Engng.J.CMU.(2019) 26 (3), 14-24

วารสารวิศวกรรมศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Engineering Journal
Chiang Mai University

ผลของสภาวะแวดล้อมและจลนพลศาสตร์ของแลคเคสต่อการกำจัดไดโคฟอล

Effect of Environmental Conditions and Kinetics of Laccase on Dicofol Removal

อภิญญา อ่อนสาร และ กรรณิกา รัตนพงศ์เลขา*
Apinya Onsarn and Karnika Ratanapongleka*
คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190
Faculty of Engineering, Ubonratchathani University, Warinchamrap, Ubonratchathani 34190
E-mail: apinya.on.58@ubu.ac.th and karnika.r@ubu.ac.th* Tel.: 045-3533342

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงการใช้เอนไซม์แลคเคสสำหรับกำจัดยาฆ่าแมลงชนิดไดโคฟอล โดยใช้เอนไซม์แลคเคสจาก *Lentinus polychrous* Lev. จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์แลคเคสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.52 เท่า เมื่อผ่านกระบวนการกรองด้วยเยื่อกรองไมโครและอัลตร้า และผลจากการนำเอนไซม์แลคเคสมากำจัดไดโคฟอลพบว่าที่เวลา 12 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการกำจัดไดโคฟอลสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 7 ค่าอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส เมื่อควบคุมปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 4.32 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นไดโคฟอลเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับการศึกษาจลนพลศาสตร์ของแลคเคสกับการกำจัดไดโคฟอลพบว่ามีค่า K_m เท่ากับ 2.52 มิลลิกรัมต่อลิตร และ V_{max} เท่ากับ 0.93 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อนาที และเมื่อนำอุณหภูมิในช่วง 25-35 องศาเซลเซียส มาใช้ในการหาค่าพลังงานกระตุ้นมีค่าเท่ากับ 5.45 กิโลจูลต่อโมล และเมื่อนำไปทดสอบโดยอิงจากสภาพแวดล้อมจริงในกรณีที่มีการเจือปนของ NOM, Fe^{2+} และ Mn^{2+} โดยที่ความเข้มข้นของไดโคฟอลที่ใช้เท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของ NOM, Fe^{2+} และ Mn^{2+} ที่ใช้อยู่ในช่วง 0-50 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า Mn^{2+} มีประสิทธิภาพการกำจัดไดโคฟอลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Mn^{2+} โดยมีประสิทธิภาพการกำจัดได้ 100% ที่ความเข้มข้น Mn^{2+} เท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และตรงข้ามกับในกรณีของ NOM และ Fe^{2+} พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NOM และ Fe^{2+} ประสิทธิภาพการกำจัดไดโคฟอลมีแนวโน้มลดลง โดยที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพการกำจัดเท่ากับ 62.43 และ 45.32 เปอร์เซ็นต์ ของ NOM และ Fe^{2+} ตามลำดับ ส่วนผลของการศึกษาการยับยั้งของ NOM และ Fe^{2+} พบว่าเป็นการยับยั้งแบบไม่แข่งขันและแบบแข่งขัน ตามลำดับ ในขณะที่ Mn^{2+} ช่วยส่งเสริมการกำจัดไดโคฟอล

ABSTRACT

This research shows the usage of enzyme laccase to remove dicofol based insecticide. The Laccase was extracted from *Lentinus polychrous* Lev. It was found that the purity of laccase increased 3.52 folds when passing through micro- and ultra-filtration system. The result of using this enzyme to remove dicofol at 12 hours showed that the removal efficiency reached 100% at pH 7, temperature of 35ºC, the activity of the enzyme at 4.32 U/ml and dicofol concentration of 1 mg/l. The kinetics study on dicofol removal with laccase showed that the value of K_m was 2.52 mg/l and V_{max} was 0.93 mg/l/min. To determine the activation energy (E_a), the temperatures in the range of 25-35ºC were applied. The value of E_a was 5.45 KJ/mol. According to real environmental condition, the contaminations of NOM,

Received 10 October 2018
Revised 28 November 2018
Accepted 12 December 2018

$Fe^{2+}$and Mn^{2+} were investigated. At dicofol concentration of 5 mg/l and the concentrations of NOM, $Fe^{2+}$and Mn^{2+} in the range of 0-50 mg/l displayed that the removal efficiency increased when increasing the concentration of Mn^{2+}. The removal efficiency reached 100% at Mn^{2+} concentration of 50 mg/l. In contradiction, in case of NOM and Fe^{2+}, increasing the concentration of NOM and Fe^{2+} trended to decrease dicofol removal efficiency. The removal efficiencies at the concentrations of 50 mg/l were 62.43 and 45.32%, respectively. The results of inhibition study on NOM, Fe^{2+} and Mn^{2+} showed that NOM and Fe^{2+} were uncompetitive and competitive inhibitors, respectively, meanwhile, Mn^{2+} acted as a promotor for dicofol removal.

1. บทนำ

ไดโคฟอล มีชื่อทางเคมีว่า 2, 2, 2-Trichloro-1, 1-bis (4-chlorophenyl) ethanol เป็นสารเคมีที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากดีดีที โดยจัดอยู่ในกลุ่มของออร์กาโนคลอรีน (Organochlorines) มีไฮโดรเจน คาร์บอน ออกซิเจน และคลอรีนเป็นส่วนประกอบ [1] สารดังกล่าวมีความเป็นพิษเฉียบพลันต่ำ แต่ตกค้างในระบบสิ่งแวดล้อมได้ยาวนาน ซึ่งไดโคฟอลเป็นสารที่นิยมใช้ในกลุ่มของเกษตกรทั้งในและต่างประเทศ สำหรับควบคุมหนอน เพลี้ย หรือแมลงต่าง ๆ ที่เป็นอันตรายต่อต้นพืชและต่อผลผลิต [2] โดยสามารถใช้ได้กับพืชเกือบทุกชนิด เช่น พริก ฝ้าย ข้าวโพด พืชตระกูลถั่ว พืชไร่ พืชสวน รวมถึงไม้ดอก ไม้ประดับเกือบทุกชนิด เป็นต้น [3] การสะสมของสารไดโคฟอลสู่ระบบสิ่งแวดล้อมส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิด โดยเฉพาะต่อสุขภาพของมนุษย์ เช่น มีความเป็นพิษต่อระบบประสาทและสมอง ระบบเลือด เป็นพิษต่อทารกในครรภ์ ระบบสืบพันธุ์ และที่สำคัญเป็นสารที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งได้ [4] ขณะที่ทางสหภาพยุโรปได้กำหนดให้มีไดโคฟอลปนเปื้อนในน้ำดื่มไม่เกิน 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร [5] ปัจจุบันพบว่าวิธีการกำจัดไดโคฟอลออกจากสิ่งแวดล้อมที่น่าสนใจคือการใช้วิธีทางชีวภาพโดยใช้เอนไซม์ เนื่องจากเป็นวิธีที่ไม่เกิดปฏิกิริยารุนแรงเหมือนปฏิกิริยาทางเคมี ไม่ก่อให้เกิดสารเคมีตกค้างในระบบนิเวศและมีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

