสลายสีย้อม เมื่อบ่มเม็ดบีทที่อุณหภูมิต่าง ๆ มีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 76.73 - 85.92 โดยที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส มีค่าร้อยละการสลายสี methylene blue สูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 86.27±2.12 รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 40 50 60 80 อุณหภูมิห้อง (32 องศาเซลเซียส) 100 และ 90

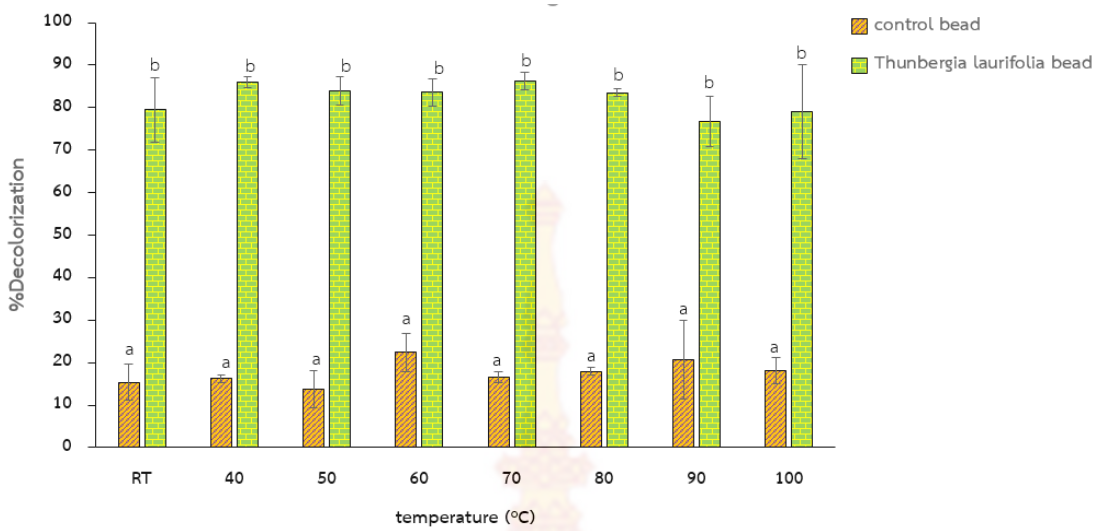
องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยมีค่าร้อยละการสลายสี methylene blue เท่ากับ 85.92±1.32, 83.99±3.34, 83.57±3.12, 83.54±0.81,79.49±7.57, 79.08±11.08 และ 76.73±5.96 ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความแตกต่างทางสถิติพบว่าร้อยละการสลายสีของเม็ดบีทรางจืดที่อุณหภูมิต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

รูปที่ 19

รูปที่ 19)



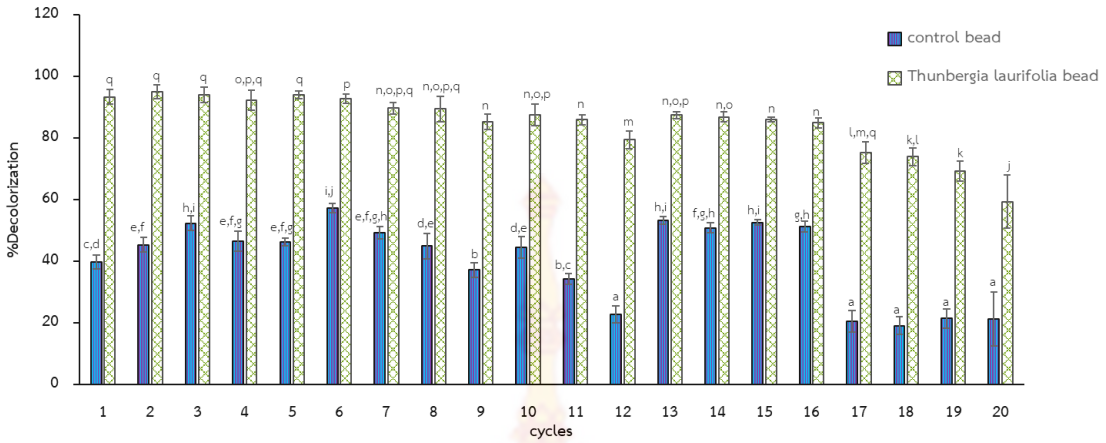
รูปที่ 18 กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในเม็ดบีทรางจืด เมื่อผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ นาน 30 นาที ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบ 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) และตัวอักษรพิมพ์เล็กภาษาอังกฤษแสดงให้เห็นความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวโดยใช้ One-way ANOVA ด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistic 21



