



## รายงานการวิจัย

การศึกษาและทำบริสุทธิ์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสบางส่วนที่สกัดจากเปลือกแตงโม  
และการทดสอบประสิทธิภาพในการสลายสีย้อม

Study and Partial Purification of Peroxidase from *Citrullus lanatus*  
and Dye Decolorization Application

ฐิติกร พรหมบรรจง Thitikorn Prombanchong  
ธนากรณ์ ดำสุด Thanakorn Damsud  
สุวรรณา ผลใหม่ Suwanna Pholmai

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย  
งบประมาณเงินรายได้ ประจำปี พ.ศ. 2562





## รายงานการวิจัย

การศึกษาและทำบริสุทธิ์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสบางส่วนที่สกัดจากเปลือกแตงโม  
และการทดสอบประสิทธิภาพในการสลายสีย้อม

Study and Partial Purification of Peroxidase from *Citrullus lanatus*  
and Dye Decolorization Application

ฐิติกร พรหมบรรจง Thitikorn Prombanchong  
ธนากรณ์ ดำสุด Thanakorn Damsud  
สุวรรณา ผลใหม่ Suwanna Pholmai

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย  
งบประมาณเงินรายได้ ประจำปี พ.ศ. 2562

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประมาณ เงินรายได้ ประจำปี 2562 เป็นงานวิจัยที่ทำให้เกิดองค์ความรู้พื้นฐานในการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์ทางด้านสิ่งแวดล้อมและช่วยเพิ่มมูลค่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนในการทำวิจัยนี้ และคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในเครื่องมือพื้นฐานและการสนับสนุนในการทำวิจัย นอกจากนี้ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัย และขอขอบพระคุณอย่างยิ่งต่อความอนุเคราะห์ของคุณเขมมิการ์ โขมพัตร ที่ให้คำแนะนำ และเป็นพี่ปรึกษาในการวิจัยในครั้งนี้

ฐิติกร พรหมบรรจง

ธนากรณ์ คำสุด

สุวรรณา ผลใหม่

มิถุนายน 2563





## การศึกษาและทำปฏิกิริยาเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสบางส่วนที่สกัดจากเปลือกแตงโม และการทดสอบประสิทธิภาพในการสลายสีย้อม

ฐิติกร พรหมบรรจง<sup>1</sup> ธนาภรณ์ คำสุด<sup>1</sup> และ สุวรรณา ผลใหม่<sup>1</sup>

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสลายสีย้อม 2 ชนิด คือ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และโพลีฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดหยาบเปลือกแตงโม และความสามารถในการสลายสีย้อมของสารสกัดหยาบเปลือกแตงโมเมื่อถูกตรึงเป็นเม็ดบีดด้วยแคลเซียมอัลจิเนท กิจกรรมของเอนไซม์วัดโดยใช้สับสเตรท pyrogallol ร่วมกับ  $H_2O_2$  สำหรับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และ pyrocatechol สำหรับเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส สารสกัดหยาบเปลือกแตงโมถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัวร้อยละ 0-100 พบว่า สามารถพบกิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และโพลีฟีนอลออกซิเดสที่ความอิ่มตัวร้อยละ 50-100 และพบไอโซไซม์อย่างน้อย 2 ไอโซไซม์เมื่อแยกบนเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ เมื่อศึกษาการสลายสีย้อมของเม็ดบีดที่ตรึงสารสกัดหยาบเปลือกแตงโม พบว่าสารสกัดหยาบเปลือกแตงโมสามารถสลายสีย้อมร่วมกับ  $H_2O_2$  โดยสามารถสลายสี crystal violet, malachite green, bromophenol blue, methylene blue และ safranin-O ด้วยร้อยละการสลายสี  $98.01 \pm 0.13$ ,  $52.53 \pm 0.10$ ,  $34.48 \pm 0.10$ ,  $33.92 \pm 0.39$  และ  $25.85 \pm 0.20$  ตามลำดับ และการสลายสีโดยปราศจาก  $H_2O_2$  ของเม็ดบีดสามารถสลายสี bromothymol blue, crystal violet, malachite green และ congo red ได้ ด้วยร้อยละการสลายสีเท่ากับ  $74.24 \pm 0.35$ ,  $81.07 \pm 0.71$ ,  $84.58 \pm 0.23$  และ  $91.85 \pm 0.40$  ตามลำดับ เม็ดบีดที่ตรึงสารสกัดหยาบเปลือกแตงโมจึงถูกนำไปศึกษาต่อโดยการศึกษาระยะเวลาในการสลายสี พบว่าสี congo red สามารถสลายได้เร็วที่สุด โดยใช้เวลาในการสลายเพียง 2.5 ชั่วโมง เมื่อนำเม็ดบีดไปบ่มที่พีเอชต่าง ๆ (3 4 5 6 7 8 9 และ 10) เม็ดบีดมีรูปร่างพองเมื่อบ่มในพีเอช 3-8 แต่ยังคงสลายสีคองโกเรดได้ โดยสามารถสลายสีได้เมื่อผ่านการบ่มในช่วงพีเอช 5-10 ได้  $80.00 \pm 1.18$  -  $93.09 \pm 0.36$  แต่กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสลดลงในสารสกัดหยาบ และลดลงในเม็ดบีด เมื่อนำเม็ดบีดไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ (32 (อุณหภูมิห้อง) 40 50 60 70 80 90 และ 100 องศาเซลเซียส) พบว่า เม็ดบีดสามารถสลายสี congo red ได้ทุกอุณหภูมิ ด้วยช่วงร้อยละการสลาย  $82.30 \pm 2.59$  -  $92.34 \pm 0.32$  ในขณะที่เมื่อบ่มที่อุณหภูมิเดียวกันกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดหยาบมีค่า

ลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และกิจกรรมของเอนไซม์ในเมล็ดปีที่มีค่าสูงที่สุดเมื่ออุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และเมล็ดปีมีความสามารถในการใช้ซ้ำได้เพียง 2 รอบ โดยรอบที่ 2 มีร้อยละการสลายสี  $74.79 \pm 0.32$  จากการทดลองความสามารถในการสลายสีย้อมน่าจะมาจากการดูดซับสีของเมล็ดปี แคลเซียมอัลจิเนทและความสามารถในการสลายสีของสารสกัดหยาบโดยน่าจะมาจากกิจกรรมของ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และโพลีฟีนอลออกซิเดส สำหรับการระบุกลไกการสลายสีของเมล็ดปีที่ตรึง สารสกัดหยาบเปลือกแตงโมจำเป็นต้องศึกษาต่อ รวมถึงการนำไปประยุกต์ในการสลายสีย้อม จำเป็นต้องปรับปรุงเมล็ดปีให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ซึ่งจะต้องดำเนินการวิจัยต่อไป

**คำสำคัญ:** การสลายสีย้อม สีย้อม เปลือกแตงโม เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

## Study and Partial Purification of Peroxidase from *Citrullus lanatus* and Dye Decolorization Application

Thitikorn Prombanchong<sup>1</sup> Thanakorn Damsud<sup>1</sup> and Suwanna Pholmai<sup>1</sup>

### Abstract

The study involved two types of dye decolorization enzymes: peroxidase and polyphenol oxidase in watermelon rind extract, and the ability to dye decolorization of the calcium alginate bead immobilized watermelon rind extract. Enzyme activity was measured using substrate as a pyrogallol with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for peroxidase enzymes and a pyrocatechol for polyphenol oxidase enzymes. Peroxidase and polyphenol oxidase was appeared when precipitated with 50-100 saturated percent of ammoniumsulfate salt. The separation of crude extract also showed at least 2 isozymes on native-PAGE. Calcium alginate bead immobilized watermelon rind extract with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> could decolorized crystal violet, malachite green, bromophenol blue, Methylene blue and safranin-O with decolorization percentage of 98.01±0.13, 52.53±0.10, 34.48±0.10, 33.92±0.39 and 25.85±0.20, respectively, and without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> could decolorized bromothymol blue, crystal violet, malachite green and congo red with decolorization percentage of 74.24±0.35, 81.07±0.71, 84.58 ±0.23 and 91.85±0.40, respectively. However, control bead could also decolorize with decolorization percentage of 45-60. The bead immobilized without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> could best decolorized congo red within 2.5 hours. The calcium alginate bead immobilized watermelon rind extract could also decolorize congo red after incubation in various pH (5, 6, 7, 8, 9 and 10) with decolorization percentage range of 80.00±1.18 % - 93.09±0.36 meanwhile, the activity of polyphenol oxidase in the crude extract and in bead decreased. After incubation the bead at various temperatures (32 (room temperature, control) 40, 50, 60, 70, 90 and 100 degrees Celsius), The bead was also able to decolorize congo red with the rang percentage decolorization of 82.30±2.59 - 92.34±0.32. Meanwhile the polyphenol

oxidase activity in crude extracts and in bead had a decrease when incubated at the same temperature. Bead could be reused twice, with the second round able to congo red decolorize with the percentage of  $74.79 \pm 0.32$ . The result showed bead could decolor using the adsorption ability of calcium alginate bead and polyphenol oxidase activity in watermelon rind crude extract, however, the obvious mechanism of dye decolorization of calcium alginate bead immobilized watermelon rind extract requires further study and the bead is necessary to improve ability of decolorization more effectively.

**Keywords:** decolorization, Peroxidase, watermelon rind and dye,



## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ .....	ก
บทคัดย่อ.....	ข
Abstract.....	ง
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
ที่มาและความสำคัญ .....	1
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	2
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย .....	13
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ .....	13
บทที่ 2 วิธีการดำเนินการวิจัย .....	14
บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย.....	21
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	37
บรรณานุกรม .....	38



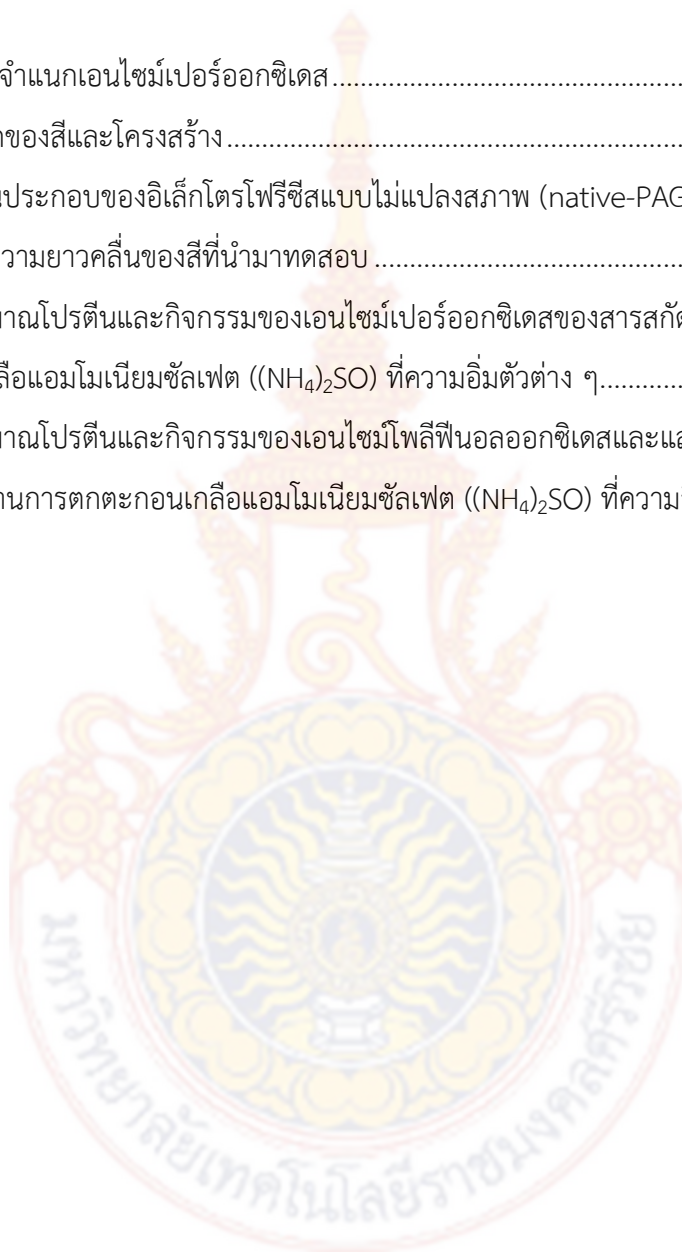
## สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1.1	แตงโม .....	2
รูปที่ 1.2	โครงสร้างของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากหัวผักกาด .....	5
รูปที่ 1.3	สมการแสดงปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส .....	6
รูปที่ 1.4	สมการแสดงปฏิกิริยาของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส .....	8
รูปที่ 1.5	สัดส่วนร้อยละของโรงงานที่มีข้อมูลระบบบำบัดน้ำเสียแบบต่าง ๆ .....	12
รูปที่ 3.1	สารสกัดหยาบแตงโม.....	21
รูปที่ 3.2	แถบแถบกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อย้อมด้วยสับสเตรทชนิดต่าง ๆ และแถบโปรตีนของสารสกัดแตงโมบนเจล native-PAGE .....	24
รูปที่ 3.3	เม็ดบิทควบคุมและเม็ดบิทแตงโม .....	25
รูปที่ 3.4	ร้อยละการสลายสีชนิดต่าง ๆ ของเม็ดบิท .....	26
รูปที่ 3.5	การสลายสีต่าง ๆ ของเม็ดบิทแตงโมที่เวลา 3 วัน.....	27
รูปที่ 3.6	การศึกษาความสามารถในการสลายสีของโกเรตของสารสกัดหยาบเปลือกแตงโม .....	28
รูปที่ 3.7	ความสามารถในการสลายสีของโกเรตของเม็ดบิทแตงโมและเม็ดบิทควบคุมที่เวลาต่าง ๆ .....	29
รูปที่ 3.8	เม็ดบิทแตงโมและเม็ดบิทควบคุมก่อนและหลังการสลายสีของโกเรตที่เวลา 150 นาที .....	30
รูปที่ 3.9	เม็ดบิทภายใต้กล้องกำลังขยาย 10X.....	30
รูปที่ 3.10	ขนาดเม็ดบิทเมื่อบ่มด้วยพีเอชบัฟเฟอร์ที่เวลา 30 นาที .....	31
รูปที่ 3.11	กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดหยาบที่พีเอชต่าง ๆ .....	32
รูปที่ 3.12	กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในเม็ดบิทแตงโม .....	32
รูปที่ 3.13	การสลายสีย้อมของเม็ดบิทเมื่อบ่มด้วยพีเอชต่าง ๆ .....	33
รูปที่ 3.14	ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดหยาบเปลือกแตงโม .....	34
รูปที่ 3.15	ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในเม็ดบิทแตงโม .....	35
รูปที่ 3.16	ผลของอุณหภูมิต่อการสลายสีของโกเรตของเม็ดบิท.....	35
รูปที่ 3.17	การสลายสีของโกเรตซ้ำของเม็ดบิท .....	36