แลคเคส (Benzenediol: oxygen oxidoreductase; EC 1.10.32) พบได้ทั่วไปในเชื้อราจำพวกไวท์รอท (White-rot fungi)ในพืชชั้นสูง แมลงบางชนิดและแบคทีเรีย เป็นต้น ซึ่งแลคเคสจัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส ซึ่งสามารถกำจัดสารพิษได้หลากหลาย เช่น สารอินทรีย์ อนินทรีย์ ฟีนอล อะมิโนฟีนอล อะโรมาติก เอมีน สีย้อม และสารกำจัดศัตรูพืชบางชนิด เช่น ดีดีที ดีอีอีที คลอร์ไพริฟอส วีเอ็กซ์ อาร์วีเอ็กซ์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังได้นำมากำจัดยาพาราเซตามอล [6] ด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ แล้ว แลคเคสเป็นเอนไซม์ที่จำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นน้อย จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้งานได้หลากหลาย [7] โดยแหล่งเอนไซม์แลคเคสในงานวิจัยนี้มาจาก *Lentinus polychrous* Lev. ซึ่งรู้จักกันในชื่อของเห็ดขอนดำ เห็ดลม หรือเห็ดบด พบและนิยมนำมาบริโภคมากในเขตภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ เป็นเชื้อราในกลุ่มไวท์รอทชนิดที่สร้างเอนไซม์แลคเคสแล้วขับออกมาภายนอกเซลล์ (Extracellular enzyme)

แต่สภาพแวดล้อมในปัจจุบัน ตามแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วไป ไม่ได้มีเฉพาะการปนเปื้อนของยาฆ่าแมลงเพียงอย่างเดียวเท่านั้น จากการสำรวจยังพบสารอินทรีย์ธรรมชาติในแหล่งน้ำ ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายของซากสิ่งมีชีวิต ซึ่งปริมาณความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติในประเทศไทยมีค่าไม่เกิน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบธาตุเหล็กและแมงกานีสซึ่งเป็นธาตุที่พบได้มากในธรรมชาติ ปริมาณของเหล็กและแมงกานีสที่พบอยู่ในช่วง 5-14 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.3-1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เอนไซม์แลคเคสในการกำจัดไดโคฟอลในสภาวะที่เปลี่ยนแปลงพีเอชและอุณหภูมิ รวมถึงในกรณีที่มีการปนเปื้อนของสารอินทรีย์ธรรมชาติ เหล็กและแมงกานีส ตลอดจนศึกษา

รูปแบบการยับยั้งที่มีต่อเอนไซม์แลคเคส ซึ่งการศึกษาตามสภาวะข้างต้นนอกจากจะช่วยให้งานวิจัยนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้นแล้ว คาดว่าผลการศึกษาสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้จริงในสภาพแวดล้อมโดยทั่วไป อีกทั้งเพื่อเป็นแนวทางในการแก้ไขปัญหาการตกค้างของยาฆ่าแมลงในแหล่งน้ำผิวดินตามธรรมชาติได้

2. ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 สารเคมี

เอนไซม์แลคเคสได้จากก้อนเห็ดบดจากโรงเพาะเห็ด จ.อุบลราชธานี สารอินทรีย์ธรรมชาติจากหนองอีเจม มหาวิทยาลัยอุบราชธานี และสารเคมีที่ใช้ เช่น ผงไดโค-ฟอลบริสุทธิ์ เมทานอล (เกรดวิเคราะห์ HPLC ≥99.9%), สารวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ABTS และไอรอน (ll) คลอไรด์เตตระไฮเดรต (≥99%) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา สารวิเคราะห์โปรตีนสำเร็จรูป (Bradford solution) จากบริษัท AppliChem ประเทศเยอรมัน แมงกานีส (ll) คลอไรด์เตตระไฮเดรต จากบริษัท Fisher Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ เช่น เครื่อง UV spectrophotometer (SHIMADZU UV1204, Japan) เครื่อง pH meter (Eutech pH 700 Meter, Singapore) เครื่อง HPLC (SHIMADZU CLASS-VP 10AVP, Japan) คอลัมน์ที่ใช้คือ C18 ซึ่งมีขนาดเท่ากับ 7.8 x 300 mm (Vertisep OA 8 um HPLC) และเครื่อง AAS (PerkinElmer AAnalyst200, U.S.)

2.2 การสกัดและทำเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์

เอนไซม์แลคเคสสกัดจากก้อนเห็ดบดที่เชื้อเจริญได้ประมาณ 15-30 วัน ซึ่งเชื้อเห็ด 1 ก้อน มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อก้อนเท่ากับ 750 กรัม จากนั้นนำก้อนเห็ดมาทำการบดและผสมน้ำปราศจากประจุในอัตราส่วน 1 ก้อนต่อน้ำปราศจากประจุ 1,500 มิลลิลิตร แล้วนำไปกวนผสมเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นกรองเศษตะกอนต่าง ๆ ออกด้วยผ้าขาวบาง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และน้ำส่วนใสที่ได้คือเอนไซม์แลคเคสหยาบ จากนั้นเป็นขั้นตอนของการทำให้เอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ โดยนำเอนไซม์แลคเคสหยาบที่ได้จากขั้นตอนข้างต้นมากรองผ่านเยื่อกรองไมโคร ซึ่งมีขนาดมีขนาดคัดกรองโมเลกุลเท่ากับ 0.2 ไมครอน จากนั้นนำมาผ่านเยื่อกรองอัลตร้าขนาดคัดกรองโมเลกุล 30 กิโลดาลตัน ปรับอัตราการไหลของทั้งสองขั้นตอนเท่ากับ 50 มิลลิลิตรต่อนาที ทำให้ได้เอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์ไว้ใช้ในขั้นตอนการทดลองต่อไป หากยังไม่ได้ใช้เอนไซม์ทันทีให้จัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส

2.3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการกำจัดไดโคฟอลด้วยแลคเคส

ศึกษาภายใต้การทดลองแบบกะ โดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของเอนไซม์เท่ากับ 4.32 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของไดโคฟอลเริ่มต้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นปรับปริมาตรโดยรวมเป็น 150 มิลลิลิตร แล้วทำการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในช่วง 3-8 และอุณหภูมิในช่วง 25-65 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างทั้งสิ้น 12 ชั่วโมง จากนั้นเก็บน้ำตัวอย่างในแต่ละช่วงเวลาครั้งละ 20 ไมโครลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นไดโคฟอลคงเหลือในระบบ

2.4 การกำจัดไดโคฟอลด้วยแลคเคส

ศึกษาการกำจัดไดโคฟอลด้วยเอนไซม์แลคเคสในชุดการทดลองแบบกะ ใช้ค่าพีเอชและอุณภูมิที่เหมาะสม (จากการศึกษาในข้อ 2.3) นอกจากนี้ยังใช้พารามิเตอร์เดียวกันกับข้างต้นในกรณีที่มีการเติมสารอินทรีย์ธรรมชาติ (NOM) เหล็ก (Fe^{2+}) และแมงกานีส (Mn^{2+}) ในระบบ ซึ่งความเข้มข้นของ NOM, Fe^{2+} และ Mn^{2+} ที่ใช้มีค่าในช่วง 0-50 มิลลิกรัมจต่อลิตร สำหรับเปอร์เซ็นต์การกำจัดไดโคฟอลด้วยแลคเคส สามารถคำนวณได้จากสมการที่ (1)

$$Removal(\%) = (\frac{C_0 - C_t}{C_0}) \times 100 \qquad (1)$$

เมื่อ C_0 คือความเข้มข้นเริ่มต้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) และ

C_t คือความเข้มข้นที่เวลาใด ๆ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

2.5 การตรวจวิเคราะห์ผล

การวิเคราะห์กิจกรรมการทำงานของแลคเคส ตามวิธีของ [8] โดยใช้ 2,2′-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate (ABTS) เป็นสารสับสเตรทผสมสารละลายตัวอย่างกับโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์และ ABTS จากนั้นเขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และหยุดปฏิกิริยาด้วย TCA ที่ความเข้มข้น 80% โดยน้ำหนัก แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร โดย 1 ยูนิต ของเอนไซม์คือจำนวนของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้นต่อนาที

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี [9] โดยใช้ Bradford reagent สำเร็จรูป และใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน เจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ จากนั้นนำสารตัวอย่าง ผสมกับ Bradford reagent 200 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปราศจากประจุ 700 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณไดโคฟอลด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ C18 (7.8 x 300 มิลลิเมตร) ตามวิธีของ [10] โดยละลายไดโคฟอลด้วยเมทานอล และปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำปราศจากประจุ และเจือจางไดโคฟอลเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานไดโคฟอล สำหรับโมบายเฟสที่ใช้เป็นเมทานอลต่อน้ำปราศจากประจุ ในอัตราส่วน 80:20 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาณการฉีดตัวอย่างเท่ากับ 20 ไมโครลิตร อัตราการไหลของโมบายเฟสเท่ากับ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิที่ใช้เป็นอุณหภูมิในสิ่งแวดล้อม (25-32 องศาเซลเซียส) และใช้ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 229 นาโนเมตร

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

3.1 ผลการทำเอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์

พบว่าเมื่อนำเอนไซม์แลคเคสผ่านระบบด้วยไมโครฟิวเตรชั่นและอัลตร้าฟิวเตรชั่น ส่งผลให้ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 3.52 เท่า (ตารางที่ 1) และเมื่อพิจารณาการกรองด้วยระบบไมโครฟิวเตรชั่น ในส่วนที่ไม่ผ่านเยื่อกรอง (รีเทนเททท) พบว่ามีปริมาณของโปรตีนและค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่ต่ำ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์แลคเคสส่วนใหญ่ สามารถผ่านระบบเยื่อกรองชนิดนี้ได้ ในขณะที่โปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่บางชนิดไม่สามารถผ่านเยื่อกรองได้ จากผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับคุณสมบัติของการกรองชนิดไมโคร-ฟิวเตรชั่น ซึ่งเป็นกระบวนการคัดขนาดโมเลกุลของสารหรืออนุภาคที่มีขนาดใหญ่ ที่อยู่ในช่วง 0.1-10 ไมครอน ออกจากสารแขวนลอย และเมื่อพิจารณาการกรองชนิดอัลตร้าฟิวเตรชั่น ในส่วนที่ไม่ผ่านเยื่อกรอง (รีเทนเททท) พบว่ามีค่าโปรตีนต่ำแต่ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์สูง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงขนาดของเอนไซม์แลคเคสมีมวลโมเลกุลที่มากกว่า 30 กิโลดาลตัน จึงทำให้เยื่อกรองอัลตร้าสามารถกักเอนไซม์ไว้ได้ และจากการศึกษาสอดคล้องกับข้อมูลคุณสมบัติทั่วไปของเอนไซม์แลคเคสซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 30 กิโลดาลตัน ขึ้นไป [11] และจากงานวิจัยของ [12] สกัดเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากก้านกะหล่ำดอก เพื่อใช้สำหรับกำจัดสารพิษฟีนอลหลังจากกระบวนการสกัดเมื่อผ่านเยื่อกรองไมโครและอัลตร้า มีค่าความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 4 เท่า

3.2 สภาวะที่เหมาะสมต่อการกำจัดไดโคฟอล

3.2.1 ผลของค่าพีเอชที่มีต่อการกำจัด

ศึกษาการกำจัดไดโคฟอลด้วยแลคเคสเมื่อเปลี่ยนแปลงพีเอชของไดโคฟอลในชุดการทดลองแบบกะ ทำการศึกษาที่พีเอชในช่วง 3-8 ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 1 (ก) พบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชของสารละลายไดโคฟอลส่งผลต่อประสิทธิภาพการกำจัดไดโคฟอล เมื่อพิจารณาช่วงพีเอชที่ 4, 5, 6 และ 7 พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดไดโคฟอลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ซึ่งมีประสิทธิภาพในการกำจัดที่เวลา 12 ชั่วโมงเท่ากับ 71.60±2.26, 79.25±3.07, 90.24±1.58 และ 100% ตามลำดับ