รูปที่ 19 ร้อยละการสลายสีย้อมของเม็ดบีทเมื่อบ่มเจลที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลานาน 30 นาที ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบ 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงให้เห็นความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวโดยใช้ One-way ANOVA ด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistic 21

3.13 จำนวนรอบการสลายสีของเม็ดบีทรางจืด

เมื่อทดสอบความสามารถในการสลายสีของเม็ดบีทควบคุมและเม็ดบีทรางจืด โดยการนำเม็ดบีทมาใช้ในการสลายสีซ้ำ พบว่า เม็ดบีทสามารถสลายสี methylene blue ได้จำนวน 20 รอบ โดยรอบที่ 20 เม็ดบีทมีความสามารถในการสลายสีได้ร้อยละ 59.43±8.27 จากการทดสอบแสดงให้เห็นว่าเม็ดบีทรางจืด สามารถใช้ในการสลายสีได้หลายรอบการทำงาน (รูปที่ 20)



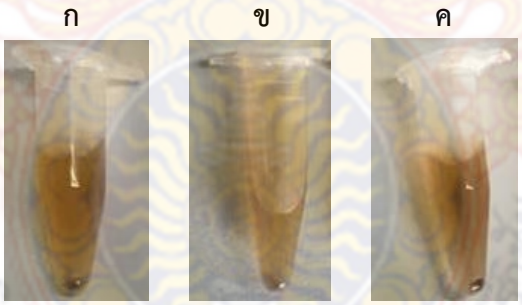
รูปที่ 20 ร้อยละการสลายสีของเม็ดบีทควบคุมและเม็ดบีทรางจืดเมื่อนำเม็ดบีทมาใช้ซ้ำ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบ 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) และตัวอักษรภาษาอังกฤษแสดงให้เห็นความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียวโดยใช้ One-way ANOVA ด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistic 21

3.14 ความสามารถในการสลายสีน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม

เมื่อนำเม็ดบีทรางจืดทดสอบการสลายสีในตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันปาล์ม (รูปที่ 21) เนื่องจากสีน้ำเสียไม่สามารถวัดค่าความยาวคลื่นได้ เนื่องจากมีสารผสมอยู่หลายชนิดแตกต่างกับสีย้อมชนิดต่าง ๆ จึงศึกษาภาพรวมการสลายสีโดยศึกษาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่าง ๆ ผ่านการสแกนความยาวคลื่นในช่วง visible light (ความยาวคลื่น 360-800 นาโนเมตร) โดยนำน้ำเสียที่ผ่านการทดสอบกำจัดตะกอนหยาบออกก่อนโดยการนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบ 10,000 rpm ก่อนนำมาสแกนความยาวคลื่น (รูปที่ 22) พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่สแกนได้ของน้ำเสียที่ไม่ได้บ่มด้วยเม็ดบีท น้ำเสียที่บ่มด้วยเม็ดบีทควบคุม และน้ำเสียที่บ่มด้วยเม็ดบีทรางจืด มีแนวโน้มลดลงทุกความยาวคลื่น เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชุดที่บ่มด้วยเม็ดบีทและไม่บ่มด้วยเม็ดบีท แต่เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของเม็ดบีทควบคุม และเม็ดบีทรางจืดพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงในทุกความยาวคลื่นแตกต่างกันไม่มากนัก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการสลายสีย้อมของเม็ดบีทมาจากความสามารถในการดูดซับของเม็ดบีทแคลเซียมอัลจิเนทมากกว่าการทำงานของสารสกัดหยาบใบรางจืด โดยเมื่อสังเกตค่าการดูดกลืนแสงของเม็ดบีทรางจืดที่ความยาวคลื่นใกล้เคียงกัน เช่น ความยาวคลื่น 319- 322 นาโนเมตร มีค่าการดูดกลืนแสง เมื่อไม่บ่มด้วยเม็ดบีท บ่มด้วยเม็ดบีทควบคุม และเม็ดบีทรางจืด เท่ากับ 3.024 1.427 และ 1.655 ตามลำดับ (รูปที่ 23) จากค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเมื่อบ่มด้วยเม็ดบีทสีในน้ำเสียน้ำมันปาล์มมีแนวโน้มลดลง ประมาณร้อยละ 45.27-52.81