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1.1 การจำแนกเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส.....	3
ตารางที่ 1.2 ชนิดของสีและโครงสร้าง .....	9
ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบของอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (native-PAGE).....	17
ตารางที่ 2.2 ค่าความยาวคลื่นของสีที่นำมาทดสอบ .....	18
ตารางที่ 3.1 ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของสารสกัดเปลือกแตงโมที่ผ่านการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	22
ตารางที่ 3.2 ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสและแลคเคสของสารสกัดเปลือกแตงโมที่ผ่านการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	23





## บทที่ 1

### บทนำ

#### ที่มาและความสำคัญ

การกำจัดสีเป็นการบำบัดน้ำเสียในรูปแบบหนึ่ง สีที่สังเคราะห์ เช่น สีย้อม ซึ่งใช้กันมากในอุตสาหกรรมฟอกย้อมต่าง ๆ เช่น สี methyl orange, methyl violet และ malachite green เป็นต้น สีส่วนใหญ่เป็นสารก่อการกลายพันธุ์ ทำให้เกิดน้ำทิ้งที่อาจเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต แม้กระทั่งการใช้สีย้อมในห้องปฏิบัติการ เช่น สี crystal violet และ safranin O เป็นต้น นอกจากนั้นสีที่เกิดจากอุตสาหกรรมที่ได้วัตถุดิบจากธรรมชาติ เช่น อุตสาหกรรมผลิตน้ำมันปาล์ม ซึ่งในกระบวนการผลิตก่อให้เกิดน้ำเสียที่มีสีน้ำตาล และบำบัดได้ยาก แม้จะเป็นน้ำเสียที่ไม่เป็นพิษ แต่ก็ก่อให้เกิดมลพิษทางสายตา และหากปล่อยทิ้งลงสู่แหล่งน้ำอาจทำให้เกิดผลเสียต่อสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในน้ำได้ โดยสีเหล่านี้จะเข้าไปบดบังแสง ซึ่งจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในน้ำ การบำบัดสีในน้ำเสียมีอยู่หลายวิธี เช่น การใช้สารเคมี หรือการใช้วิธีการทางธรรมชาติ หรือใช้สิ่งมีชีวิต เช่น การใช้ต้นไม้ในการดูดซับสี การใช้จุลินทรีย์ และเชื้อราในการกำจัดสี เป็นต้น แต่การใช้วิธีการเหล่านี้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการบำบัด และการบำบัดโดยใช้จุลินทรีย์พบว่าการสลายโดยจุลินทรีย์ทำให้เกิดสารที่มีความเป็นพิษมากขึ้น ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ในพืชมาใช้ในการสลายสี โดยเอนไซม์ที่นำมาประยุกต์ใช้ในการสลายสีเป็นเอนไซม์กลุ่มออกซิโดรีดักเตส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการสลายสีย้อมซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน โดยเอนไซม์ซึ่งพบบ่อยในการนำมาประยุกต์ใช้ในการสลายสีย้อม ได้แก่ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส แลคเคส และโพลีฟีนอลออกซิเดส ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสารประกอบฟีนอลิกซึ่งจัดเป็นสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่อยู่ในพืช ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจในนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ เปลือกแตงโม เนื่องจากส่วนด้านในของเปลือกแตงโมมีลักษณะสีขาว เมื่อนำมาสกัดเอนไซม์แล้วได้สารละลายค่อนข้างใส ไม่มีสี จึงเป็นวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตรที่น่าสนใจในการนำมาสกัดเอนไซม์ เนื่องจากสารสกัดที่ได้มีลักษณะใส ไม่มีสีไม่มีรบกวนด้วยเฉพาะคลอโรฟิลล์ซึ่งมีสีเขียว ที่มีสีมารบกวนสารสกัด จึงไม่ต้องผ่านการแยกรงควัตถุออก จึงเหมาะแก่การทำบริสุทธิ์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสบางส่วนเพื่อการประยุกต์ใช้ในด้านสลายสีย้อม

## ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### แตงโม

แตงโมเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทะเลทรายคาลาฮารีทวีปแอฟริกาที่สามารถจำแนกทางอนุกรมวิธานได้ดังนี้

อาณาจักร: Plantae

หมวด: Magnoliophyta

ชั้น: Magnoliopsida

อันดับ: Cucurbitales

วงศ์: Cucurbitaceae

สกุล: *Citrullus*

สปีชีส์: *C. lanatus*



ก

ข

ค

**รูปที่ 1.1** แตงโม ก คือ ลักษณะของใบแตงโม ข คือ ผลแตงโม และ ค คือ ผลของแตงโมไม่มีเมล็ดซึ่งมีเนื้อแตงโมสีแดงและบริเวณด้านในเปลือกสีขาว (<https://th.wikipedia.org/wiki/แตงโม>)

แตงโม (*Citrullus lanatus*) [รูปที่1] เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae ซึ่งเป็นพืชวงศ์เดียวกับแตงกวา (*Cucumis sativus*) ฟัก และแคนตาลูป ลักษณะของแตงโมเป็นพืชเถาที่เลื้อยไปตามพื้นดิน เถาจะมีขนอ่อน ๆ ปกคลุม จัดเป็นพืชล้มลุก มีอายุสั้น โดยแตงโมเป็นพืชที่ปลูกเพื่อรับประทานผล โดยผลแตงโมมีทั้งสีเหลืองและสีแดง เนื้อผลมีรสชาติหวาน พันธุ์แตงโมที่ปลูกในประเทศไทยมีทั้งแบบไร้เมล็ดและมีเมล็ด และพันธุ์ที่ปลูกไว้เพื่อทานเมล็ดที่เรียก เมล็ดก้วยจี ซึ่งพันธุ์นี้มีเนื้อน้อยเมล็ดใหญ่ สายพันธุ์ที่ไม่มีเมล็ด เช่น พันธุ์แฮปปี้ เฟมิลี่ ซึ่งเนื้อผลมีสีเหลือง และพันธุ์แฮปปี้ โกลด์เด็นท์ เฟมิลี่ ซึ่งเนื้อผลมีสีแดง ส่วนพันธุ์ที่มีเมล็ด เช่น เฟรช สวีทโกลด์ เฟรช ศรีจันทร์ เฟรช ไดอาน่า ซึ่งเนื้อแตงโมมีสีเหลือง และเฟรช ซอนญ่า ตอปีโต และกินรี ซึ่งมีเนื้อผลสีแดง ผลของแตงโมสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วน คือ ส่วนเนื้อ (flesh) เมล็ด (seed) และเปลือก (rind) [Odewunmi et al., 2015] ส่วน

ของแตงโมที่นิยมบริโภคคือ ด้านเนื้อที่เป็นสีแดงหรือสีเหลือง และเปลือกเป็นสีเขียวทึบ ซึ่งมีปริมาณมาก และหาได้ง่ายตลอดทั้งปี ของเหลือทิ้งจากผลแตงโมจึงถูกนำกลับมาศึกษาต่อ เพื่อการใช้ประโยชน์ เช่น การวัดปริมาณซิทรูลินในเปลือกแตงโมเพื่อยับยั้งการกัดกร่อนของโลหะในกรดไฮโดรคลอริก (Odewunmi et al., 2015) หรือการยับยั้งการกัดกร่อนโลหะในสภาวะที่เป็นกรด (Odewunmi et al., 2015) หรือการใช้ไมโครเวฟช่วยในการสกัดเพกตินจากเปลือกแตงโม (Prakash Marana et al., 2014 and Tarazona □ Díaz et al., 2010) และการศึกษาปริมาณสารธรรมชาติที่มีในส่วนของเปลือกแตงโม ซึ่งพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกอยู่ในปริมาณปานกลางในส่วนของเปลือกซึ่งเท่ากับ 389 ถึง 458 มิลลิกรัมอิกวิวาเลนตกรดคลอโรจีนิก/กิโลกรัมน้ำหนักสด และมีสารที่ชื่อซิทรูลิน (citrullin) อยู่ในปริมาณมากปริมาณเท่ากับ 3.34 ถึง 2.33 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักสด

### เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (EC number 1.11.1.x) เป็นกลุ่มของเอนไซม์กลุ่มใหญ่ซึ่งเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันดังสมการ (รูปที่ 1.2c และ 1.3) การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจะเกิดร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในพืชถูกจัดแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม (ตารางที่ 1.1) ตามโครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) ของเอนไซม์ และการเร่งปฏิกิริยาที่แตกต่างกันโดยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในกลุ่มที่ 1 (class I peroxidase) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในเซลล์พืช แบบที่เรียและรา (intracellular) ได้แก่ เอนไซม์ microbial cytochrome C peroxidase, (EC 1.11.1.5) bacterial-catalase peroxidase (EC 1.11.1.6) และ ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11) เปอร์ออกซิเดสกลุ่มที่ 2 (class II peroxidase) เป็นเอนไซม์ที่อยู่นอกเซลล์ (extracellular enzyme) พบในเชื้อรา รวมถึงเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase) [EC 1.11.1.14] และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (Mn<sup>2+</sup> dependent peroxidase) [EC 1.11.1.13] และเปอร์ออกซิเดสกลุ่มที่ 3 (class III peroxidase) เป็นเอนไซม์ที่ถูกหลั่งออกมานอกเซลล์ หรือถูกขนส่งไปยังแวคิวโอล (vacuole) (Welinder, 1992)

#### ตารางที่ 1.1 การจำแนกเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

Superfamily	Class <sup>a</sup>	Member (EC number)	Origin	Molecular weight (kDa)
Animal peroxidase		Eosinophill peroxidase (EC 1.11.1.7)	Animal	50-75
		Lactoperoxidase (EC 1.11.1.7)	Animal	78-85
		Myeloperoxidase (EC 1.11.1.7)	Animal	79-150

Superfamily	Class <sup>a</sup>	Member (EC number)	Origin	Molecular weight (kDa)
		Thyroid peroxidase (EC 1.11.1.7)	Animal	90-110
		Glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9)	Animal and plant	6-22 and 75-112 <sup>b</sup>
		Prostaglandin endoperoxidase synthase (EC 1.14.99.1, partial) <sup>c</sup>	Animal	115-140
Catalase		Catalase (EC 1.11.1.6)	Animal, plant, fungus and yeast	140-530
Plant peroxidase	I	Cytochrome c peroxidase (EC 1.11.1.5)	Yeast and bacterium	32-63
		Catalase-peroxidase (EC 1.11.1.6)	Bacterium and fungus	150-240
		Ascorbate peroxidase (EC 1.11.1.11)	Plant	30-58
	II	Manganese-dependent peroxidase (EC 1.11.1.13)	Fungus	43-49
		Ligninase (EC 1.11.1.14)	Fungus	40-43
	III	Peroxidase (EC 1.11.17, POX)	Plant	28-60

<sup>a</sup>Established only for the plant peroxidase superfamily.

<sup>b</sup>Molecular weights for monomeric and tetrameric forms, respectively.

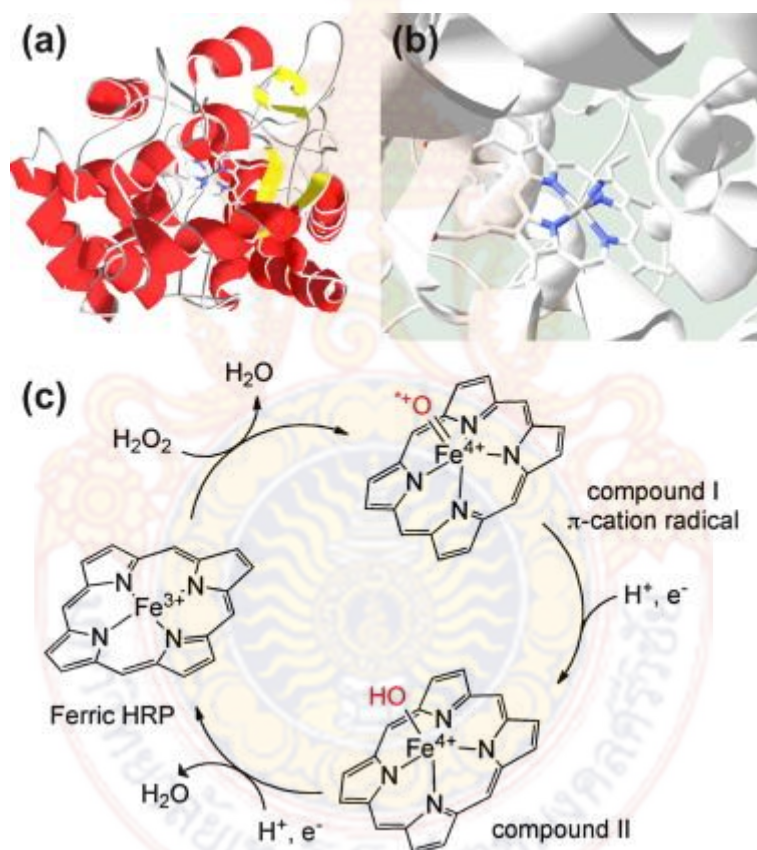
<sup>c</sup>Homology was observed in the central region (approximately 180 residues) with other animal peroxidases.