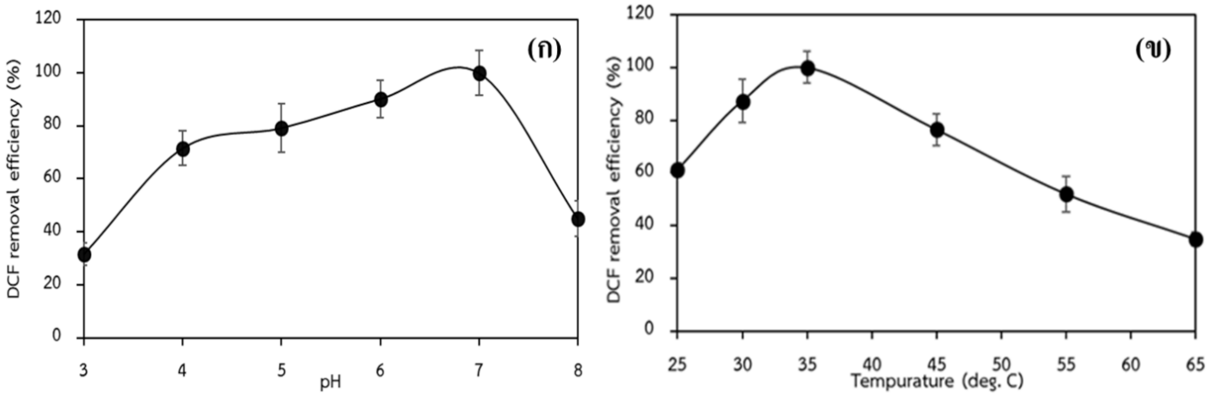
ตารางที่ 1 การทำเอนไซม์แลคเคสให้บริสุทธิ์ด้วยเยื่อกรองไมโครและอัลตร้า

ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์		กิจกรรมการทำงานรวม (ยูนิต)	ปริมาณโปรตีนรวม (มิลลิกรัม)	กิจกรรมการทำงานจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
การสกัดหยาบ		16105	4425	3.64	1
เยื่อกรองไมโคร	รีเทนเทท	322.80	160.20	4.60	1.26
	เพอมิเอท	12713.80	651.20	9.70	2.66
เยื่อกรองอัลตร้า	เพอมิเอท	190.40	686.40	0.28	0.08
	รีเทนเทท	2605.20	203.40	12.81	3.52

ส่วนค่าพีเอชที่ 3 และ 8 พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดมีค่าต่ำกว่าค่าพีเอชที่อยู่ในช่วง 4-7 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเท่ากับ 31.57±3.41 และ 44.93±2.47% ตามลำดับ จากผลการศึกษาข้างต้นสามารถอธิบายได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของพีเอชส่งผลโดยตรงต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แลคเคส เนื่องจากการปรับพีเอชทำให้ประจุที่อยู่บริเวณเร่งของเอนไซม์แลคเคสเกิดการเปลี่ยนแปลง ซึ่งในบางพีเอชอาจทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เกิดการเสื่อมสภาพได้ ซึ่งผลการศึกษาข้างต้นสอดคล้องกับงานวิจัย [13] พบว่าเอนไซม์แลคเคสจากเชื้อราสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีพีเอชอยู่ในช่วง 4-7 เมื่อทดสอบกับฟีนอล รวมถึงงานวิจัยของ [14a] พบว่า ค่าการทำงานของเอนไซม์แลคเคสสูงสุดเมื่อค่าพีเอชเท่ากับ 7 เมื่อทดสอบกับสารกลุ่มของออร์กาโน-ฟอสเฟต ชนิดคลอร์โพริฟอส และงานวิจัยของ [15a] ได้สกัดเอนไซม์แลคเคสจาก *Pleurotus ostreatus* พบว่าค่ากิจกรรมการทำงานของแลคเคสสูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 7.5 เมื่อทดสอบกับยาฆ่าแมลงหลายชนิดในกลุ่มของออร์กาโนฟอตเฟส ได้แก่ VX, RVX และ DiPr-Amiton

3.2.2 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการกำจัดไดโคฟอล

ศึกษาการกำจัดไดโคฟอลด้วยแลคเคสเมื่อเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วง 25-65 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 1 (ข) พบว่า ประสิทธิภาพในการกำจัดไดโคฟอลสูงสุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และต่ำสุดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และสามารถเรียงลำดับประสิทธิภาพการย่อยสลายจากมากไปหาน้อยที่เวลา 12 ชั่วโมงได้ดังนี้ คือ 35, 30, 45, 25, 55 และ 65 องศาเซลเซียส และมีประสิทธิภาพการกำจัดคือ 100, 87.26±2.26, 76.82±4.39, 60.12±1.93, 46.19±3.3 และ 34.89±2.48% ตามลำดับ จากผลการศึกษาอธิบายได้ว่าการเพิ่มอุณหภูมิของไดโคฟอลจาก 25-35 องศาเซลเซียส ส่งผลให้พลังงานจลน์ของโมเลกุลของสารเพิ่มขึ้นและเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น และยังช่วยให้เพิ่มโอกาสในการชนกันระหว่างโมเลกุลของสารหรือระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้นได้มากขึ้นด้วย ซึ่งทำให้มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นตามไปด้วย [16] จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิในช่วง 25-45 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพการกำจัดไดโคฟอลไม่ต่ำกว่า 60% และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดไดโคฟอลลดลง เนื่องจากเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ หากในระบบมีช่วงอุณหภูมิที่สูงเกินไปอาจทำให้เอนไซม์เกิดการเสื่อมสภาพทางโครงสร้างได้ จากงานวิจัยของ [14b] ได้สกัดเอนไซม์-แลคเคสจาก *Pichia pastoris* เมื่อใช้อุณหภูมิในช่วง 30-80 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมการทำงานสัมพัทธ์ของเอนไซม์มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องเท่ากับ 45-100% และเมื่ออุณหภูมิในระบบเพิ่มขึ้น พบว่าค่าการทำงานสัมพัทธ์ของเอนไซม์แลคเคสคงเหลือเท่ากับ 95 และ 84% ที่อุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ



รูปที่ 1 (ก) ผลของพีเอชที่มีต่อการกำจัดไดโคฟอล (ข) ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการกำจัดไดโคฟอล

3.2.3 ผลของสารอินทรีย์ธรรมชาติและโลหะหนักต่อการกำจัดไดโคฟอล

ศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดไดโคฟอลในกรณีที่เติมสาร NOM, Fe^{2+} และ Mn^{2+} เข้าไปในระบบ ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้มีค่าอยู่ในช่วง 0-50 มิลลิกรัมต่อลิตร กำหนดให้ความเข้มข้นของไดโคฟอลเริ่มต้นเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลการศึกษาแสดงดังตารางที่ 2 โดยอธิบายได้ว่าในกรณีของการเติม NOM พบว่าประสิทธิภาพในการกำจัดไดโคฟอลลดลง เมื่อความเข้มข้นของสารละลาย NOM เพิ่มขึ้น และในกรณีที่มีการเติมสารละลายโลหะหนักมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ซึ่งการเติม Fe^{2+} ส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดไดโค-ฟอลลดลง ตรงข้ามกับในกรณีของการเติม Mn^{2+} ซึ่งพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Mn^{2+} เพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพในการกำจัดไดโคฟอลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามไปด้วย โดยสามารถเรียงลำดับชนิดของสารที่มีประสิทธิภาพการกำจัดไดโคฟอลจากมากไปน้อยได้ดังนี้คือ Mn^{2+}, NOM และ Fe^{2+} ตามลำดับ และจะเห็นได้ว่าในกลุ่มของโลหะหนัก ถึงแม้ว่าสารจะมีประจุชนิดเดียวกัน แต่ให้ผลในทางตรงข้าม เนื่องจากสารที่มีประจุชนิดเดียวกัน ไม่จำเป็นว่าสารจะต้องเข้ากับเอนไซม์ไปจับที่ตำแหน่งเดียวกันเสมอไป ซึ่งจากงานวิจัยของ [15b] โดยทำการศึกษาการกำจัดไดโคฟอลด้วยเซลลูเลสและเมื่อเติม Mn^{2+} ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2 และ 4 มิลลิโมลต่อลิตร พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดเพิ่มขึ้นเท่ากับ 42, 63, 74 และ 84% ตามลำดับ และให้เหตุผลว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ Mn^{2+} ส่งเสริมการย่อยสลายไดโคฟอลด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และจากงานวิจัยของ [17] ทำการศึกษาผลของโลหะหนักต่อค่ากิจกรรมการทำงานของโปรตีเอสจาก *Aspergillus niger* KIBGE-IB36 จากผลการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้นของ Mn^{2+} และ Fe^{2+} เท่ากับ 1, 5, 10 มิลลิโมล ที่เวลา 60 นาที พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีค่ากิจกรรมการทำงานเพิ่มขึ้นเท่ากับ 100, 120, 129% ส่วนในกรณีของการเติม Fe^{2+} พบว่ามีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างต่อเนื่องเท่ากับ 85, 70 และ 60% ตามลำดับ และจากรายงานวิจัยของ [18a] ได้ศึกษาการกำจัด bisphenol A (BPA) ด้วยเอนไซม์ Horseradish peroxidase (HRP) และมีการเติม NOM ลงไปในระบบโดยการใช้กรดฮิวมิกเป็นกลุ่มตัวแทนของสาร NOM เนื่องจากมีโครงสร้างเหมือนกัน ความเข้มข้นของกรดฮิวมิกที่ใช้เท่ากับ 0-50 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ BPA เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้อยู่ในช่วง 0-300 ยูนิตต่อลิตร และความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เท่ากับ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการศึกษาพบว่าที่การเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 200-300 ยูนิตต่อลิตร พบว่าประสิทธิภาพในการกำจัด BPA มีแนวโน้มลดลง เมื่อความเข้มข้นของกรดฮิวมิกเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 2 ผลของสารอินทรีย์ธรรมชาติและโลหะหนักที่มีต่อการย่อยสลายไดโคฟอลด้วยแลคเคส

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	ประสิทธิภาพการกำจัดไดโคฟอล (%)		
	สารอินทรีย์ธรรมชาติ	เหล็ก	แมงกานีส
0	70.06 ± 2.03	70.06 ± 2.03	70.06 ± 2.03
1	71.62 ± 1.67	64.75 ± 3.01	72.52 ± 2.58
10	68.36 ± 1.45	62.12 ± 2.21	88.63 ± 1.16
50	62.43 ± 2.39	45.32 ± 0.54	100 ± 0.13

3.2.4 พลังงานกระตุ้นที่มีต่อการกำจัดไดโคฟอล

การศึกษาพลังงานกระตุ้น (Activation energy; E_a) ในสภาวะที่ไม่มีสารอินทรีย์ธรรมชาติ เหล็กและแมงกานีสเจือปน โดยช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในครั้งนี้อยู่ในช่วง 25-35 องศาเซลเซียส ส่วนที่อุณหภูมิตั้งแต่ 35-65 องศาเซลเซียส หาค่า E_aไม่ได้เนื่องจากเกิดการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ โดยสามารถหาค่า E_aได้จากการใช้สมการอาร์เรเนียส (Arrhenius) แสดงในสมการที่ (2)

$$k = Ae^{-Ea/RT} \quad (2)$$

โดยพบว่าค่า R^2 มีค่าอยู่ในช่วง 0.951-0.983 และมีค่า k_1 ในแต่ละอุณหภูมิที่แตกต่างกันอยู่ในช่วง 0.079-0.085 แสดงดังตารางที่ 3 และมีค่า E_aของปฏิกิริยาการกำจัดไดโคฟอลเท่ากับ -5.45 กิโลจูลต่อโมล