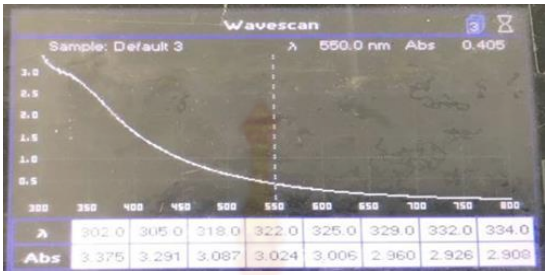
ก ข ค

รูปที่ 21 การสลายสีในน้ำเสียน้ำมันปาล์มโดยใช้เม็ดบีทรางจืด โดย ก-ค คือ น้ำเสียจากโรงงานน้ำมันปาล์ม น้ำเสียจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่บ่มด้วยเม็ดบีทควบคุม และ น้ำเสียจากโรงงานน้ำมันปาล์มที่บ่มด้วยเม็ดบีทรางจืด ตามลำดับ

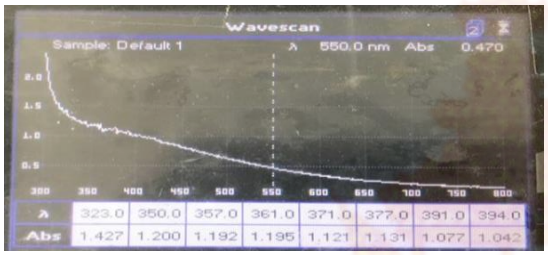


รูปที่ 22 น้ำเสียจากโรงงานน้ำมันปาล์มหลังการสลายสีย้อมด้วยเม็ดบีทรางจืด

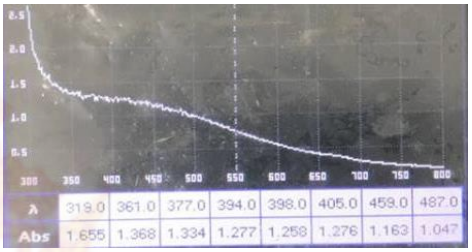
ก



ข



ค



รูปที่ 23 ผลการสแกนความยาวคลื่นของน้ำเสียโรงงานน้ำมันปาล์มที่ผ่านการสลายสีด้วยเม็ดบีทรางจืดในช่วงความยาวคลื่น 360-800 นาโนเมตร

วิจารณ์ผลการวิจัย

การสกัดสารสกัดหยาบจากใบรางจืด ทำโดยการสกัดด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 8.0 ที่ผสม 0.1% triton x-100 และ 3% PVPP โดย triron X-100 เป็นสารที่ช่วยลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุ (nonionic) ทำให้เมื่อเซลล์แตกเอนไซม์หรือสารต่าง ๆ สามารถหลุดออกมาได้ง่ายขึ้น โดยเอนไซม์ในพืชมีหลายชนิด เช่น คะตะเลส ซูเปอร์ออกไซดิสมิวเตส ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส เปอร์ออกซิเดส และโพลีฟีนอลออกซิเดส เป็นต้น โดยเอนไซม์บางชนิดมีตำแหน่งอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์หรือฟอสโฟลิปิดไบเลเยอร์ การเติมสารลดแรงตึงผิวจึงทำให้เอนไซม์หลุดออกมาเป็นเอนไซม์อิสระได้มาก และง่ายขึ้น นอกจากนี้การเติม PVPP เป็นสารที่จับกับสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งช่วยจับสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากการสกัดออกบางส่วน ป้องกันการเกิดพอลิเมอร์ไรเซชันของสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งอาจทำให้โปรตีนตกตะกอนได้ เนื่องจาก PVPP เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ จะถูกกำจัดออกในขั้นตอนของการหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บสารสกัดหยาบ (Mayer, 1979) จึงเป็นสารที่ไม่รบกวนการวัดปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และโพลีฟีนอลออกซิเดส ซึ่งมีสับสเตรทเป็นสารในกลุ่มของสารประกอบฟีนอลิก สารสกัดหยาบที่ได้จากใบรางจืดเป็นสารสกัดที่มีความหนืดสูง สีน้ำตาล