ที่มา: Hiraga et al. (2001)

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ประกอบไปด้วยโครงสร้างแบบ  $\alpha$ -helix 10 สาย โดยในกลุ่มที่ 1 และ 2 มีโครงสร้าง  $\alpha$ -helix ที่จำเพาะจำนวน 1 สาย ส่วนโครงสร้างที่ 3 มีสาย  $\alpha$ -helix ที่จำเพาะจำนวน 3 สาย (Schuller et al., 1996; Gajhede et al., 1997) เปอร์ออกซิเดสที่ถูกนำมาศึกษาทั่วโลกในการเร่งปฏิกิริยา คือ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากหัวผักกาด (horseradish peroxidase) โดยมีขั้นตอนในการเร่งปฏิกิริยา 4 ขั้นตอน คือ 1) การจับของเปอร์ออกไซด์ที่ไม่เสถียรสารประกอบเริ่มต้น (compound 0) กับหมู่ฮีมที่เป็น prosthetic group ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (heme-Fe(III)) 2) การเกิดออกซิเดชันของเหล็ก (iron) เพื่อสร้างสารประกอบตัวที่ 1

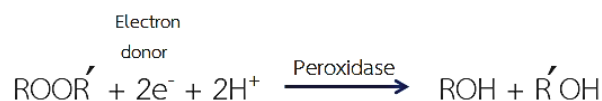


(compound 1) ซึ่งเป็นสารที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ (ferryl species) ด้วยอนุมูลประจุบวกแบบไพ (pi-cation radical) ในบริเวณวงแหวนพอฟิริน (porphyrin) 3) สารประกอบตัวที่ 1 เกิดการรับอิเล็กตรอนที่ได้จากสารตั้งต้นตัวที่ 1 ทำให้เกิดอนุมูลตัวที่ 2 ขึ้นมา (compound II) 4) เกิดการรับอิเล็กตรอนของสารประกอบตัวที่ 2 โดยใช้โมเลกุลของสารตั้งต้นตัวที่ 2 โดยจะทำให้โมเลกุลสารตั้งต้นกลายเป็นอนุมูล และเอนไซม์เข้าสู่สภาวะปกติ (native enzyme) นอกจากนี้ยังพบว่าแคลเซียมไอออน ( $\text{Ca}^{2+}$ ) สามารถพบได้ทั่วไปในพืช และมีผลทำต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยา (Hiraga et al., 2001)



รูปที่ 1.2 โครงสร้างของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากหัวผักกาด โดยที่ a-c คือ โครงสร้างของเอนไซม์ทั้งหมด หมู่ฮีม (III) ในเอนไซม์ที่อยู่ในวงแหวนพอฟิริน (phophyrin) และ กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ตามลำดับ

ที่มา: André, R et al. (2013)



### รูปที่ 1.3 สมการแสดงปฏิกิริยาของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

เปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด พบได้ในเซลล์ทุกเซลล์ทั้งในเซลล์ยูคาริโอตและโพรคาริโอต โดยเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการกำจัดสารพิษที่เกิดในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ ได้แก่  $\text{H}_2\text{O}_2$  และยังเกี่ยวข้องกับระบบการต้านทานโรคในพืชอีกด้วย (Almagro et al., 2009) มีการสกัดและการทำบริสุทธิ์เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ศึกษาคุณสมบัติ และการทดสอบการประยุกต์ใช้ เช่น

Zhang et al. (2018) ทำการศึกษาลักษณะของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่มีหมู่ฮีมตัวใหม่ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ราขาว และการนำมาประยุกต์ใช้ในการสลายสีย้อม โดยการใช้น้ำเลี้ยงเชื้อราขาว ภายหลังจากการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ชนิดนี้โดยใช้ anion DEAE sepharose chromatography แล้วนำมาตรวจสอบขนาดโดยใช้ SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีขนาด 45 kDa มีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานเท่ากับ 4.5 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และมีความสามารถในการสลายสี Congo red (53.9% ใน 12 ชั่วโมง), methyl orange (77.6% ใน 12 ชั่วโมง), Remazol brilliant blue R (81.0% ใน 5 ชั่วโมง), bromophenol blue (62.2% ใน 12 ชั่วโมง) and crystal violet (80.9% ใน 12 ชั่วโมง). และเมื่อเติม gallic acid เป็นตัวกระตุ้นสามารถสลายสี azure blue ได้ 63.1% ใน 24 ชั่วโมง

ธรรมศักดิ์ (2547) ได้ทำการศึกษาผลของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากยางพาราต่อการสลายสารประกอบจำพวกฟีนอลร่วมกับระบบการกำจัดน้ำเสียในน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม พบว่าการใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสร่วมกับระบบกำจัดน้ำเสียสามารถลดปริมาณสารประกอบฟีนอลได้ร้อยละ 95

Bilal and Asgher (2015) พบว่าเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจากเห็ดหลินจือที่ทำบริสุทธิ์เมื่อนำมาตรึงบนตัวกลางแล้วศึกษาการสลายสีย้อมสังเคราะห์ (Sandal reactive dyes) พบว่า สามารถสลายสีย้อมที่ศึกษาได้สูงสุด 92.29% ในรอบแรก และได้ 60% เมื่อสลายสีย้อมครบ 6 รอบ และเมื่อนำเอนไซม์ชนิดนี้ไปตรึงบนเม็ดบีดพิทแคลเซียมอัลจิเนทแล้วศึกษาการกำจัดสีย้อม และการลดพิษ พบว่าสามารถสลายสีย้อม Sandal-fix Red C<sub>4</sub>BLN, Sandal-fix Turq Blue GWF, Sandal-fix Foron Blue E<sub>2</sub>BLN, 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

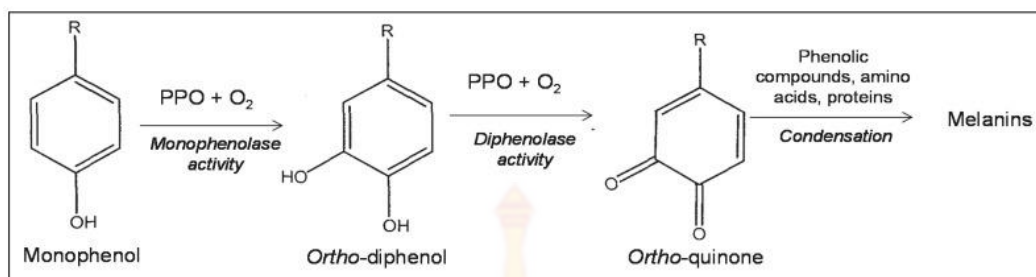
(COD) ได้ 91.18-94.85 %, และ total organic carbon (TOC) ได้ 89.58-95 % ในสารละลายสี ย้อม ทั้งยังสามารถมีประสิทธิภาพในการสลายได้ถึง 7 รอบการทำงาน นอกจากการนำเอนไซม์เปอร์ ออกซิเดสมาใช้ในการสลายสีย้อม หรือใช้กับน้ำเสียแล้ว เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสยังถูกนำมา ประยุกต์ใช้งานด้านอื่น ๆ เช่น

Maurícia et al. (2013) ได้ทำการทำนาโนพาร์ติเคิล PEGylated polyurethane (PU-PEG) ที่มีเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากหัวผักกาดถูกดูดซับอยู่ เพื่อประยุกต์ใช้ในการตรวจหาสารโดปามีน จาก การทดสอบพบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสถูกดูดซับบนพื้นผิวของนาโนพาร์ติเคิล คิดเป็น 45% ของ พื้นที่ผิวนาโนพาร์ติเคิล โดยในหนึ่งนาโนพาร์ติเคิลมีโมเลกุลของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากหัวผักกาด เท่ากับ 4,400 โมเลกุล เมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน 50 วันจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือ 50% และ ในการประยุกต์ใช้ในการตรวจจับสารโดปามีน พบว่านาโนพาร์ติเคิลสามารถทำกราฟมาตรฐานโดปามีน ได้เป็นเส้นตรงในความเข้มข้นของโดปามีนที่ใช้เท่ากับ  $10^{-5}$  -  $1.9 \times 10^{-3}$  โมล/ลิตร ( $r^2 = 0.9997$ ) และสามารถตรวจจับโดปามีนที่ความเข้มข้นต่ำสุดเท่ากับ  $10^{-6}$  โมล/ลิตร

### เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเตส (oxidoreductase) ที่เป็น สาเหตุของการเกิดสีน้ำตาลในผักและผลไม้ เป็นเอนไซม์ที่มีคอปเปอร์ไอออน ( $\text{Cu}^{2+}$ ) ป็นองค์ประกอบ (Can et al., 2014) โครงสร้างของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสมี 4 หน่วยย่อย (subunit) เอนไซม์โพลี ฟีนอลสามารถใช้สับสเตรทเป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอลโดยทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาให้โมโน ฟีนอล (monophenol) กลายเป็นไดฟีนอล (diphenol) และเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนสารประกอบฟีนอล ไปเป็นควิโนน โดยมีออกซิเจนเป็นสับสเตรทร่วม ในการทำปฏิกิริยา เมื่อได้สารประกอบควิโนนจะเกิด การพอลิเมอไรเซชันต่อได้เป็นเมลานิน ซึ่งเป็นรงควัตถุที่เกิดสีน้ำตาล นอกจากนี้เอนไซม์โพลีฟีนอล ออกซิเดสยังสามารถใช้สับสเตรทอื่นได้แก่สารประกอบในกลุ่มที่มีโครงสร้างในกลุ่มสารประกอบฟีนอล เช่น อะโรมาติกเอมีน เบนซีนไฮดรอล ทำให้เป็นเอนไซม์ตัวหนึ่งในกลุ่มออกซิโดรีดักเตสที่ได้รับความสนใจในการนำมาบำบัดน้ำเสีย (Nandi et. Al., 2009)





รูปที่ 1.4 สมการแสดงปฏิกิริยาของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส  
ที่มา: Taranto et al. (2017)

Shinde et al. (2012) ได้ศึกษาความสามารถของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่สกัดมาจากใบ หล้าทองเกรท (*Parthenium hysterophorus*), ผักเป็ด (*Alternanthera sessilis*) และ สบู่ดำ (*Jatropha curcas*) สามารถสลายสีย้อม Yellow 5G และ Brown R ได้ โดยใช้เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งสามารถสลายสีย้อมได้ภายใน 6 ชั่วโมง

Jadhav et al. (2013) พบว่าเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากเปลือกกล้วยที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนเกลือ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ที่ความอิ่มตัว 70% สามารถสลายสารประกอบฟีนอลิก 4 ชนิด ได้แก่ pyrogallol, gallic acid Tannic acid และ phenol ที่ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร ได้ ได้ 100, 85, 80 และ 70% ตามลำดับ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และสามารถสลายสี Blue 2RNL ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม/ลิตร ได้ 89% ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และสามารถทำให้ค่า chemical oxygen demand (COD) ลดต่ำลง

Arabaci and Usluoglu (2014) ตรึงเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสจากใบควินซ์ (*Cydonia oblonga*) ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต เปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ไม่ตรึงพบว่า การตรึงเอนไซม์ทำให้ความคงตัวของเอนไซม์มีมากขึ้นเมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่ไม่ได้ตรึง และสามารถสลายสีย้อม Telon Yellow ARB ได้ 72.68% เมื่อป้อนเอนไซม์ที่ตรึงกับสีย้อม นาน 30 นาที


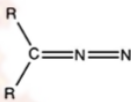

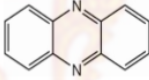
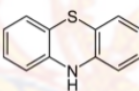
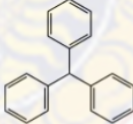
### สีย้อมและประเภทของสีย้อม

ในด้านสิ่งทอ สี หมายถึง สิ่งที่มีสีหรือทำให้เกิดสี (colorant) สามารถจำแนกสีโดยอาศัยเกณฑ์การจำแนกได้หลายเกณฑ์ ได้แก่

1. จำแนกตามประจุ ได้แก่ สีประจุบวก ประจุลบ และไม่มีประจุ
2. จำแนกตามเส้นใยที่สามารถย้อมได้ เช่น สีย้อมเส้นใยเซลลูโลส สีย้อมเส้นใยพอลิเอสเตอร์ สีย้อมเส้นใยพอลิเอไมด์ สีย้อมเส้นใยอะคริลิก เป็นต้น
3. จำแนกตามชื่อสี เช่น สีแอสิด สีไดเร็กซ์ สีดีสเพิร์ส สีเมอร์แดนท์ เป็นต้น

4. จำแนกตามโครงสร้างทางเคมี (ตารางที่ 1.2) เช่น มีโครงสร้างเอโซ มีโครงสร้างแอนทราควิโนน มีโครงสร้างสตีเวนสัน เป็นต้น

ตารางที่ 1.2 ชนิดของสีและโครงสร้าง

กลุ่ม	โครงสร้าง	สี
อะโซ (Azo)		Methyl orange Methyl red Methyl yellow
ไดอะโซ (Diazo)		Amido black Congo red Trypan blue
ออกซาซีน (Oxazine)		Resazurin
ฟีนาซีน (Phenazine)		Safranin-O
ฟีโนไทอะซีน (Phenothiazine)		Methylene green Touidine blue O
ไตรฟีนิลมีเทน (Triphenylmethane)		Aniline blue Brilliant green Bromocresol purple Bromothymol blue Crystal violet Fast green Malachite green Methyl green Methyl violet Water blue

ที่มา Chanwun et. al., (2013)

5. จำแนกตามแหล่งกำเนิดสี เช่น สีที่กำเนิดจากธรรมชาติ สีที่มนุษย์สังเคราะห์ขึ้นมา หรือ สีอินทรีย์ (organic colorant) และสีอนินทรีย์ (inorganic colorant) โดยสีอินทรีย์เป็นสารให้สีที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ เป็นสีย้อม (dye) ที่ใช้ย้อมวัสดุ (substrate) เช่น ผ้า กระดาษ ผนัง ผง

โดยการละลายสีในตัวกลางเช่น น้ำ เป็นต้น ส่วนสีอนินทรีย์ เป็นสารให้สีของสารประกอบอนินทรีย์ ส่วนใหญ่เป็นพิกเมนต์ (pigment) ทำให้เกิดสีในวัสดุโดยไม่ต้องใช้ตัวกลางเป็นน้ำ เช่น สีในสีทาบ้าน หรือ สีในพลาสติก

6. จำแนกตามสีที่มองเห็นได้ เช่น สีดำ สีแดง สีเหลือง สีเขียว เป็นต้น ฯลฯ

สีส่วนใหญ่ในอุตสาหกรรมฟอกย้อมนิยมจำแนกสีตามวิธีการใช้สี ซึ่งจำแนกสี ออกเป็น 11 ชนิด โดยมีประเภทและคุณสมบัติของสีดังนี้ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ประเภทสีย้อมและคุณสมบัติ