จากผลการทดลองพบว่าค่าพลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยาการกำจัดไดโคฟอล ที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส มีค่า E_aเท่ากับ -5.45 กิโลจูลต่อโมล สาเหตุที่ค่าพลังงานกระตุ้นติดลบเนื่องจากปฏิกิริยานี้ต้องการความร้อนในการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งจากข้อมูลเบื้องต้นทำให้ทราบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น อัตราในการเกิดปฏิกิริยาสำหรับกำจัดไดโคฟอลก็เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งเป็นผลมาจากเมื่ออุณหภูมิในระบบสูงขึ้น โมเลกุลของสารจะมีอัตราเร็วในการเคลื่อนที่และพลังงานจลน์มากขึ้น ทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงขึ้นไปด้วย จากกาศึกษาของ [18b] ได้ศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิที่มีต่อการกำจัดไดโคฟอลด้วยเซลลูเลสตรึง โดยช่วงอุณหภูมิที่ศึกษาเท่ากับ 20-50 องศาเซลเซียส พบว่ายิ่งเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นปฏิกิริยาการกำจัดไดโคฟอลสูงขึ้นด้วย และมีค่า E_a เท่ากับ -63 กิโลจูลต่อโมล และจากการศึกษาของ [19] ทดสอบโดยใช้เอนไซม์ Milk clotting enzyme หรือ MCE ซึ่งได้จาก *Bacillus subtilis* KU710517 สำหรับเอนไซม์ดังกล่าวนำมาใช้อยู่ในรูปเอนไซม์อิสระ และมีการเติม PEG เพื่อปรับปรุงคุณภาพของเอนไซม์ ช่วงอุณหภูมิที่ใช้ศึกษาอยู่ในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส จากผลการศึกษาพบว่ามีค่า k ของเอนไซม์ที่เติม PEG และไม่เติม PEG อยู่ในช่วง 0.00093-0.01583 และ 0.00097-0.00241 ตามลำดับ และเมื่อหาค่า E_a พบว่ามีค่าเท่ากับ -24.56 และ -29.27 กิโลจูลต่อโมล สำหรับในกรณีที่เติม PEG และไม่เติม PEG ตามลำดับ

ตารางที่ 3 พลังงานกระตุ้นสำหรับปฏิกิริยาการกำจัดไดโคฟอล

T (K)	$C = C_0\exp(-kt)$		$(1/T) \times 10^3$	$-\ln k/s^{-1}$
	k_1 (h^{-1})	R^2		
318	0.079	0.951	3.145	2.590
323	0.083	0.983	3.096	2.560
328	0.085	0.965	3.049	2.513

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารตั้งต้น C_0 (mg.l^{-1}) และอัตราการเกิดปฏิกิริยา V (mg.l^{-1}.min^{-1})

Substrate concentration		Free laccase		R^2
C_0 (mg/l)	$1/C_0$	v	1/v	
1.01	0.99	0.3	3.33	0.975
2.18	0.46	0.43	2.33	0.981
3.09	0.32	0.51	1.96	0.992
4.05	0.25	0.62	1.61	0.996
5.04	0.20	0.75	1.33	0.992

3.3 จลนพลศาสตร์ของแลคเคส

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้นของไดโคฟอลที่มีต่อการกำจัดด้วยแลคเคส ในสภาวะที่ไม่มีการเติมสารอินทรีย์ธรรมชาติเหล็กและแมงกานีส จึงได้มีการนำมาหาจลนพลศาสตร์ของแลคเคสกับการกำจัดสารดังกล่าว โดยใช้สมการของ Michaelis–Menten ซึ่งเป็นสมการที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้น (v) ของเอนไซม์ และความเข้มข้นของสารตั้งต้น (C_0) ดังสมการที่ (3)

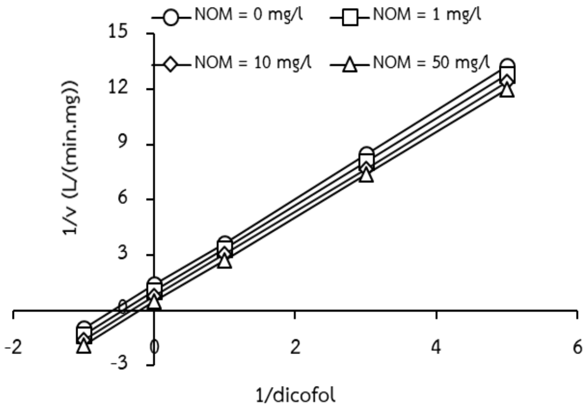
$$V = \frac{V_{\max} \times [C_0]}{K_m + [C_0]} \qquad (3)$$

เมื่อ v คืออัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (มิลลิกรัมต่อนาที), C_0 คือความเข้มข้นของสารตั้งต้นเริ่มต้น (มิลลิกรัมต่อลิตร) ,V_{max} คืออัตราเร็วของปฏิกิริยาเมื่อเอนไซม์จับตัวกับสารตั้งต้นจนอิ่มตัว (มิลลิกรัมต่อลิตร.นาที) และ K_m คือค่าคงที่ของ Michaelis ซึ่งบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างการจับกันของเอนไซม์และสารตั้งต้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)

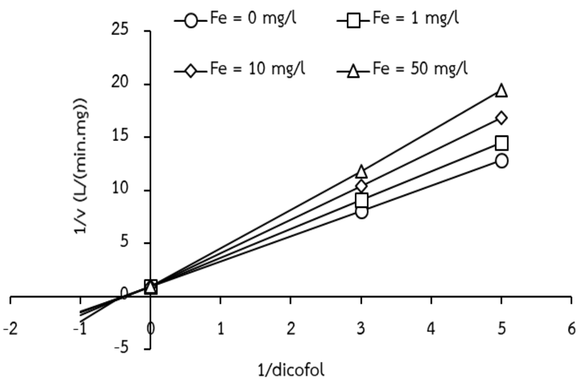
จากการศึกษาพบว่าค่า v ในแต่ละความเข้มข้นมีค่า R^2 อยู่ในช่วง 0.975-0.996 ซึ่งแสดงดังตารางที่ 4 โดยที่ค่า V_{max} และ K_mได้จากการพล๊อตกราฟระหว่าง 1/v และ $1/C_0$ ซึ่งผลการศึกษาได้ค่า K_m ของปฏิกิริยาเท่ากับ 2.52 มิลลิกรัมต่อลิตร และ V_{max} ของปฏิกิริยามีค่าเท่ากับ 0.93 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อนาที