เข้ม โดยปกติแล้วรางจืดเป็นสมุนไพรที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย ใช้เป็นสมุนไพรถอนพิษจากยาฆ่าแมลง สารเคมี แอลกอฮอล์ และอื่น ๆ (Thongsaard and Marsden, 2002; Oonsivilai, 2006; Inta et al., 2013; Rocejanasaroj et al., 2014; Maneenoon et al., 2015) โดยสารออกฤทธิ์สำคัญในรางจืดมี 5 กลุ่ม คือ (1) sterols (2) phenolics (3) carotenoids (4) unclassified steroids and (5) glycosides (Chuthaputti, 2010) สารสกัดรางจืดที่สกัดได้มีความหนืดสูง สารที่ทำให้เกิดความหนืดในสารสกัดจากพืช ได้แก่ สารในกลุ่มของโพลีแซคคาไรด์ โดยที่พบมาก ได้แก่ สารที่ชื่อว่าเพกติน เป็นเฮเทอโรโพลีเมอร์ที่ซับซ้อนของน้ำตาล homogalactoronan, rhamnogalactoronan I, และ rhamnogalactoronan II เป็นโครงสร้างหลัก homogalactoronan ประกอบด้วย (1□4) -linked α-D-galacturonic acid อาจเรียกเพกตินว่าเป็นใยอาหาร ซึ่งเป็นเส้นใยที่ละลายน้ำได้ ซึ่งจะพบมากในชั้นระหว่างเซลล์ หรือจุดเชื่อมต่อระหว่างเซลล์ (Tamaki et al., 2007) เพกตินสามารถพองตัวได้ จึงทำให้สารสารที่มีเพกตินมีความข้นหนืด ดังนั้นปริมาณเพกตินที่มากจึงอาจทำให้การตกตะกอนครูดโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ไม่ได้ผล โดยยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์ในกลุ่มการสลายสีย้อมในใบรางจืด เมื่อนำใบรางจืดมาสกัดสารสกัดหยาบ วัดปริมาณโปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์ที่มีรายงานว่ามีความสามารถในการสลายสีย้อม 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และโพลีฟีนอลออกซิเดส พบว่า ระยะใบต่าง ๆ ได้แก่ ใบอ่อน ใบกลาง และใบแก่ (Junsi and Siripongvutikorn, 2016) โดยพบปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดในแนวโน้มเดียวกัน คือ เพิ่มขึ้นเมื่ออายุใบมากขึ้น โดยใบกลางมีค่ามากที่สุด และลดลงทั้งปริมาณโปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 ในใบแก่ ซึ่งกระบวนการแก่ของใบเป็นกระบวนการที่ค่อนข้างซับซ้อน มีการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกซิเดชันมากมาย เช่น เอนไซม์คะตะเลส เปอร์ออกซิเดส และโพลีฟีนอลออกซิเดส Kar and Mishra (1976) รายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และโพลีฟีออกซิเดสในใบข้าวมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อใบมีอายุมากขึ้น โดยจะมีกิจกรรมสูงสุดเมื่อใบเจริญเต็มที่ และลดลงเมื่อเข้าสู่ระยะใบที่แก่ขึ้น นอกจากนี้เมื่อใบแก่ขึ้นปริมาณโปรตีนและคลอโรฟิลด์ก็จะเพิ่มขึ้นด้วย (PARISH, 1968) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้

สารสกัดรางจืดไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการสลายสีย้อมโดยตรงเนื่องจากเป็นสารสกัดที่มีสีเข้มมาก ดังนั้นจึงนำมาตรึงโดยใช้แคลเซียมอัลจิเนท ซึ่งเป็นสารที่นิยมใช้มากในการตรึงเซลล์ โดยอัลจิเนทมีโครงสร้างเป็นโพลีแซคคาไรด์ มีหน่วยย่อยเป็น β-D-mannuronic acid และ α-L-guluronic acid เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ (1→4) glycosidic bond ได้มาจากสาหร่ายสีน้ำตาล (Draget et al., 2006) โดยอัลจิเนทจะเกิดโครงสร้างเป็นเม็ดบีทที่มีลักษณะกลมเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีประจุบวก (multi ion cation) เช่น Ca^{2+} ซึ่งในการทดลองนี้ใช้วิธีการตรึงสารสกัดหยาบรางจืดโดยใช้โซเดียมอัลจิเนท 2% w/v ผสมในสารสกัดรางจืด และให้เกิดเป็นเม็ดบีทในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น