ประเภทสีย้อม	สมบัติ
1. สีแอซิด (acid dye)	เกิดจากสารประกอบอินทรีย์ มีประจุลบ ละลายน้ำได้ดี ส่วนใหญ่เป็นเกลือของกรดกำมะถัน กลไกในการติดสีเกิดเป็นพันธะไอออนิก ใช้ย้อมเส้นใยโปรตีน เช่น สี Acid Brown 113 Tartarazine, Ponceau 4R, Carmoisine, Erythrosine และ C.I. Acid red 13 เป็นต้น
2. สีไดเรกต์ (direct dye) หรือสีย้อมผ้า	เป็นเกลือของเบสอินทรีย์ ให้ประจุลบ ละลายน้ำได้ดี นิยมใช้ย้อมเส้นใยโปรตีน ไนลอนและใยอะคริลิกได้ดี เช่น สี congo red เป็นต้น
3. สีเบสิก (basic or cationic dye)	เป็นสารประกอบอะเซที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มีหมู่กรดซัลโฟนิกที่ทำให้ตัวสีสามารถละลายน้ำได้ มีประจุลบ นิยมใช้ย้อมเส้นใยเซลลูโลส เช่น สี methylene blue, rhodulin blue และ crystal violet เป็นต้น
4. สีดิสเพอร์ส (disperse dye)	ไม่ละลายน้ำแต่มีสมบัติการกระจายได้ดี สามารถย้อมเส้นใยโพลีเอสเตอร์ ไนลอน และอะคริลิกได้ดี สีดิสเพอร์สแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยพิจารณาจากเคมีในตัวสีย้อม ได้แก่ สีย้อมอะโซและสีย้อมอะมิโน แอนทราควิโนน เช่น สี indanthrene blue, duranol และ dispersal เป็นต้น
5. สีรีแอกทีฟ (reactive dye)	ละลายน้ำได้ มีประจุลบ เมื่ออยู่ในน้ำจะมีสมบัติเป็นต่างเหมาะกับการย้อมเส้นใยเซลลูโลสมากที่สุด สีรีแอกทีฟมี 2

ประเภทสีย้อม	สมบัติ
	กลุ่ม คือ กลุ่มที่ย้อมติดที่อุณหภูมิสูง 70-75°C และกลุ่มที่ย้อมติดที่อุณหภูมิปกติ procion cibracon และ remazol เป็นต้น
6. สีย้อมอะโซอิก (azoic acid)	ไม่สามารถละลายน้ำได้ การที่สีจะเกาะกับเส้นใยได้ต้องย้อมด้วยสารประกอบฟีนอลซึ่งละลายน้ำได้ก่อน แล้วย้อมทับด้วยสารไดอะโซคอมโปเนนท์จึงจะเกิดเป็นสีได้ ใช้ย้อมเส้นใยได้ทั้งเซลลูโลส ไนลอน หรือ อะซิเตท เช่น Methyl orange, Methyl red, Methyl yellow Amido black, Congo red และ Tryphan blue เป็นต้น
7. สีแว๊ต (vat dye)	ไม่สามารถละลายน้ำได้ เมื่อทำการย้อมต้องเตรียมน้ำย้อมให้สีแว๊ตละลายน้ำ โดยให้ทำปฏิกิริยากับสารรีดิวซ์และโซเดียมไฮดรอกไซด์ สีแว๊ตมีส่วนประกอบทางเคมีที่สำคัญ 2 ชนิด เป็นอนุพันธ์ของสี indigo เช่น vat yellow 11, vat blue 1, vat brown 3, vat red 28 และ vat orange 9 เป็นต้น
8. สีมอร์แดนต์ หรือโครม (mordant or chrome dye)	เป็นสีที่มีโมเลกุลใหญ่ ซึ่งเกิดจากสีมอร์แดนต์หลายโมเลกุลจับกับโลหะแล้วละลายน้ำได้ จึงทำให้ย้อมได้ง่าย ใช้ย้อมเส้นใยโปรตีนและเส้นใยพอลิเอไมด์ได้ดี เช่น สี carmosine และ alizarin เป็นต้น
9. สีอินเกรน (Ingrain dye)	ไม่ละลายน้ำ โดยเกิดเป็นคอลลอยด์หลังจากเกิดปฏิกิริยากับน้ำ ใช้สำหรับย้อมผ้า เช่น Nitro aniline red เป็นต้น
10. สีออกซิเดชัน (oxidation dye)	ไม่ละลายน้ำ อาศัยปฏิกิริยาการตกตะกอนผลึกภายในเส้นใย ใช้ย้อมผ้าและขนสัตว์ เช่น สี Aniline black เป็นต้น
11. สีซัลเฟอร์ (sulfur dye)	ไม่ละลายน้ำ เมื่อทำการย้อมต้องรีดิวซ์สีเพื่อให้โมเลกุลอยู่ในสภาพที่ละลายน้ำได้ นิยมนำมาย้อมผ้า เช่น สี sulfur black 1 และ sulfur green 12 เป็นต้น

### การบำบัด หรือการสลายสีย้อม

ปัจจุบันการกำจัดหรือการสลายสีย้อมมี 3 วิธี คือ

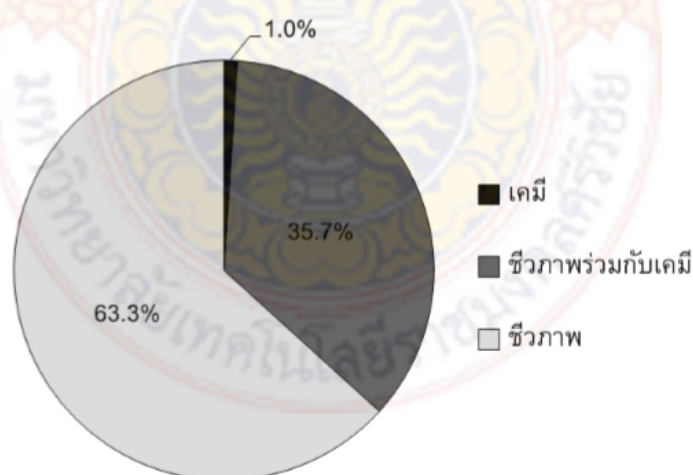
1. กระบวนการบำบัดทางกายภาพ (Physical Treatment) เป็นการบำบัดน้ำเสียโดยใช้วิธีทางฟิสิกส์ โดยอาศัยการกรองเศษขยะออกจากน้ำเสีย เป็นระบบการบำบัดเบื้องต้น จากนั้นน้ำเสียจะถูกบำบัดในขั้นตอนต่อไป คือ ใช้ตะแกรงหยาบ ตามด้วยตะแกรงละเอียดเพื่อกรองเศษผ้า

และด้ายออกจากน้ำเสีย น้ำที่ผ่านการกรองจะถูกนำมาปรับสภาพ โดยการควบคุมความเข้มข้นของน้ำเสียก่อนจะลดอุณหภูมิเพื่อบำบัดในขั้นต่อไป

2. ระบบบำบัดทางฟิสิกส์-เคมี (Physicochemical) เป็นระบบที่มีความหลากหลาย เช่น 1) การตกตะกอนทางเคมี ใช้เพื่อแยกสารแขวนลอย 2) การดูดซับ (adsorption) โดยใช้ถ่านกัมมันต์ 3) การโอโซน (ozone oxidation) คือการออกซิไดส์สารอินทรีย์ให้เกิดการสลาย โดยใช้โอโซน ( $O_3$ ) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการสลายสีย้อมสูง 4) การกรอง (filtration) โดยใช้ทรายในการกรอง ซึ่งเป็นหน่วยบำบัดขั้นสุดท้าย

3. การบำบัดทางชีวภาพ มี 3 ประเภท ได้แก่ 1) การบำบัดโดยการใช้ออกซิเจน (Aerobic Treatment process) ซึ่งเป็นระบบบำบัดแบบแอกติเวเตดสลัดจ์ (Activated Sludge) และ บ่อเติมอากาศ (Aerated Lagoon) 2) ระบบบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic Ponds) และ 3) ระบบบำบัดที่เลียนแบบกลไกธรรมชาติ คือ บ่อปรับเสถียร (Stabilization pond)

ซึ่งการบำบัดน้ำเสียแต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียที่แตกต่างกัน โดยส่วนมากแล้วมีค่าใช้จ่าย หรือ จำเป็นต้องใช้พื้นที่ในการบำบัดสูง ปัจจุบันโรงงานในประเทศไทยที่เกี่ยวข้องกระบวนการผลิตที่ก่อให้เกิดน้ำเสียที่มีสีปนเปื้อน เช่น โรงงานมัตย้อม หรือฟอกสี นิยมใช้วิธีการบำบัดแบบชีวภาพมากที่สุด คือ เป็นร้อยละ 63.3 เมื่อเทียบกับวิธีการบำบัดในโรงงานทั้งหมด (รูปที่ 1.5)



รูปที่ 1.5 สัดส่วนร้อยละของโรงงานที่มีข้อมูลระบบบำบัดน้ำเสียแบบต่าง ๆ (พ.ศ.2556)

ที่มา: ศูนย์บริการวิชาการจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (2556)



### วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาเอนไซม์เปอร็อกซิเดสจากเปลือกแตงโม
2. เพื่อทำบริสุทธิ์เอนไซม์เปอร็อกซิเดสบางส่วนจากเปลือกแตงโม
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์เปอร็อกซิเดสจากเปลือกแตงโมในการกำจัดสีย้อม

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อศึกษาเอนไซม์เปอร็อกซิเดสจากเปลือกแตงโม
2. เพื่อทำบริสุทธิ์เอนไซม์เปอร็อกซิเดสบางส่วนจากเปลือกแตงโม
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์เปอร็อกซิเดสจากเปลือกแตงโมในการกำจัดสีย้อม

### นิยามศัพท์เฉพาะ

บิทแตงโม (watermelon rind bead) คือ เม็ดบิทแคลเซียมอัลจิเนตที่ตรึงสารสกัดหยาบเปลือกแตงโม

บิทควบคุม คือ เม็ดบิทแคลเซียมอัลจิเนตที่ตรึงน้ำกลั่น



## บทที่ 2

### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 1. การสกัดเปลือกแตงโม

แตงโมพันธุ์กินรี ซื้อจากตลาดสดทุ่งสงเมื่อ 15 มิ.ย. 2561 ปอกเปลือกสีเขียวด้านนอกออก เหลือแต่ส่วนที่เป็นเยื่อสีขาวด้านใน หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ชั่งน้ำหนัก เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาสกัด

#### 2. การสกัดสารสกัดหยาบจากเปลือกแตงโม

เปลือกแตงโมที่หั่นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จำนวน 209.76 กรัม สกัดเอาน้ำออกด้วย เครื่องคั้นน้ำผลไม้แยกกาก (เครื่องคั้นน้ำผักและผลไม้แยกกาก HHS-500) เติม 3% w/w Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) ลงไป คนให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที วัดปริมาตรสารสกัดหยาบที่ได้ เก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

#### 3. การตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

สารสกัดเปลือกแตงโมที่ได้ถูกนำไปตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 50%, 70% และ 90% โดยใช้สารสกัดเริ่มต้น 45 มิลลิลิตร เติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตตามตารางการตกตะกอนเกลือของ Green and Hughes (1955) โดยค่อย ๆ เติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 14.09 กรัม ลงในสารสกัด พร้อมคนเบา ๆ จนกว่าเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตละลาย ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้โปรตีนตกตะกอน ในอ่างน้ำที่มีน้ำแข็ง จากนั้นแยกส่วนของโปรตีนที่ตกตะกอนออกโดยการหมุนเหวี่ยงความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แยกสารละลายส่วนใสที่ได้ออก วัดปริมาตรแล้วนำไปตกตะกอนเกลือที่ความอิ่มตัว 70% ส่วนตะกอนโปรตีนที่ได้ละลายกลับด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 6.8 เก็บสารละลายที่ได้จากการตกตะกอนเกลือที่ความอิ่มตัวต่าง ๆ ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไป dialysis โดยการตกตะกอนเกลือที่ความอิ่มตัว 90% ทำเช่นเดียวกัน

#### 4. การ dialysis

สารละลายโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตความอิ่มตัวต่าง ๆ ถูกนำมา dialysis โดยการนำสารละลายโปรตีน ใส่ในถุง dialysis ที่มี molecular weight cut off 12,000-14,000 ยี่ห้อ CelluSep จากนั้น dialysis ในบัฟเฟอร์ 0.1 M phosphate buffer pH 6.8 ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส หลัง dialysis แล้วโปรตีนถูกทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ Cellulose acetate แล้วเก็บสารละลายโปรตีนที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

#### 5. การวัดปริมาณโปรตีน



การวัดปริมาณโปรตีนใช้วิธีการของแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976) โดยใช้สารสกัดที่ได้ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายแบรดฟอร์ด (เตรียมโดยการละลาย 100 มิลลิกรัม Coomassie Brilliant Blue G-250 ใน 50 มิลลิตร 95% ethanol จากนั้นเติม 85% (w/v) phosphoric acid ปริมาตร 100 มิลลิตร แล้วปรับปริมาตรทั้งหมดให้ครบ 1 ลิตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา) ปริมาตร 1 มิลลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ นำมาเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 0-0.1 มิลลิกรัม/มิลลิตร

#### 6. การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส แลคเคส และโพลีฟีนอลออกซิเดส

##### 6.1 การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยใช้สับสเตรทเป็น guaiacol

การทดสอบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยใช้สับสเตรทเป็น Guaiacol ดัดแปลงตามวิธีการของ Cavalcanti et al. (2004) โดยปฏิกิริยาในการทดสอบประกอบด้วย 10 mM phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 2.7 มิลลิตร 0.1 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 ไมโครลิตร 0.25% v/v guaiacol 100 ไมโครลิตร และสารสกัดปริมาตร 100 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นความยาวคลื่น 470 นาโนเมตร ทุก ๆ 15 วินาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นคำนวณค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปต่อนาที แล้วคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยใช้สูตร

กิจกรรมของเอนไซม์ (U/ml) =  $(V_t \times m) / (\epsilon \times v \times D)$  โดยที่

$V_t$  คือ ปริมาตรทั้งหมดในปฏิกิริยา

$m$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปต่อนาที

$\epsilon$  คือ molar extinction coefficient ของ guaiacol ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$V$  คือ ปริมาตรสารสกัดที่ใช้ในปฏิกิริยา (ml)

และ  $D$  คือ ระยะทางที่แสงผ่าน เท่ากับ 1 cm

โดยกิจกรรมของเอนไซม์รายงานในรูปค่าเฉลี่ยจากการทดสอบ 3 ซ้ำ  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ในหน่วย U/ml

##### 6.2 การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยใช้สับสเตรทเป็น pyrogallol

การทดสอบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสโดยใช้สับสเตรทเป็น pyrogallol ดัดแปลงตามวิธีการของ Chance and Maehly (1955) และ Shannon. (1966) โดยปฏิกิริยาในการทดสอบประกอบด้วย 10 mM phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 2.42 มิลลิตร 0.1 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ปริมาตร 100 ไมโครลิตร 50 mg/ml pyrogallol ปริมาตร 320 ไมโครลิตร และสารสกัดปริมาตร 160 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ทุก ๆ 15 วินาที เป็น