3.3.1 ผลของการยับยั้งของ NOM และ Fe^{2+} ที่มีต่อการกำจัดไดโคฟอลด้วยแลคเคส

ศึกษาผลของการยับยั้งของ NOM และ Fe^{2+} สำหรับความเข้มข้นของไดโคฟอลที่ใช้เท่ากับ 1-5 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของ NOM และ Fe^{2+} ที่ใช้อยู่ในช่วง 0-50 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่าง NOM และ Fe^{2+} กับประสิทธิภาพการกำจัดไดโคฟอลด้วยแลคเคส โดยนำปฏิกิริยาความเร็วที่แตกต่างกันมาใช้ในการพล็อตระหว่าง 1/v เทียบกับ $1/C_0$ เพื่อแสดงถึงการยับยั้งปฏิกิริยาการกำจัดไดโคฟอลด้วยแลคเคสของ NOM และ Fe^{2+} ดังแสดงในรูปที่ 2 และ 3 ตามลำดับ



รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของNOM และความเข้มข้นของไดโคฟอลที่มีต่ออัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยา



รูปที่ 3 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ Fe^{2+} และความเข้มข้นของไดโคฟอลที่มีต่ออัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยา

จากรูปที่ 2 ผลการศึกษาเมื่อพิจารณาจากกราฟจะเห็นได้ว่าลักษณะของกราฟเป็นแบบไม่แข่งขัน (กราฟตัดแกน X ที่จุด $-1/K_m$) ซึ่งเป็นการยับยั้งโดยตัวยับยั้งเข้าจับเฉพาะกับสารประกอบเชิงซ้อนเอนไซม์-สารตั้งต้น แต่ไม่จับกับเอนไซม์อิสระ ซึ่งผลของการจับของตัวยับยั้งทำให้เอนไซม์เสียโครงรูปหรือรูปร่างเกิดการเปลี่ยนแปลง ทำให้ความสามารถในการเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ลดลงหรือหมดไป และเมื่อนำไปวิเคราะห์ตามสมการของ Michaelis–Menten และเขียนกราฟตามสมการ Lineweaver–Burk plots พบว่าทั้งค่าคงที่ของไมเคลิส และค่าความเร็วสูงสุดมีค่าลดลงที่ความเข้มข้นของ Fe^{2+} เท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งผลจากการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ [20] ได้ทำการศึกษาลักษณะการยับยั้งของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสกับสาร NOM ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยควบคุมความเข้มข้นของ BPA ที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการศึกษาพบว่าลักษณะการยับยั้งของเปอร์ออกซิเดสเมื่อเติม NOM เป็นการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน และจากงานวิจัยของ [21] ได้ศึกษาเกี่ยวกับการสร้างกราฟแบบกราฟฟิก สำหรับการวิเคราะห์การยับยั้งชนิดแข่งขัน และไม่แข่งขัน ซึ่งพบว่ากรดฮิวมิกซึ่งใช้เป็นตัวแทนโครงสร้างของ NOM เป็นการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน

จากรูปที่ 3 เมื่อพิจารณาจากกราฟจะเห็นได้ว่าลักษณะของกราฟเป็นการยับยั้งแบบแข่งขัน ซึ่งจะเกิดจุดตัดบนแกน Y ที่จุดเดียวกัน ลักษณะการยับยั้งแบบนี้ตัวยับยั้ง จะมีโครงสร้างหรือรูปร่างโมเลกุลคล้ายกับสารตั้งต้น มาแย่งจับกับเอนไซม์บริเวณเร่งของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์สามารถจับกับสารตั้งต้นได้น้อยลง ซึ่งการยับยั้งแบบนี้สามารถผันกลับได้ ค่า K_m จึงมีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากต้องใช้สารตั้งต้นเพิ่มขึ้นเพื่อมาแย่งตัวยับยั้งจับกับเอนไซม์ ในขณะที่ค่า V_{max} มีค่าเท่าเดิม ดังนั้นการเติม Fe^{2+} ส่งผลให้เกิดผลเสียหรือส่งผลให้ด้านลบต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายไดโคฟอลด้วยแลคเคส และจากงานวิจัยของ [22] ศึกษาผลกระทบของโลหะหนักหลายชนิด เช่น N^{+}, K^{+}, Cd^{2+} และ Mn^{2+} ที่มีต่อการกำจัดไดโคฟอลด้วยเอนไซม์เซลลูเลส พบว่า N^{+} และ K^{+} ไม่ส่งผลต่อการกำจัดไดโคฟอลด้วยเซลลูเลส สำหรับในกรณีของ Cd^{2+} เป็นการยับยั้งแบบแข่งขัน และ Mn^{2+} ส่งเสริมการกำจัดไดโคฟอลด้วยเซลลูเลส และจากรายงานวิจัยของ [23] ศึกษาผลกระทบของการเติม $FeSO_4$ และ $FeCl_2$ ที่ส่งผลต่อการกำจัด PCS ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าในกรณีที่ไม่เติม $FeSO_4$ และ $FeCl_2$ มีประสิทธิภาพการกำจัดเท่ากับ 100% และในกรณีที่เติม $FeSO_4$ และ $FeCl_2$ พบว่าประสิทธิภาพการกำจัดลดลงคงเหลือเท่ากับ 25 และ 18% ตามลำดับ และได้สรุปไว้ว่า $FeSO_4$ และ $FeCl_2$ เป็นตัวยับยั้งประสิทธิภาพการกำจัด PCS ของเอนไซม์เซลลูเลส

4. สรุปผลการศึกษา

เอนไซม์แลคเคสกึ่งบริสุทธิ์ที่สกัดจาก *Lentinus polychrous* Lev. สามารถสลายไดโคฟอลได้ดีในสภาวะที่ไม่มีสารอินทรีย์ธรรมชาติและเหล็กเจือปน โดยผลของสภาวะแวดล้อม เมื่อเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและอุณหภูมิ พบว่าที่เวลา 12 ชั่วโมง ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 7 และอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส สามารถกำจัดไดโคฟอลได้สูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และผลการศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของแลคเคสที่มีต่อการกำจัดไดโคฟอล