200 mM เนื่องจาก inorganic salt ที่ความเข้มข้นสูงมีผลทำให้แอลจิเนทตกตะกอน (Draget et al., 2006) เมื่อนำเม็ดบีทรางจืดมาสลายสีย้อมเบื้องต้นพบว่าสามารถสลายสีย้อม crystal violet และ สีย้อม methylene blue โดยสีย้อม methylene blue ลายได้ดีที่สุด และใช้เวลาในการสลายน้อยที่สุด จึงนำเม็ดบีทมาเตรียมเป็นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่าง ๆ (2.03 ± 0.06, 2.30±0.12 และ 2.90±0.15 มิลลิเมตร) แล้วนำมาทดสอบการสลายสีย้อม methylene blue พบว่าเม็ดบีทรางจืดที่เตรียมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.03 ± 0.06 มิลลิเมตร มีกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสสูงที่สุด สอดคล้องกับความสามารถในการสลายสีย้อม โดยการสลายสีย้อมของเม็ดบีทรางจืด มาจาก 2 ส่วนการทำงาน คือ สีย้อมถูกดูดซับไว้บริเวณผิวเจล โดยสังเกตได้จากเจลชุดควบคุม และจากการทำงานของสารสกัดหยาบรางจืด ซึ่งเป็นการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ในสารสกัดหยาบรางจืด ในสภาวะที่กำหนดคือ มีเฉพาะสีซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่มอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน ดังนั้นเอนไซม์ที่ทำงานจึงเป็นเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่ทำงานโดยใช้สับสเตรทเป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอลิกซึ่งมีสับสเตรทร่วมเป็นออกซิเจนในการเกิดออกซิเดชัน โดยในการสลายสีนั้นมีหลายวิธี คือ การใช้วิธีทางกายภาพ และวิธีทางเคมี ซึ่งมีราคาสูง และไม่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยการกำจัดสีโดยใช้เอนไซม์ในธรรมชาติ เป็นวิธีที่ปลอดภัยมีราคาถูกและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งกลไกการสลายสีนั้น ได้แก่ การตกตะกอน หรือการสลายพันธะในโครงสร้างวงแหวนอะโรมาติกของสี (Husain, 2010) เมื่อศึกษาผลของ pH ต่อกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และความสามารถในการสลายสีของเม็ดบีทรางจืดโดยการบ่มเม็ดบีทในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 3-10 เป็นเวลานาน 30 นาที พบว่าเม็ดบีทรางจืดมีลักษณะการพองตัวในสารละลาย pH ต่าง ๆ แตกต่างกัน โดย pH ที่มีการพองตัวของเม็ดบีทมากที่สุดคือ pH 9 สารละลายโซเดียมอัลจิเนทจะเสียความคงตัวเมื่อมีค่า pH มากกว่า 10 และอัลจิเนทจะตกตะกอนเมื่อมีค่า pH 3.5 หรือต่ำกว่า ค่าคงที่การแตกตัว (dissociation constants, pKa) ของหน่วยย่อย β-D-mannuronic acid และ α-L-guluronic acid มีค่าเท่ากับ 3.38 และ 3.65 ตามลำดับ ทั้ง 2 โมเลกุลจะเชื่อมต่อกันเกิดเป็นโครงสร้างตาข่าย โดยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่คาร์บอกซิเลท (COO^-) กับ หมู่คาร์บอกซิลิก (COOH) และ เมื่อมีค่า pH มากกว่าค่า pKa (3.7) โมเลกุลทั้ง 2 จะเกิดการผลักกันเนื่องจากการถูกไอออไนซ์ของหมู่คาร์บอกซิล ทำให้สูญเสียโครงสร้างตาข่าย (Bu et al., 2005) เมื่อสูญเสียโครงสร้างตาข่ายทำให้โมเลกุลของน้ำสามารถแพร่เข้าสู่สูญกลางเจลได้มากขึ้นจึงเกิดการบวมพองของเจล และ pH ยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซมีที่ถูกตรึงอยู่ภายในด้วย เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์และความสามารถในการสลายสีย้อมของเม็ดบีท พบว่า เม็ดบีทรางจืดมีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ลักษณะของเม็ดบีทที่บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ไม่เปลี่ยนแปลง และความสามารถในการสลายสีย้อม methylene blue ไม่แตกต่างกันเมื่อบ่มเจลที่อุณหภูมิต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่าแม้กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลง แต่เม็ดบีทรางจืดยังมีความสามารถในการสลายสี methylene blue

ได้เช่นเดิม เมื่อศึกษาจำนวนรอบการใช้ซ้ำของเม็ดบีทรางจืด พบว่าสามารถใช้ซ้ำได้ถึง 20 รอบ โดยรอบที่ 20 เม็ดบีทมีการสลายสีย้อม methylene blue ได้มากกว่าร้อยละ 50