เวลา 2 นาที จากนั้นคำนวณค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปต่อนาที แล้วคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสโดยใช้สูตร

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (U/ml)} = (V_t \times m) / (\mathbf{E} \times v \times D) \text{ โดยที่}$$

$V_t$  คือ ปริมาตรทั้งหมดในปฏิกิริยา

$m$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปต่อนาที ( $\Delta OD_{420}/\text{min}$ )

$\mathbf{E}$  คือ molar extinction coefficient ของ pyrogallol ซึ่งมีค่าเท่ากับ 12.0 เมื่อ pyrogallol มีความเข้มข้น 1 mg/ml

$V$  คือ ปริมาตรสารสกัดที่ใช้ในปฏิกิริยา (ml)

และ  $D$  คือ ระยะทางที่แสงผ่าน เท่ากับ 1 cm

โดยกิจกรรมของเอนไซม์รายงานในรูปค่าเฉลี่ยจากการทดสอบ 3 ซ้ำ  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ในหน่วย U/ml

#### 7. การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ดัดแปลงตามวิธีการของ Siddiq and Cash (2000) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 0.05 M phosphate buffer pH 6.8 2.360 มิลลิลิตร 0.1 M catechol 0.6 มิลลิลิตร และตัวอย่าง 40 ไมโครลิตร โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ทุก ๆ 10 วินาที เป็นเวลานาน 2 นาที รายงานกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในหน่วย U/ml โดย 1 unit ของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส คือค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไป 0.001 OD/min ( $\Delta OD_{420}/\text{min}$ ) ซึ่งมาจาก catechol ที่ถูกออกซิไดส์

#### 8. การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์แลคเคส

กิจกรรมเอนไซม์แลคเคส ดัดแปลงตามวิธีการของ Bourbonnais et al. (1998) ปฏิกิริยาประกอบด้วย 5 mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) ใน 100 mM acetate buffer pH 4.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จากนั้นนำสารละลายวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

#### 9. การตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์เปอร้ออกซิเดสและโพลีฟีนอลออกซิเดสด้วยวิธีอิเล็กโตรโพรซีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (native-PAGE)

การทำอิเล็กโตรโพรซีซิสแบบไม่แปลงสภาพ Native polyacrylamide gel electrophoresis (native-PAGE) ดัดแปลงจากวิธีการของ Laemmli (1970) โดยใช้การแยกแบบไม่ต่อเนื่อง (Discontinues electrophoresis) โดยใช้ stacking gel 4% และ separating gel 10% โดยส่วนประกอบของเจลดังตารางที่ 1

**ตารางที่ 2.1** ส่วนประกอบของอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ (native-PAGE) ดัดแปลงจากวิธีการของ Laemmli (1970)

ส่วนประกอบ	Stacking gel (4%)	Separating gel (10%)
30% Acrylamide-0.8%bisacrylamide	0.67 ml	4.29 ml
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1.25 ml	-
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	-	3.25 ml
10% w/v Ammonium persulfate	50 $\mu$ l	200 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l	13 $\mu$ l
Distilled water	2.83 ml	4.71 ml
Total volume	5 ml	13 ml

การย้อมโปรตีนเพื่อศึกษาความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ทำโดยการย้อมด้วยสี 0.1% Coomassie Brilliant Blue G-250 และล้างสีที่ย้อม (destained) ในสารละลาย methanol-water-acetic acid (4:5:1) จนกว่าสารละลายที่ล้างจะใสไม่มีสี

การย้อมกิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยใช้สับสเตรทเป็น Guaiacol ทำโดยปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 0.25% (v/v) guaiacol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร , 0.1 โมลาร์  $H_2O_2$  ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ 0.1 โมลาร์ 10 mM phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 23 มิลลิลิตร บ่มเจลประมาณ 10 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบกิจกรรมของเอนไซม์

การย้อมกิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โดยใช้สับสเตรทเป็น pyrogallol ทำโดยปฏิกิริยา ประกอบด้วย 0.25% (v/v) guaiacol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร , 0.1 โมลาร์  $H_2O_2$  ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ 0.05 โมลาร์ 10 mM phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 23 มิลลิลิตร บ่มเจลประมาณ 10 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบกิจกรรมของเอนไซม์

การย้อมกิจกรรมเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส ทำโดยปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 0.1 M catechol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใน 0.05 M phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร บ่มเจลประมาณ 10 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบกิจกรรมของเอนไซม์

#### 10. การตรึงสารสกัดหยาบเปลือกแดงโมด้วยแคลเซียมอัลจิเนท

เพื่อทดสอบความสามารถในการสลายสีเบื้องต้นของสารสกัดที่ได้ สารสกัดที่ได้นำมาเจือจาง 1.83 เท่า จะถูกนำมาเติมโซเดียมอัลจิเนทให้มีความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนทเท่ากับ 1.3% w/v จากนั้นคนให้โซเดียมอัลจิเนทพองตัว คนจนโซเดียมอัลจิเนทละลายเข้าเป็นเนื้อเดียวกับสารสกัดเติมสารละลาย 8% v/v glutaraldehyde คนให้เข้ากัน จากนั้นนำมาหยดผ่านหลอดฉีดยาที่ปลายกระบอกมีเข็มฉีดยา nipro ขนาด 18G x 1" (1.2 x 25 mm) ลงในสารละลาย 200 mM  $CaCl_2$

ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร โดยชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารสกัด บ่มเป็นเวลานาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เพื่อรอให้เม็ดบีดแข็งตัวเต็มที่ จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง กรองด้วยกระดาษกรองแล้วซับด้านล่างกระดาษกรองด้วยกระดาษเนื้อเยื่อเพื่อให้น้ำกลั่นแห้ง จะได้เม็ดบีดเปลือกแดงโม และเม็ดบีดควบคุม เมื่อสุ่มเม็ดบีดทั้ง 2 ชนิด ๆ ละ 10 เม็ดวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง พบว่ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ  $2.34 \pm 0.31$  และ  $2.47 \pm 0.35$  มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งขนาดของเม็ดบีดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อทดสอบแบบ one-way ANOVA ด้วยวิธีการ Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

#### 11. การทดสอบการสลายสีย้อมโดยใช้เม็ดบีดเปลือกแดงโม

การทดสอบการสลายสีย้อมโดยใช้เม็ดบีดเปลือกแดงโม ทำโดยการใช้สีย้อม 10 สี ได้แก่ สี Bromocresol green, Bromothymol blue, Bromophenol blue, Congo red, Crystal violet, Malachite green, Methyl orange, Methylene blue, Phenol red และ Safranin-O โดยสีแต่ละสีจะถูกเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีค่าการดูดกลืนแสงตามความยาวคลื่นเฉพาะของสีนั้น ๆ ให้มีค่าเท่ากับ  $1.000 \pm 0.200$  จากนั้นเม็ดบีดจะถูกชั่งน้ำหนักจำนวน 1.00 กรัม ใส่ในหลอดทดลอง โดยแบ่งการทดลองเป็น 6 กลุ่ม เพื่อให้สอดคล้องกับลักษณะการทำงานของเอนไซม์เปอร็อกซิเดสและโพลีฟีนอลออกซิเดส คือ สีย้อม, สีย้อมผสม  $H_2O_2$  0.1 M, สีย้อมผสม  $H_2O_2$  ผสมเม็ดบีดควบคุม สีย้อมผสม  $H_2O_2$  ผสมเม็ดบีดแดงโม สีย้อมผสมเม็ดบีดควบคุม และสีย้อมผสมเม็ดบีดแดงโม โดยปริมาตรรวมทั้งหมดเท่ากับ 3 มิลลิลิตร ปิดหลอด แล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารสกัด และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสีแต่ละชนิดตามความยาวคลื่นของสีแต่ละชนิด ดังตารางที่ 2.2 จากการทดสอบความสามารถในการสลายสีเบื้องต้น เม็ดบีดจะถูกนำไปทดสอบการสลายสีย้อมที่เหมาะสม ด้วยวิธีการที่เหมาะสมอีกครั้งเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพในการสลายสีย้อมที่เหมาะสมมากที่สุด และการเลือกสีย้อมเพื่อนำไปศึกษาผลของอุณหภูมิและพีเอชต่อความสามารถในการสลายสีย้อม

#### ตารางที่ 2.2 ค่าความยาวคลื่นของสีที่นำมาทดสอบ

ลำดับที่	สีย้อม	ค่าความยาวคลื่น (นาโนเมตร)
1.	Bromocresol green	615
2.	Bromothymol blue	612
3.	Bromophenol blue	594
4.	Congo red	498
5.	Crystal violet	589
6.	Malachite green	615



ลำดับที่	สีย้อม	ค่าความยาวคลื่น (นาโนเมตร)
7.	Methyl orange	482
8.	Methylene blue	662
9.	Phenol red	482
10.	Safranin-O	527

ร้อยละการสลายสีคำนวณดังสมการ

ร้อยละการสลายของสี (%Decolorization) =  $((A_{dye} - A_{test}) / A_{dye}) \times 100$  โดยที่

$A_{dye}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อม

$A_{test}$  คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสีย้อมผสมสารต่าง ๆ

## 12. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการสลายสีย้อมของเม็ดบีด

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการสลายของเม็ดบีดแดงโม ทำโดย นำเม็ดบีดแดงโมและเม็ดบีดควบคุมปริมาตร 1 กรัมในหลอดทดลองที่มีฝาปิด โดยบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 32 (อุณหภูมิห้อง) 40 50 60 70 80 90 และ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเม็ดบีด จากนั้นนำมาสลายสีย้อมเช่นเดียวกับข้อที่ 11

## 13. การศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดเหยาบ เม็ดบีด และการสลายสีของโกเรด

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในพีเอชต่าง ๆ ทำโดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 20 มิลลิโมลาร์ คะทีคอล ในสารละลาย 100 มิลลิโมลาร์ บัฟเฟอร์ พีเอช 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 และสารสกัด 40 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นทุก ๆ 10 วินาที ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เป็นเวลา 1 นาที กิจกรรมของเอนไซม์ 1 ยูนิต (Unit, U) คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้น 0.001OD/นาที ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในเม็ดบีดที่ผ่านการบ่มในบัฟเฟอร์พีเอชต่าง ๆ ทำโดย นำเม็ดบีดทรงจืด 0.5 กรัม บ่มในบัฟเฟอร์พีเอชต่าง ๆ (พีเอช 3 4 5 6 7 8 9 และ 10) นาน 30 นาที จากนั้นล้างบัฟเฟอร์ออกด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ซับน้ำออกให้เม็ดบีดแห้ง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดบีดที่เปลี่ยนแปลงไป จากนั้นนำเม็ดบีดวัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสโดยใช้ปฏิกิริยาเช่นเดียวกับข้อที่ 2

การศึกษาผลของพีเอชต่อการสลายสีของเม็ดบีดทรงจืดทำโดย การนำเม็ดบีดทรงจืด จำนวน 1 กรัม บ่มในบัฟเฟอร์ที่มี พีเอชต่าง ๆ (พีเอช 3 4 5 6 7 8 9 และ 10) เป็นเวลานาน 30 นาที ชุดควบคุมไม่บ่มที่พีเอชใด ๆ จากนั้นนำเม็ดบีดออกจากบัฟเฟอร์ ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง สังเกตการ

เปลี่ยนแปลงของเม็ดบีด แล้วนำไปสลายสีย้อม เช่นเดียวกับข้อที่ 3.2 เม็ดบีดควบคุมทำเช่นเดียวกับ เม็ดบีดทรงจืด

#### 14. การศึกษาจำนวนรอบการสลายสีของเม็ดบีด

เมื่อทดสอบสีที่เม็ดบีดสามารถสลายได้ดีที่สุด เม็ดบีดจะถูกทดสอบการสลายสี โดยใช้เวลา ในการสลายที่เหมาะสมที่สุด จำนวนรอบการสลายสี โดยใช้สภาวะเดียวกับการทดสอบการสลายสี ย้อม ดังกล่าวไว้ในข้อ โดยใช้สีคองโกเรดที่มีค่าการดูดกลืนแสงตั้งต้นที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร เท่ากับ  $1.000 \pm 0.200$  ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมกับเม็ดบีดทรงจืดจำนวน 1 กรัม ชุดควบคุมใช้เม็ด บีดควบคุมแทน จากนั้นทำการเขย่าที่ความเร็ว 100 rpm นาน 3 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายที่ได้วัดค่า การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 662 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณร้อยละการสลายสีย้อม ส่วนเม็ดบีดที่ แยกสารละลายออกแล้วนำไปเติมสีย้อมเพื่อทำการทดสอบความสามารถในการสลายสีอีกครั้ง

#### 15. การศึกษาลักษณะทางกายภาพของเม็ดบีดภายหลังการดูดซับ

ภายหลังการดูดซับสีเม็ดบีดควบคุม และเม็ดบีดแต่งโมจะถูกนำไปตัดขวาง แล้วส่อง ด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อดูลักษณะการดูดซับที่กำลังขยายต่าง ๆ

#### 16. การวิเคราะห์สถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติ ใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 21 โดยวิเคราะห์ความ แปรปรวนโดยใช้ One-Way ANOVA แบบ Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ )

### บทที่ 3

#### ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

##### 1. การสกัดสารสกัดหยาบจากเปลือกแตงโมกินรี

สารสกัดหยาบจากเปลือกแตงโม เป็นของเหลวสีเหลืองปนแดง (ผิดพลาด! ไม่พบแหล่งการอ้างอิง) หลังจากเติม PVPP สารละลายเหลืองและใสขึ้น โดยสารสกัดที่ได้จากเปลือกแตงโมคิดเป็นร้อยละผลผลิต เท่ากับ 74.89



รูปที่ 3.1 สารสกัดหยาบแตงโม ก คือ เปลือกแตงโมกินรี ส่วนสีขาวที่นำมาคั้นแยกกาก และ ข คือ น้ำคั้นเปลือกแตงโมที่ได้จากเครื่องคั้นน้ำแยกกาก