(ในกรณีที่ไม่เติมสารอินทรีย์ธรรมชาติ เหล็กและแมงกานีส) พบว่ามีค่า K_m เท่ากับ 2.52 มิลลิกรัมต่อลิตร และ V_{max} เท่ากับ 0.93 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อนาที ค่าพลังงานกระตุ้น (E_a) ที่อุณหภูมิช่วง 25-35 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 5.45 กิโลจูลต่อโมล และสำหรับในกรณีที่เติมสารอินทรีย์ธรรมชาติ เหล็กและแมงกานีส (0-50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ต่อการกำจัดไดโคฟอลที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารอินทรีย์ธรรมชาติและเหล็ก ส่งผลประสิทธิภาพการกำจัดลดลงไดโคฟอลลดลง ตรงข้ามกับในกรณีของแมงกานีส พบว่าความเข้มข้นของแมงกานีสเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพการกำจัดไดโคฟอลเพิ่มขึ้น และเมื่อพิจารณาถึงการยับยั้งของการเติมสารอินทรีย์ธรรมชาติ เหล็กและแมงกานีสที่มีต่อการกำจัดไดโคฟอลด้วยแลคเคส พบว่าสารอินทรีย์ธรรมชาติและเหล็กเป็นตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขันและแบบแข่งขัน ตามลำดับ ในขณะที่แมงกานีสกลับพบว่าช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์แลคเคส

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากหลักสูตรบัณฑิตศึกษา สาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

เอกสารอ้างอิง

[1] Neilson, A.H. An Environmental Perspective on the Biodegradation of Organochlorinexenobiotics. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1996; 37(1): 3-21.

[2] Osman, K.A., Ibrahim, G.H., Askar, A.I. and Aba Alkhail, A.R.A. Biodegradation Kinetics of Dicofol by Selected Microorganisms. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2008; 91(3): 180-185.

[3] Mourer, C.R., Hall, G. L., Whitehead, W. E., Shibamoto, T., Shull, L. R. and Schwarzbach, S. E. Chromatographic Determination of Dicofol and Metabolites in Egg Yolks. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 1990; 19(1): 154-156.

[4] Settimi, L., Masina, A., Andrion, A. and Axelson, O. Prostate Cancer and Exposure to Pesticides in Agricultural Settings. *International Journal of Cancer*, 2003; 104(4): 458-461.

[5] Marmot, M., Allen, J., Bell, R., Bloomer, E. and Goldblatt, P. WHO European Review of Social Determinants of Health and the Health Divide. 2012; 380(9846): 1011-1029. [Online], Available: www.thelancet.com.

[6] สุพจน์ ปุนบุตร และกรรณิกา รัตนพงศ์เลขา. การตรึงแลคเคสและเปรียบเทียบการใช้ในถังปฏิกรณ์แบบกะและแบบไหลต่อเนื่องในหอบรรจุสำหรับกำจัดพาราเซตามอล. *วารสารวิชาการวิศวกรรมศาสตร์ ม.อบ.*, 2560; 10(2): 33-44.

[7] Ko, C. H. and Chen, S. S. Enhanced Removal of Three Phenols by Laccase Polymerization with MF/UF Membranes. *Bioresource Technology*, 2008. 99(7): p. 2293-2298.

[8] Shin, K.S. and Lee, Y.J. Purification and Characterization of a New Member of the Laccase Family From the White-Rot Basidiomycete Coriolus Hirsutus. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000; 384(1): 109-115.

[9] Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry*, 1976: 72(1-2): 248-254.

[10] Qiu, X., Zhu, T., Yao, B., Hu, J. and Hu, S. Contribution of Dicofol to the Current DDT Pollution in China. *Environmental Science & Technology*, 2005; 39(12): 4385-4390.

[11] Hamid, M. Potential Applications of Peroxidases. *Food chemistry*, 2009; 115(4): 1177-1186.

[12] Ratanapongleka, K. and Onsarn, A. Immobilization of Peroxidase from Cauliflower Stem on Ultrafiltration Membrane for Phenol Removal. *Innovation for Sustainable Development: Applied Mechanics and Materials*, 2018; 879: 137-143.

[13] Madhavi, V. and Lele, S. Laccase: Properties and Applications. *BioResources*, 2009; 4(4): 1694-1717.
[14] Xie, H., Li, Q., Wang, M. and Zhao, L. Production of a Recombinant Laccase from Pichiapastoris and Biodegradation of Chlorpyrifos in a Laccase/Vanillin System. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2013; 23(6): 864-871.
[15] Amitai, G., Adani, R., Sod-Moriah, G., Rabinovitz, I., Vincze, A., Leader, H., Chefetz, B., Leibovitz-Persky, L., Friesem, D. and Hadar, Y. Oxidative Biodegradation of Phosphorothiolates by Fungal Laccase. *FEBS letters*, 1998; 438(3): 195-200.
[16] Skoronski, E., Fernandes, M., Magalhães Mde, L., da Silva, G.F., João, J.J., Soares, C.H. and Júnior, A.F. Substrate Specificity and Enzyme Recycling Using Chitosan Immobilized Laccase. *Molecules*, 2014; 19(10): 16794-16809.
[17] Jiang, W., Li, W., Xiao, F., Wang, D. and Wang, Z. Influence of NOM and SS on the BPA Removal via Peroxidase Catalyzed Reactions: Kinetics and Pathways. *Separation and Purification Technology*, 2017; 173: 244-249
[18] Zhai, Z., Yang, T., Zhang, B. and Zhang, J. Effects of Metal Ions on the Catalytic Degradation of Dicofol by Cellulase. *Journal of environmental sciences*, 2015; 33: 163-168.
[19] Sattar, H., Aman, A. and Qader, S.A.U. Effect of Metal Ions, Solvents and Surfactants on the Activity of Protease from Aspergillus Niger KIBGE-IB36. *Journal of Basic and Applied Sciences*, 2017; 13: 491-495
[20] Zhang, J., Yan, H., Yang, T. and Zong, Y. Removal of Dicofol from Water by Immobilized Cellulase and Its Reaction Kinetics. *Journal of environmental management*, 2011; 92(1): 53-58
[21] Wehaidy, H.R., Abdel-Naby, M.A., Shousha, W.G., Elmallah, M,I,Y. and Shawky, M.M. Improving the Catalytic, Kinetic and Thermodynamic Properties of Bacillus Subtilis KU710517 Milk Clotting Enzyme via Conjugation with Polyethylene Glycol. *International journal of biological macromolecules*, 2018; 111: 296-301.
[22] Cornish-Bowden, A. A Simple Graphical Method for Determining the Inhibition Constants of Mixed, Uncompetitive and Non-Competitive Inhibitors. *Biochemical Journal*, 1974; 137(1): 143-144.
[23] Tejirian, A. and Xu, F. Inhibition of Cellulase-Catalyzed Lignocellulosic Hydrolysis by Iron and Oxidative Metal Ions and Complexes. *Applied and environmental microbiology*, 2010; 76(23): 7673-7682.