บทที่ 4
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สารสกัดหยาบจากใบรางจืดมีกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และโพลีฟีนอลออกซิเดส โดยในระยะใบที่แตกต่างกันจะมีกิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกัน โดยในระยะใบกลางมีกิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและโพลีฟีนอลออกซิเดสสูงสุด ซึ่งวัดกิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสด้วยสับสเตรท pyrogallol guaiacol และ syringaldazine มีค่าเท่ากับ 0.040±0.001 1.97±0.003 และ 0.039±0.0006 U/ g fresh weight ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากิจกรรมเอนไซม์รวมในสารสกัดหยาบใบรางจืดว่องไวต่อสับสเตรท pyrogallol มากที่สุด และกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 9,991.68±135.00 U/ g fresh weight ตามลำดับ เมื่อทดสอบความสามารถในการสลายสีย้อมเม็ดบีทรางจืด โดยสีที่สามารถสลายได้ดี และเร็วที่สุด คือ methylene blue โดยขนาดของเม็ดบีทเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.03 ± 0.06 มิลลิเมตร มีกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสสูงที่สุดและมีความสามารถในการสลายสีย้อม methylene blue สูงที่สุด เม็ดบีทมีการสูญเสียสภาพ เมื่อบ่มเม็ดบีทด้วย pH ต่าง ๆ และมีผลต่อความสามารถในการสลายสีย้อมเมื่อเทียบกับชุดควบคุม นอกจากนี้เม็ดบีทรางจืดยังมีความสามารถในการสลายสีย้อมเมื่อบ่มด้วยอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดยยังคงความสามารถในการสลายสีย้อมได้ร้อยละ 79.08±11.08 นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการใช้ซ้ำได้ 20 รอบโดยมีค่าการสลายสีรอบที่ 20 เท่ากับ ร้อยละ 59.43±8.27 แต่เม็ดบีทรางจืดไม่สามารถสลายสีย้อมน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์มได้ ซึ่งจากการทดสอบทำให้เห็นว่าบีทรางจืดสามารถสลายสีย้อมได้ จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำบีทรางจืดไปประยุกต์ใช้สลายสีย้อมได้ในอนาคต

บรรณานุกรม

ธรรมศักดิ์ ศรีสุกใส การกำจัดสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์มโดยการใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพารา วิทยานิพนธ์ 2547.

นันทวัน ใจกล้า สายใจ จารุจิตร และเสาวภา เล็กวงษ์. (2554). ผลการใช้รางจืดร่วมกับการให้ความรู้เกี่ยวกับการป้องกันการได้รับสารเคมีเข้าสู่ร่างกาย ในผู้ที่มีผลการตรวจสารเคมีในเลือดระดับอันตราย. วารสารวิทยาลัยพยาบาลพระปกเกล้า จันทบุรี ปีที่ 22 ฉบับที่ 2 มีนาคม - สิงหาคม 2554.50-60.

สุชาสินี คงกระพันธ์ และคณะ. (2551). การศึกษาฤทธิ์ของรางจืดในการต้านพิษยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต. รายงานการวิจัย.

Almagro, L., Go ´mez Ros, L. V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barcelo, A. and Pedren, M. A. 2008. REVIEW PAPER Class III peroxidases in plant defence reactions. Journal of Experimental Botany 60(2): 377–390.

Altunkaya, A. and Gökmen, V. 2008. Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (Lactuca sativa). Food Chem. 107: 1173–1179.

Bila, M. and Asgher, M. 2015. Dye decolorization and detoxification potential of Ca-alginate beads immobilized manganese peroxidase. BMC Biotechnology 15(111): 1-14.

Bilal, M.and Asgher, M. 2015. Sandal reactive dyes decolorization and cytotoxicity reduction using manganese peroxidase immobilized onto polyvinyl alcohol-alginate beads. Chemistry Central Journal 9(47): 1-14.

Bilal, M. and Asgher, M. 2015. Dye decolorization and detoxification potential of Ca-alginate beads immobilized manganese peroxidase. BMC Biotechnology 15:(111): 1-14.

Bradford, MM. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantitites of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Bu, H., Kjoniksen, A.L. and Nystrom, B. 2005. Effects of pH on dynamics and rheology during association and gelation via the Ugi reaction of aqueous alginate. European Polymer Journal. 41: 708-1717.

Chuthaputti, A. 2010. Rang Jerd: Laurel Clock Vine (Thunbergia laurifolia Lindl.): a detoxifying herb. Journal of Thai Traditional & Alternative Medicine 8(2-3): 211-220.

Draget, K.I., Gaserod, O., Aune, I., Andersen, P.O., Storbakken, B., Stokke, B.T., Smidrod, O. 2001. Effects of molecular weight and elastic segment flexibility on syneresis in Ca-alginate gel. Food Hydrocolloids. 15: 485-490.