##### 2. ปริมาณโปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและโพลีฟีนอลออกซิเดสเมื่อผ่านการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จากการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 3 ช่วง ได้แก่ 0-50%, 50-70%, และ 70-90% และทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส โพลีฟีนอลออกซิเดส และแลคเคส พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสสูงที่สุดเมื่อตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 70% เมื่อทดสอบโดยใช้สับสเตรทเป็น guaiacol และ pyrogallol (ตารางที่ 3.1) เช่นเดียวกับเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสที่มีกิจกรรมเอนไซม์มากที่สุดเมื่อตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 70% และเมื่อศึกษา specific activity พบว่ามีกิจกรรมสูงที่สุดเมื่อตกตะกอนเกลือที่ความเข้มข้น 90% (ตารางที่ 3.2) ในการทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอนเกลือ ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมคือ ที่ความเข้มข้น 50-90% เพื่อให้มีกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและโพลีฟีนอลออกซิเดสสูงที่สุด และสารสกัดหยาบแตงโมไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสเมื่อทดสอบโดยใช้สับสเตรทเป็น ABTS



ตารางที่ 3.1 ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสของสารสกัดเปลือกแคงโมที่ผ่านการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Sample	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	กิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (POD) [U/ml]			
		POD-Guaiacol		POD- pyrogallol	
		Total activity	Specific activity	Total activity	Specific activity
Crude	6.54±0.50 <sup>d</sup>	2.78±0.03 <sup>e</sup>	0.43±0.04 <sup>b</sup>	72.08±0.00 <sup>e</sup>	11.06±0.85 <sup>b</sup>
0-50	3.35±0.02 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.57±0.00 <sup>a</sup>	0.17±0.00 <sup>a</sup>
50-70	1.68±0.07 <sup>b</sup>	1.02±0.00 <sup>d</sup>	0.61±0.03 <sup>c</sup>	23.53±0.00 <sup>d</sup>	14.05±0.63 <sup>c</sup>
70-90	0.54±0.06 <sup>a</sup>	0.68±0.01 <sup>c</sup>	1.27±0.12 <sup>d</sup>	16.29±0.00 <sup>c</sup>	30.58±3.12 <sup>d</sup>
90-100	0.34±0.01 <sup>a</sup>	0.18±0.00 <sup>b</sup>	0.54±0.01 <sup>c</sup>	5.08±0.00 <sup>b</sup>	15.16±0.30 <sup>c</sup>

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบ 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ตัวอักษรพิมพ์เล็กภาษาอังกฤษในสัณฐานเดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ทดสอบแบบ Duncan One-Way ANOVA ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p<0.05$ )

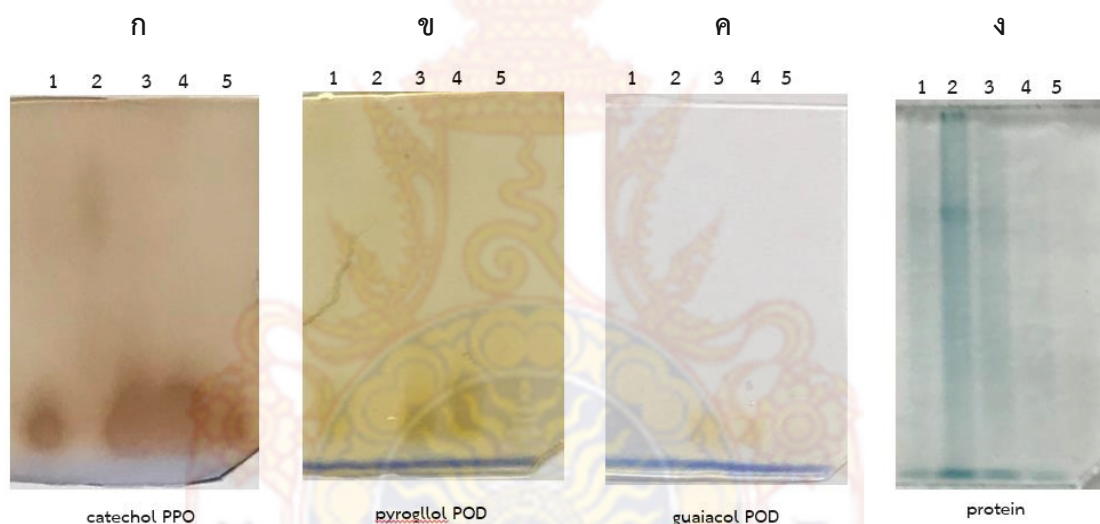
**ตารางที่ 3.2** ปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสและแลคคาเอสของสารสกัดเปลือกแดงไม้ผ่านการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Sample	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	กิจกรรมเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (PPO-catechol) [U/ml]	กิจกรรมเอนไซม์แลคคาเอส [U/ml]
		Total activity	Total activity
		Specific activity	Specific activity
Crude	6.54±0.50 <sup>d</sup>	48,375.00±8,573.65 <sup>d</sup>	7,428.02±1479.96 <sup>b</sup>
0-50	3.35±0.02 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00
50-70	1.68±0.07 <sup>b</sup>	13,996.50±1,879.28 <sup>c</sup>	8,365.29±1,295.23 <sup>b</sup>
70-90	0.54±0.06 <sup>a</sup>	9,382.50±214.34 <sup>b,c</sup>	17,625.10±2,017.69 <sup>c</sup>
90-100	0.34±0.01 <sup>a</sup>	5,390.00±138.56 <sup>a,b</sup>	16,077.76±714.70 <sup>c</sup>

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบ 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation, SD) ตัวอักษรพิมพ์เล็กภาษาอังกฤษในสตมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ทดสอบแบบ Duncan One-Way ANOVA ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 21 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ )

### 3. แถบโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและโพลีฟีนอลออกซิเดสบนเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ native-PAGE

เมื่อนำสารสกัดที่ผ่านการตกตะกอนเกลือที่ความอิมิตัวต่าง ๆ มาแยกบนเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วศึกษาแถบของโปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และโพลีฟีนอลออกซิเดส พบว่า ปริมาณโปรตีนบนเจลพบมากที่สุด (รูปที่ 2 ง) เมื่อตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 0-50% ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสปรากฏแถบที่ในสารสกัดที่ตกตะกอนเกลือ 50-70 และ 70-90% (รูปที่ 2 ก) สอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ย้อมด้วยสับสเตรท pyrogallol และ guaiacol (รูปที่ 2 ข และ ค) ดังนั้นการทำบริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและโพลีฟีนอลออกซิเดสโดยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตควรเลือกช่วงการตกตะกอนที่ความอิมิตัว 50-90% ซึ่งสอดคล้องกับการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ในหลอดทดลอง

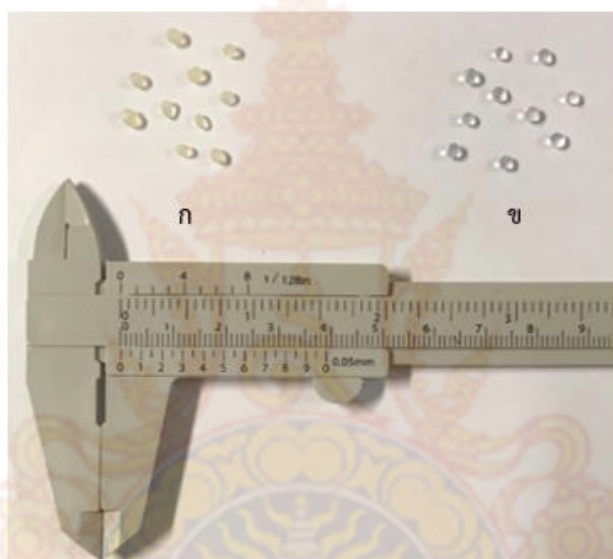


รูปที่ 3.2 แถบกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อย้อมด้วยสับสเตรทชนิดต่าง ๆ และแถบโปรตีนของสารสกัดจากใบชา native-PAGE โดย ก-ง คือ แถบกิจกรรมของเอนไซม์ PPO ที่ย้อมด้วย catechol แถบกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ย้อมด้วยสับสเตรท pyrogallol guaiacol และแถบโปรตีนตามลำดับ โดยที่ 1-5 คือ ตัวอย่างสารสกัดหยาบแดงโม และที่ผ่านการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิมิตัว 0-50, 50-70, 70-90% และ 90-100% ตามลำดับ

### 4. การตรึงสารสกัดหยาบจากเปลือกแดงโม

สารสกัดหยาบจากเปลือกแดงโมมีสารผสมหลายชนิด เมื่อนำมาใช้ในการสลายสีย้อม อาจเป็นการเพิ่มสารอินทรีย์ในน้ำเสีย จึงอาจทำให้น้ำที่ได้หลังจากการบำบัดแล้วมีคุณภาพไม่เพียงพอ การนำสารสกัดมาตรึงในตัวกลางจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยลดผลอันไม่พึงประสงค์นี้ได้ สารที่นำมาตรึงที่สารสกัดหยาบเปลือกแดงโมคือ โซเดียมอัลจิเนตซึ่งสามารถเกิดเป็นเม็ดยืดได้ในการละลายที่เป็น

ไอออนบวก เช่น แคลเซียมไอออน ในการทดลองนี้ใช้โซเดียมอัลจินเนทที่ความเข้มข้น 1.3% w/v และ 0.8% v/v glutaraldehyde จากนั้น ถูกทำให้กลายเป็นเม็ดบีดในสารละลาย แคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 200 mM โดยหยดสารละลายสารสกัดหยาบที่เตรียมไว้ผ่านเข็มฉีดยา nipro ขนาด 18G x 1" (1.2 x 25 mm) โดยชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นแทน ขนาดของเม็ดบีดควบคุมที่ได้มีลักษณะใส และเม็ดบีดแต่งโมที่ได้มีสีเหลืองอ่อน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย  $2.47 \pm 0.35$  และ  $2.34 \pm 0.31$  มิลลิเมตร (รูปที่ 3.3) ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่า ขนาดของเม็ดบีดควบคุมและเม็ดบีดแต่งโมที่ได้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ



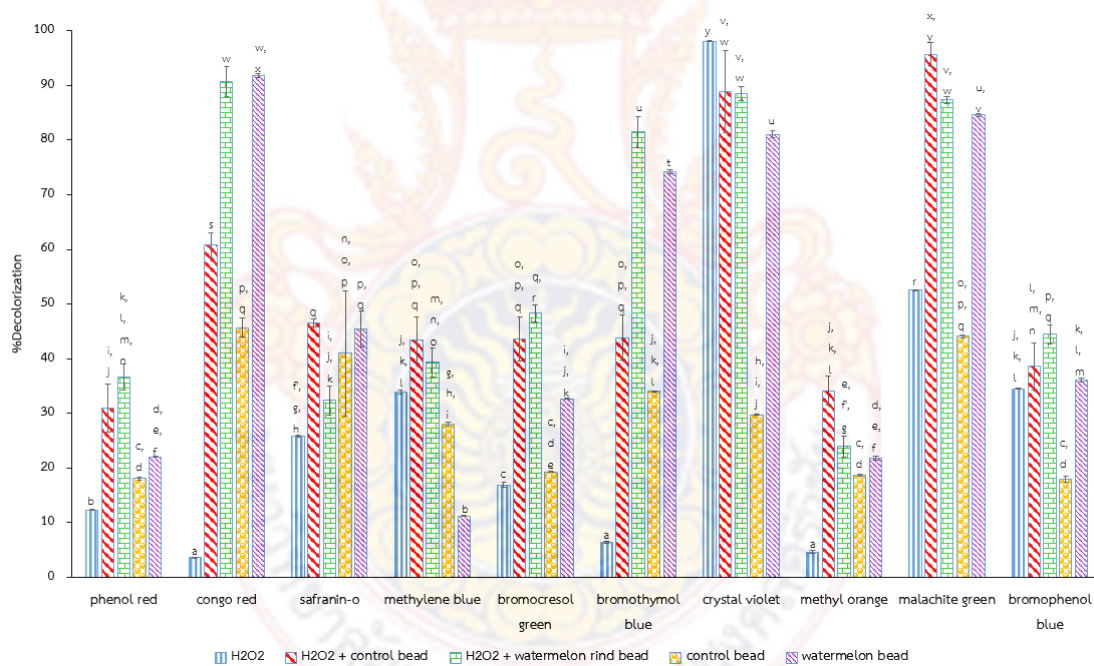
รูปที่ 3.3 เม็ดบีดควบคุมและเม็ดบีดแต่งโม

### 5. การทดสอบการสลายสีของเม็ดบีดแต่งโมที่สกัดได้

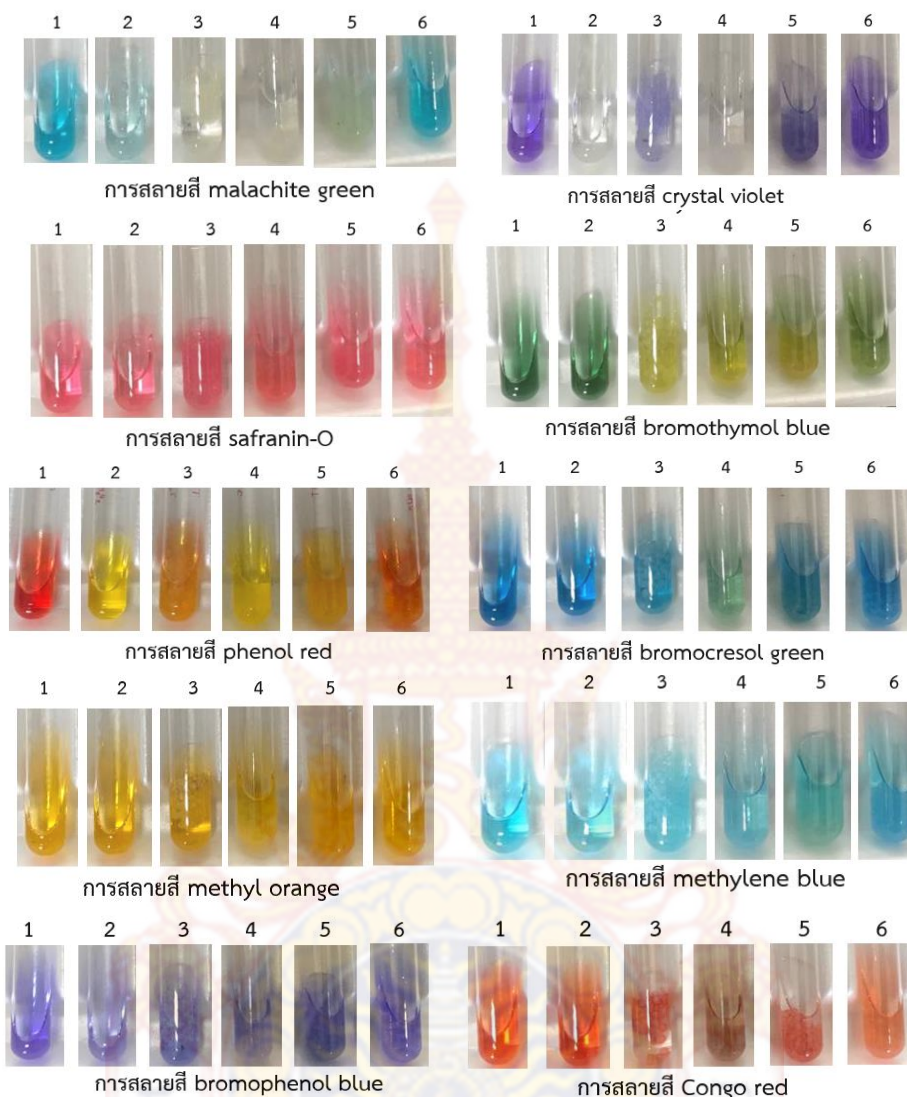
การทดสอบการสลายสีของเม็ดบีดแต่งโมเบื้องต้น สารสกัดหยาบที่ใช้ เมื่อเตรียมเป็นเม็ดบีดแต่งโมคิดเป็นค่าเฉลี่ยจากสารสกัดเดิม 1.83 เท่า โดยการทดสอบการสลายสีของเม็ดบีดแต่งโมที่สกัดได้เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเตส (oxidoreductase) ที่มีในพืชซึ่งเกี่ยวข้องกับการนำมาประยุกต์ใช้ในการสลายสีของ 2 ชนิด คือ เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และโพลีฟีนอลออกซิเดส รวมถึงเอนไซม์แลคเคส โดยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่ต้องใช้สับสเตรทร่วมเป็น  $H_2O_2$  ส่วนเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสใช้ออกซิเจนเป็นสับสเตรทร่วม จึงมีกลุ่มการทดสอบ 6 กลุ่ม คือ 1. สีของ 2. สีผสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3. สีผสมเม็ดบีดควบคุม 4. สีผสมเม็ดบีดควบคุมและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 5. สีผสมเม็ดบีดแต่งโม 6. สีผสมเม็ดบีดแต่งโมและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีของเม็ดบีดเป็นเวลา 3 วัน