Fick, GN. and Qualset, CO. 1975. Genetic control of endosperm amylase activity and gibberellic acid responses in standard-height and short-statured wheats. Proc Natl Acad Sci USA. 72: 892–895.

goo.gl/heOjm9 (accessed 21/3/2017).

Husain, Q. 2010. Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review. Rev Environ Sci Biotechnol. 3: 117–140.

Inta, A., Trisonthi, P. and Trisonthi, C. 2013. Analysis of traditional knowledge in medicinal plants used by Yuan in Thailand. Journal of Ethnopharmacology 149(1): 344-351.

Junsi, M. and Siripongvutikorn, S. 2016. Thunbergia laurifolia, a traditional herbal tea of Thailand: botanical, chemical composition, biological properties and processing influence. International Food Research Journal 23(3): 923-927.

KAR, M. and MISHRA, D. 1976. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. Plant Physiol. 57: 315-319.

Maneenoon, K., Khuniad, C., Teanuan, Y., Saedan, N., Prom-in, S., Rukleng, N., Kongpool, W., Pinsook, P. and Wongwiwat, W. 2015. Ethnomedicinal plants used by traditional healers in Phatthalung province, peninsular Thailand. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine 11(1): 1-20.

Martinez, M.V. and Whitaker, J.R. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. Trends of Food Science and Technology 6: 195-200.

Mayer, A.M. and Harel, E. 1979. Polyphenol oxidase in plant. Phytochemostry 18: 193-215.

Oonsivilai, R. 2006. Functional and Nutraceutical Properties of Rang Chuet (Thunbergia laurifolia Lindl.) Extracts. Thailand: Suranaree University of Technology, PhD Thesis

Parish, R. W. 1968. Studies on senescing tobacco leaf disks with special reference to peroxidase. I. The effects of cutting and of inhibition of nucleic acid and protein synthesis. Planta 82: 1-13.

Rocejanasaroj, A., Tencomnao, T. and Sangkitikomol, W. 2014. Thunbergia laurifolia extract minimizes the adverse effects of toxicants by regulating P-glycoprotein activity, CYP450, and lipid metabolism gene expression in HepG2 cells. Genetics and Molecular Research 13(1): 205-219.

Tamaki, Y., Konishi, T., Fukuta, M., and Tako, M. 2008. Isolation and structural characterization of pectin from endocarp of Citrus depressa. Food Chemistry 107(1): 352-361.

Thongsaard, W. and Marsden, C. A. 2002. A herbal medicine used in the treatment of addiction mimics the action of amphetamine on in vitro rat striatal dopamine release. Neuroscience Letters 329(2): 129-132.

Vianello, A., Zancani, M., Nagy, G. and Macri, F. 1997. Guaiacol peroxidase associated to soybean root plasma membrane oxidizes ascorbate. J. Plant Physiol. 150: 573-577.

ภาคผนวก

การเตรียมสารละลายแบรดฟอร์ด

สารละลายแบรดฟอร์ดประกอบด้วย 100 มิลลิกรัมของสี Coomassie blue G250 ใน 50 มิลลิลิตรของ 95% ethanol และ 100 มิลลิลิตรของ phosphoric acid แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

การเตรียมสับสเตรท guaiacol

สับเสตรท 0.25% v/v Guaiacol เตรียมโดย เติมสารละลาย Guaiacol ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงในขวดวัดปริมาตร จากนั้นเติม DMSO ลงไปจนครบ 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วเก็บสับสเตรท Guaiacol ไว้ในขวดปิดสนิทสีชา

การเตรียมสับสเตรท syringaldazine

1.2 mg/ml syringaldazine เตรียมโดย ชั่ง syringaldazine จำนวน 12 มิลลิกรัม จากนั้นละลายด้วยเมทานอล แล้วปรับปริมาตรด้วย เมทานอลจนครบ 10 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร เก็บสับเสตรทที่เตรียมได้ไว้ในขวดปิดสนิทสีชา

การเตรียมสับสเตรท pyrrogallol

50 mg/ml pyrogallol เตรียมโดย ชั่ง pyrogallol 2.5 g ละลายด้วย 0.05 M phosphate buffer pH 6.8 แล้วปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรให้ครบ 50 ml เก็บสารละลายที่ได้ในขวดปิดสนิทสีชา