พบว่า  $H_2O_2$  ที่เติมลงไปเป็นสับสเตรทร่วมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสในสารสกัดหยาบมีผลต่อการสลายสี โดยเฉพาะสี crystal violet, malachite green, bromophenol blue, methylene blue และ safranin-O โดยมีร้อยละการสลายสี  $98.01 \pm 0.13$ ,  $52.53 \pm 0.10$ ,  $34.48 \pm 0.10$ ,  $33.92 \pm 0.39$  และ  $25.85 \pm 0.20$  ตามลำดับ ส่วนปีทควบคุมมีความสามารถในการสลายสีด้วย โดยความสามารถในการสลายสีของสีย้อมมาจากการดูดซับสีของเม็ดปีทควบคุม สังเกตจากสีที่ติดอยู่บนเม็ดปีท โดยมีช่วงการสลายสีได้ร้อยละ 18.12-45.70 เมื่อใช้เม็ดปีทแต่งโมพบว่าเม็ดปีทแต่งโมสามารถสลายสี bromothymol blue, crystal violet, malachite green และ congo red ได้ดี (รูปที่ 3.5) โดยสามารถสลายสีได้ร้อยละ  $74.24 \pm 0.35$ ,  $81.07 \pm 0.71$ ,  $84.58 \pm 0.23$  และ  $91.85 \pm 0.40$  ตามลำดับ (รูปที่ 3.4) จากการทดสอบพบว่าเมื่อตรึงสารสกัดหยาบแต่งโมด้วยแคลเซียมอัลจินทแล้วสามารถประยุกต์ใช้ในการสลายสีย้อมได้ โดยสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการสลายสีย้อมได้ ทั้งในรูปแบบการทำงานของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และในรูปแบบการทำงานของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส



รูปที่ 3.4 ร้อยละการสลายสีชนิดต่าง ๆ ของเม็ดปีท โดยค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดสอบ 3 ซ้ำ บาร์คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ส่วนตัวอักษรพิมพ์เล็กภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ ) วิเคราะห์โดย One-Way ANOVA โดยวิธี Duncan



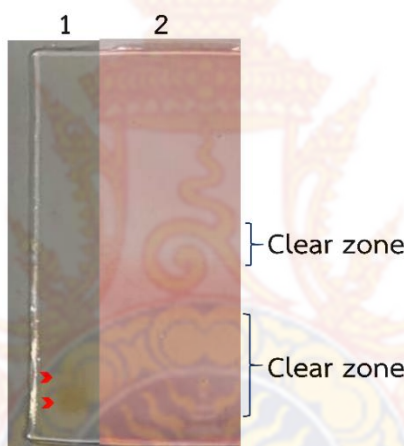
รูปที่ 3.5 การสลายสีต่าง ๆ ของเม็ดปืทแดงโมที่เวลา 3 วัน โดยหมายเลข 1-6 หมายถึง สีย้อม, สีย้อม+ $H_2O_2$ , สีย้อม+ปืทแดงโม+ $H_2O_2$ , สีย้อม+ปืทควบคุม+ $H_2O_2$ , สีย้อม+ปืทแดงโม และ สีย้อม+ปืทควบคุม ตามลำดับ

## 6. การทดสอบการสลายสีย้อมคองโกเรดด้วยกิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสบนแผ่นเจล native-PAGE

เมื่อศึกษาการสลายสีย้อมเบื้องต้นแล้วพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสมีผลต่อสีย้อมคองโกเรดมากที่สุด ดังนั้นจึงนำสารสกัดหยาบมาแยกบนแผ่นเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส แบ่งเจลเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ย้อมกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (ดังวิธีการย้อมในข้อ 9 บทที่ 2) แล้วบ่มแผ่นเจลภายหลังการแยกด้วย 0.1 M  $H_2O_2$  ผสมกับสารละลายสีคองโกเรดที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความ



ยาวคลื่น 498 นาโนเมตร เท่ากับ  $1.000 \pm 0.200$  เขย่าที่ความเร็ว 100 rpm จนกว่าจะสังเกตเห็นแถบใสที่เกิดขึ้นพบว่า สีคองโกเรดที่ปรากฏบนแผ่นเจลมีวงใส (clear zone) ในบริเวณที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (ลูกศรสีแดงในรูปที่ 3.6) และส่วนที่ไม่ใช่เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส จากผลการทดสอบนี้แสดงให้เห็นว่าการสลายของสีคองโกเรดมีการสลายโดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสร่วมกับกิจกรรมของเอนไซม์อื่น และเนื่องจากผลการทดลองนี้และข้อเสียของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่ทำงานร่วมกับ  $H_2O_2$  ซึ่งเป็นสารออกซิไดส์ที่รุนแรง และผลการทดลองรูปที่ 3.5 และ 3.6 พบกิจกรรมของเอนไซม์ร่วมด้วย และประสิทธิภาพของการใช้ และไม่ใช้  $H_2O_2$  ร่วมในการสลายสีย้อมไม่แตกต่างกันมากนัก จึงทำให้ผู้วิจัยดำเนินการศึกษาผลของอุณหภูมิและพีเอชต่อการสลายสีย้อมในรูปที่ไม่ใช้กิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส



รูปที่ 3.6 การศึกษาความสามารถในการสลายสีคองโกเรดของสารสกัดหยาบเปลือกแตงโม โดยห้วลูกศรสีแดงแสดงให้เห็นตำแหน่งของกิจกรรมเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และส่วนใส (clear zone) แสดงให้เห็นบริเวณที่มีการสลายสีคองโกเรด

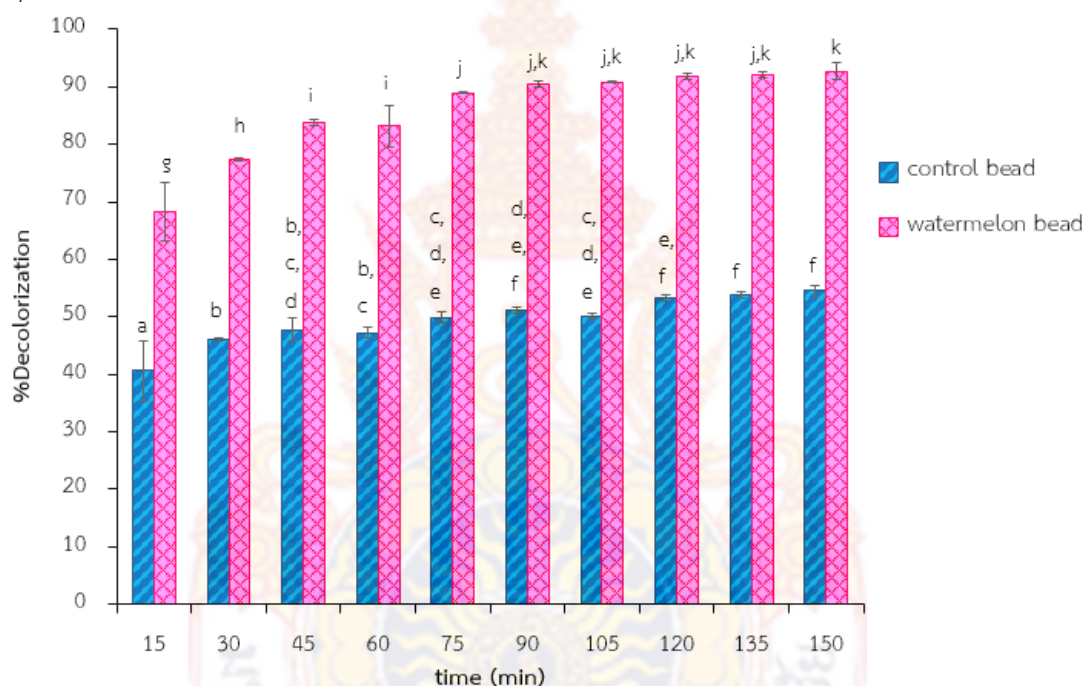
## 7. การศึกษาการสลายสีคองโกเรดของเม็ดบีดแตงโม

### 7.1 สารสกัดหยาบเปลือกแตงโมและเม็ดบีดที่ตรึงสารสกัดหยาบเปลือกแตงโม

หลังจากการทดลองในข้อที่ 6 และ 7 สารสกัดหยาบถูกเตรียมขึ้นมาใหม่ โดยการสกัดด้วยวิธีการเดิม โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ  $2,957.41 \pm 93.22$  U/ml และเตรียมเป็นเม็ดบีดโดยการไม่เจือจางสารสกัด ด้วยความเข้มข้นโซเดียมอัลจินเทที่ความเข้มข้น 1.3% w/v โดยมีขนาดของเม็ดบีดควบคุม และเม็ดบีดแตงโมเท่ากับ  $2.4 \pm 0.193$  และ  $2.3 \pm 0.207$  มิลลิเมตร ตามลำดับ

## 7.2 การทดสอบระยะเวลาที่เหมาะสมในการสลายสีของโกเรตของเม็ดบีทที่ตรึงสารสกัดหยาบเปลือกแตงโม

เม็ดบีทที่ตรึงสารสกัดหยาบเปลือกแตงโมและเม็ดบีทควบคุมถูกนำมาทดสอบการสลายสีย้อมที่เวลาต่าง ๆ (15 30 45 60 75 90 105 120 135 150 นาที) ด้วยการบ่มสีย้อมของโกเรตที่มีความเข้มแสงที่ความยาวคลื่น 498 นาโนเมตร มีค่าเท่ากับ  $1.000 \pm 0.200$  ผลการทดลองพบว่า เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเม็ดบีทควบคุมและเม็ดบีทแตงโมสามารถสลายสีย้อมได้เพิ่มขึ้น (รูปที่ 3.7) โดยเม็ดบีทแตงโมสามารถสลายสีย้อมได้ดีกว่าเม็ดบีทควบคุมในทุกเวลาที่ทดสอบ โดยสามารถสลายสีย้อมได้ดีที่สุดที่เวลา 150 นาที หรือ 2.5 ชั่วโมง



รูปที่ 3.7 ความสามารถในการสลายสีของโกเรตของเม็ดบีทแตงโมและเม็ดบีทควบคุมที่เวลาต่าง ๆ

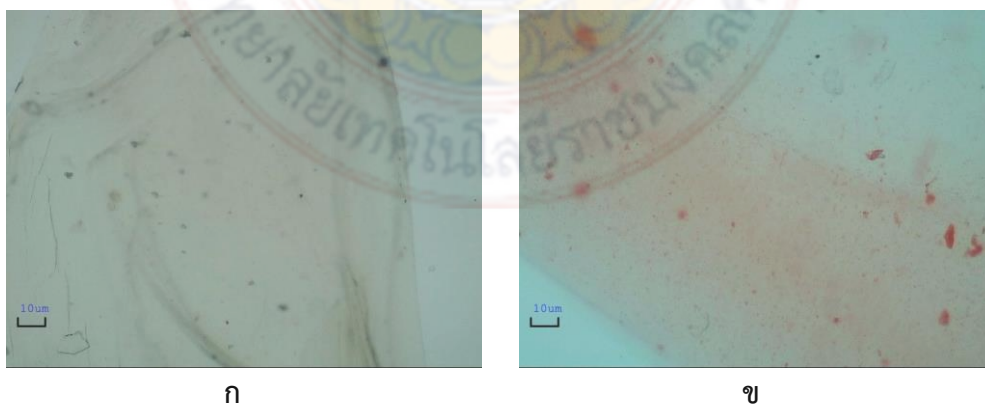
## 7.3 การศึกษาลักษณะการสลายสีของเม็ดบีท

เม็ดบีทถูกนำไปตัดขวาง แล้วศึกษาการติดสีย้อมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เม็ดบีทแตงโมมีความแตกต่างในการดูดซับสีได้มากกว่าเม็ดบีทควบคุม (รูปที่ 3.9) เมื่อศึกษาผลจากการสลายเปรียบเทียบระหว่างเม็ดบีทควบคุมและเม็ดบีทแตงโมพบว่า เม็ดบีทควบคุมมีความสามารถในการสลายสีย้อมด้วย เมื่อเม็ดบีทมีสารสกัดหยาบเปลือกแตงโมตรึงไว้ ทำให้เม็ดบีทมีความสามารถในการสลายสีย้อมเพิ่มมากขึ้น การสลายสีย้อมจึงมาจากการสลาย 2 ส่วน คือ มาจากการจับสีของเม็ดบีทและมาจากการสลายของสารสกัดหยาบเปลือกแตงโมซึ่งถูกตรึงไว้ในเม็ดบีท โดยการสลายสีของสารสกัดหยาบยังเป็นกลไกที่ยังไม่ทราบแน่ชัด เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังนำเม็ดบีทไปบ่มกับสี