การเตรียมสับเสตรท pyrocatechol

0.1 M catechol เตรียมโดยชั่ง catechol 0.2753 g ละลายด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 6.8 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 25 ml ด้วยขวดปรับปริมาตร เก็บสารละลายที่ได้ในขวดปิดสนิทสีชา

การย้อมเจลด้วยสับเสตรทต่าง ๆ

เจลที่ผ่านการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบ native-PAGE นำมาย้อมกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยใช้สับสเตรทต่าง ๆ ได้แก่ pyrogallol guaiacol และ syringaldazine ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสย้อมด้วย catechol โดยการย้อมนำเจลสีในกล่องพลาสติก เติมสารละลายบัฟเฟอร์เดียวกับการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้สับสเตรทแต่ละชนิด

การย้อมกิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยใช้สับสเตรทเป็น pyrogallol ทำโดยปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลาย 50 mM phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 30 ml ลงในกล่องพลาสติก จากนั้นเติม 50 mg/ml pyrogallol ปริมาตร 1 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม 0.1 mM H_2O_2 ปริมาตร 100 µl เขย่าให้เข้ากัน แล้วใส่แผ่นเจลลงย้อม สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเจลเป็นเวลานานประมาณ 30 นาที บันทึกผลโดยการถ่ายภาพ ผลการทดสอบดัง รูปที่ 24 แถบที่ 1

การย้อมกิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยใช้สับสเตรทเป็น Guaiacol ดำเนินการเช่นเดียวกับการย้อมด้วยสับสเตท pyrogallol ปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลาย 10 mM phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 30 ml ลงในกล่องพลาสติก จากนั้นเติม 0.25% v/v pyrogallol ปริมาตร 1 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม 0.1 mM H_2O_2 ปริมาตร 100 µl เขย่าให้เข้ากัน แล้วใส่แผ่นเจลลงย้อม สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเจลเป็นเวลานานประมาณ 30 นาที บันทึกผลโดยการถ่ายภาพ ผลการทดสอบดัง รูปที่ 24 แถบที่ 2

การย้อมกิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยใช้สับสเตรทเป็น syringaldazine ดำเนินการเช่นเดียวกับการย้อมด้วยสับสเตท pyrogallol ปฏิกิริยาที่ใช้ย้อมประกอบด้วย 10 mM phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 30 ml ลงในกล่องพลาสติก จากนั้นเติม 0.25% v/v pyrogallol ปริมาตร 1 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติม 0.1 mM H_2O_2 ปริมาตร 100 µl เขย่าให้เข้ากัน แล้วใส่แผ่นเจลลงย้อม สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเจลเป็นเวลานานประมาณ 30 นาที บันทึกผลโดยการถ่ายภาพ ผลการทดสอบดัง รูปที่ 24 แถบที่ 3

การย้อมกิจกรรมเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสโดยใช้สับสเตรทเป็น catechol ดำเนินการโดยใส่สารละลาย 0.1 M phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 30 ml ลงในกล่องพลาสติก จากนั้นเติม 0.1 M catechol ปริมาตร 1 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้วใส่แผ่นเจลลงย้อม สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเจลเป็นเวลานานประมาณ 30 นาที บันทึกผลโดยการถ่ายภาพ ผลการทดสอบดัง รูปที่ 24 แถบที่ 4

ผลการย้อมเจลพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ที่พบคือ เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส แต่แถบที่ได้อาจไม่ชัด โดยเห็นแถบดังลูกศรสีส้มชี้ (รูปที่ 24) เนื่องจากใช้เวลาในการย้อมนาน จึงเห็นแถบกิจกรรมเอนไซม์เป็นปื้น จากการย้อมเจลแสดงให้เห็นว่ากิจกรรมของเอนไซม์ในสารสกัดน้อย ซึ่งสารสกัด

รางจืดยากแก่การศึกษาเพราะเป็นสารสกัดที่มีลักษณะข้นหนืดมาก การตกตะกอนเกลืออาจจะไม่ได้ผลดีมากนัก เนื่องจากสารสกัดมีความหนืด ปริมาณโปรตีนที่ได้ก็จะมีปริมาณน้อยด้วย

รูปที่ 24 แถบกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและโพลีฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดหยาบที่ย้อมด้วยสับเสตรทชนิดต่าง ๆ โดย 1-3 คือ แถบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ย้อมด้วยสับเสตรท pyrpgallol Guaiacol และ syringaldazine ตามลำดับ ส่วน 4 คือ แถบเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่ย้อมด้วยสับสเตรท catechol (ลูกศรสีส้ม)