ย้อมคองโกเรดที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 498 นาโนเมตร เท่ากับ  $1.000 \pm 0.200$  ที่บ่มเป็นเวลา 150 นาที พบว่า เม็ดบีทควบคุมติดสีอ่อน ๆ ส่วนเม็ดบีทแต่งโมติดสีคองโกเรดเข้มกว่าเม็ดบีทควบคุม เมื่อนำเม็ดบีทตัดขวางเป็นชิ้นบาง ๆ แล้วศึกษาผ่านกล้องจุลทรรศน์พบลักษณะการติดสีที่แตกต่างระหว่างบีทแต่งโมและบีทควบคุม โดยบีทควบคุมติดสีย้อมทั่วเม็ดบีท สีอ่อนกว่าบีทแต่งโม ส่วนบีทแต่งโม มีการติดสีเข้มลักษณะเป็นวงแหวนรอบเม็ดบีท ส่วนภายในไม่มีการติดสีเลย เมื่อมองด้วยตาเปล่า



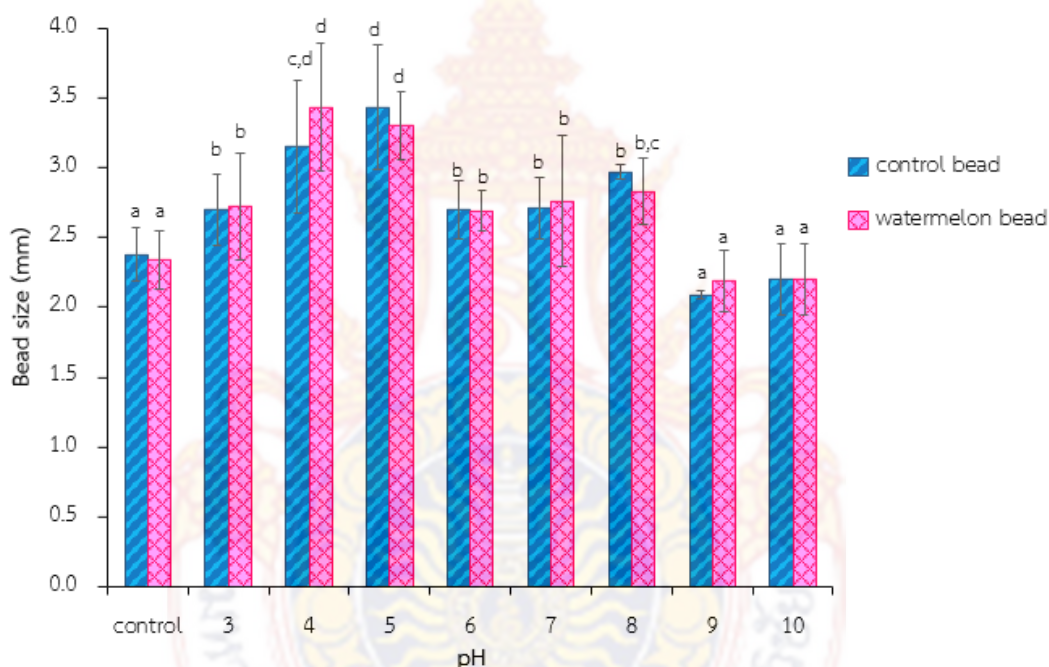
รูปที่ 3.8 เม็ดบีทแต่งโมและเม็ดบีทควบคุมก่อนและหลังการสลายสีคองโกเรดเป็นเวลา 150 นาที โดยที่ ก และ ข คือเม็ดบีทควบคุมและเม็ดบีทแต่งโมก่อนการสลายสี ค และ ง คือ เม็ดบีทควบคุมและเม็ดบีทแต่งโมหลังการสลายสีคองโกเรด ตามลำดับ



รูปที่ 3.9 เม็ดบีทภายใต้กล้องกำลังขยาย 10X โดยรูป ก-ข คือ เม็ดบีทควบคุม และเม็ดบีทแต่งโม ภายหลังการสลายสีย้อม ตามลำดับ

#### 7.4 ผลของพีเอชต่อขนาดของเม็ดบีด กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และความสามารถในการสลายสีคองโกเรด

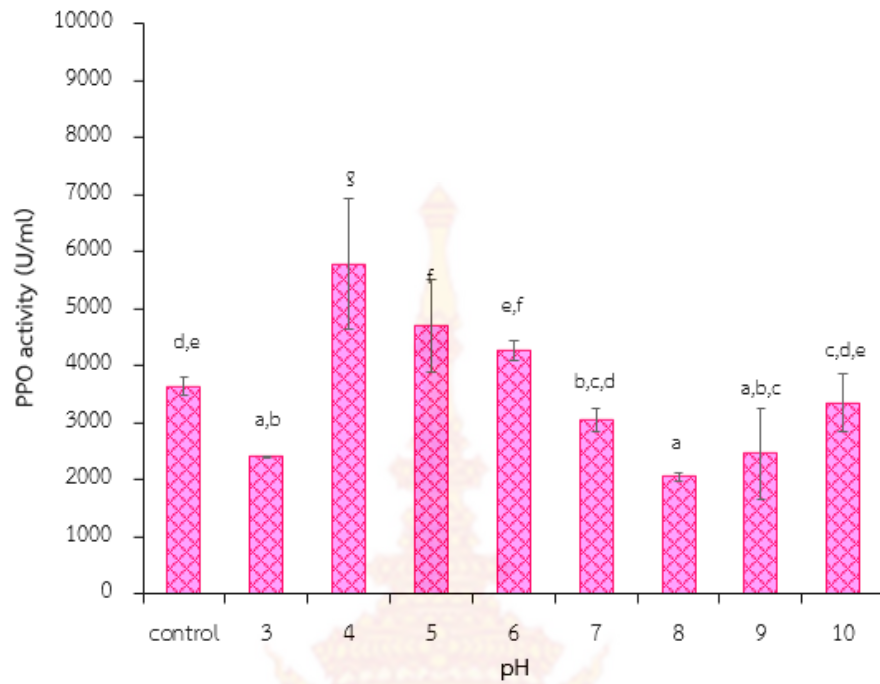
เม็ดบีดถูกนำมาศึกษาผลของพีเอช โดยการบ่มด้วยพีเอช 3-10 เป็นเวลานาน 30 นาที ก่อนนำมาศึกษาความสามารถในการสลายสีคองโกเรด เมื่อบ่มเม็ดบีดที่พีเอชต่าง ๆ พบว่า เม็ดบีดมีการเปลี่ยนแปลงขนาดไป (รูปที่ 3.10) โดยการเปลี่ยนแปลงขนาดเม็ดบีดคือ มีการพองตัวขยายขนาดขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้บ่มด้วยพีเอชใด ๆ โดยการเปลี่ยนแปลงขนาดของเม็ดบีดควบคุมและเม็ดบีดแดงโมที่พีเอช 5 มีการพองตัวมากที่สุด รองลงมาคือพีเอช 8 7 6 และ 3 ส่วนเม็ดบีดที่บ่มด้วยพีเอช 9 และ 10 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม



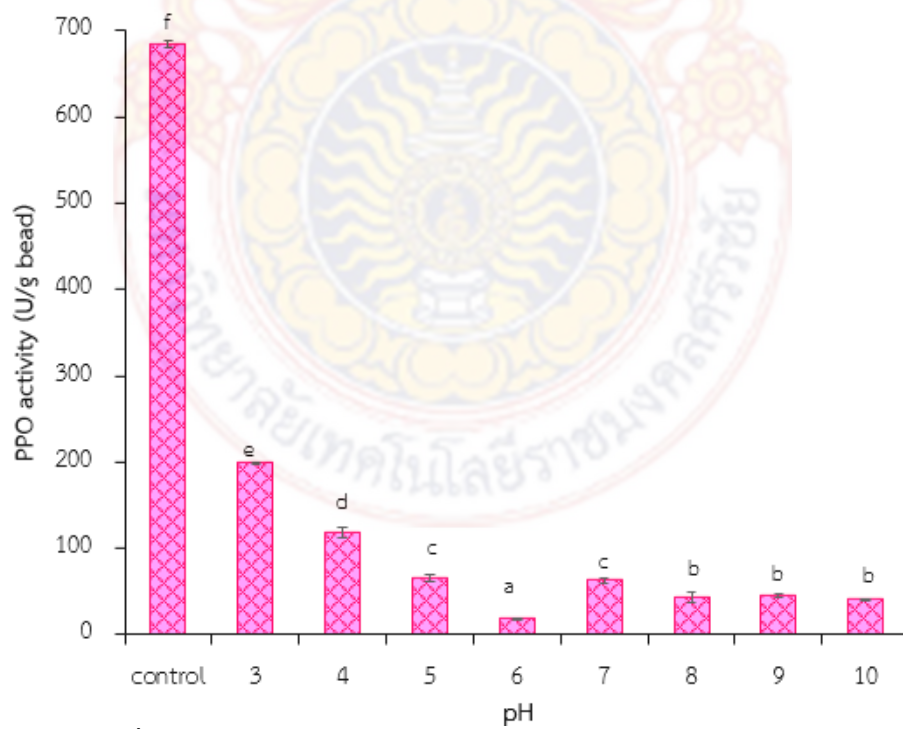
รูปที่ 3.10 ขนาดเม็ดบีดเมื่อบ่มด้วยพีเอชบัฟเฟอร์ที่เวลา 30 นาที

กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดหยาบ และในเม็ดบีดเมื่อบ่มที่พีเอชต่าง ๆ ผลการทดลองพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสมีการเปลี่ยนแปลงไปเมื่อบ่มด้วยพีเอชต่าง ๆ ทั้งในสารสกัดหยาบและในเม็ดบีดแดงโม (รูปที่ 3.11 และ รูปที่ 3.12) โดยมีแนวโน้มในแต่ละพีเอชระหว่างเม็ดบีดและสารสกัดหยาบแตกต่างกัน โดยค่าพีเอชที่สารสกัดหยาบมีกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสสูงที่สุด คือ พีเอช 4 รองลงมาคือ 5 6 ชุดควบคุม 10 7 9 3 และ 8 ตามลำดับ ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ในเม็ดบีดควบคุมพบว่าลดลงเมื่อบ่มเม็ดบีดที่บัฟเฟอร์พีเอชต่าง ๆ โดยมีค่ารองจากชุดควบคุมที่พีเอช 3 4 5 7 8 9 10 และ 6 ตามลำดับ





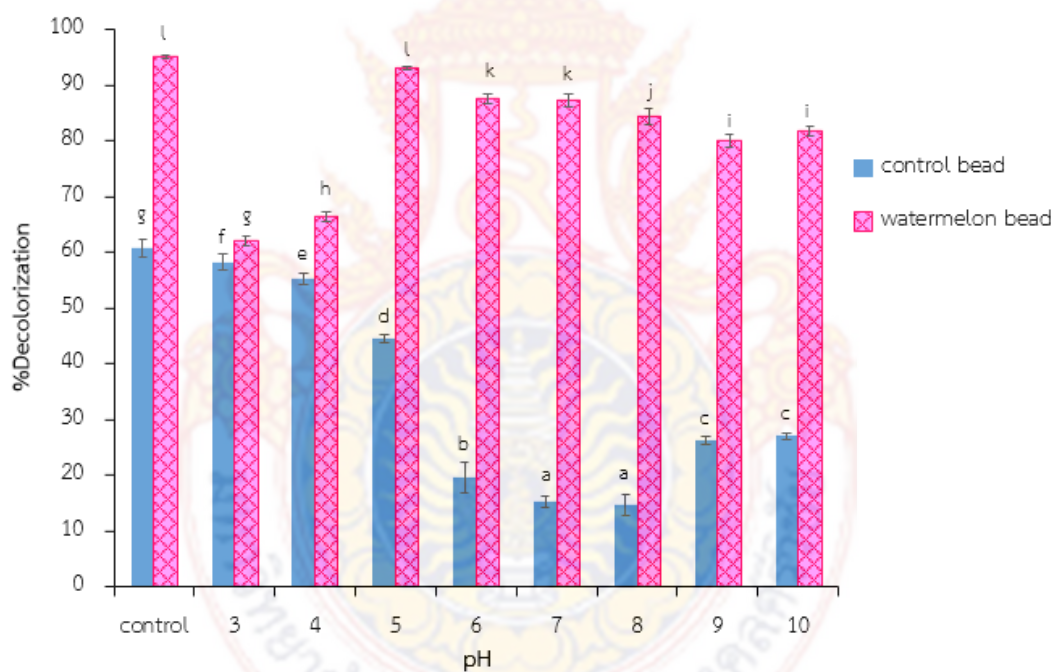
รูปที่ 3.11 กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดหยาบที่พีเอชต่าง ๆ



รูปที่ 3.12 กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในเม็ดบีดแห้ง



การสลายสีของเม็ดบีทควบคุมและเม็ดบีทแต่งโมเมื่อบ่มเม็ดบีทก่อนบ่มด้วยสีคองโกเรดที่พีเอชต่าง ๆ นาน 30 นาที พบว่า เม็ดบีทควบคุมมีการสลายสีย้อมลดลงเมื่อบ่มในบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชต่าง ๆ เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการบ่มที่พีเอชใด ๆ โดยมีความสามารถในการสลายสีย้อมน้อยที่สุดเมื่อบ่มด้วยบัฟเฟอร์พีเอช 7 รองลงมาคือ 8 6 9 10 5 4 3 และ ชุดควบคุม ตามลำดับ ในขณะที่เม็ดบีทแต่งโมมีความสามารถในการสลายสีย้อม ลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยเม็ดบีทที่พีเอช 5 มีความสามารถในการสลายสีคองโกเรด (มีค่า  $93.09 \pm 0.36$ ) ไม่แตกต่างกับชุดควบคุม ( $95.12 \pm 0.42$ ) เมื่อเทียบค่าเฉลี่ยด้วยความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อบ่มด้วยค่าพีเอชอื่นมีค่าลดลงตามลำดับ คือ 6 7 8 10 9 4 และ 3 ตามลำดับ โดยมีค่าเท่ากับ  $87.61 \pm 0.76$ ,  $87.39 \pm 1.16$ ,  $84.33 \pm 1.48$ ,  $81.82 \pm 0.87$ ,  $80.00 \pm 1.18$ ,  $66.39 \pm 0.87$  และ  $62.21 \pm 0.90$  ตามลำดับ

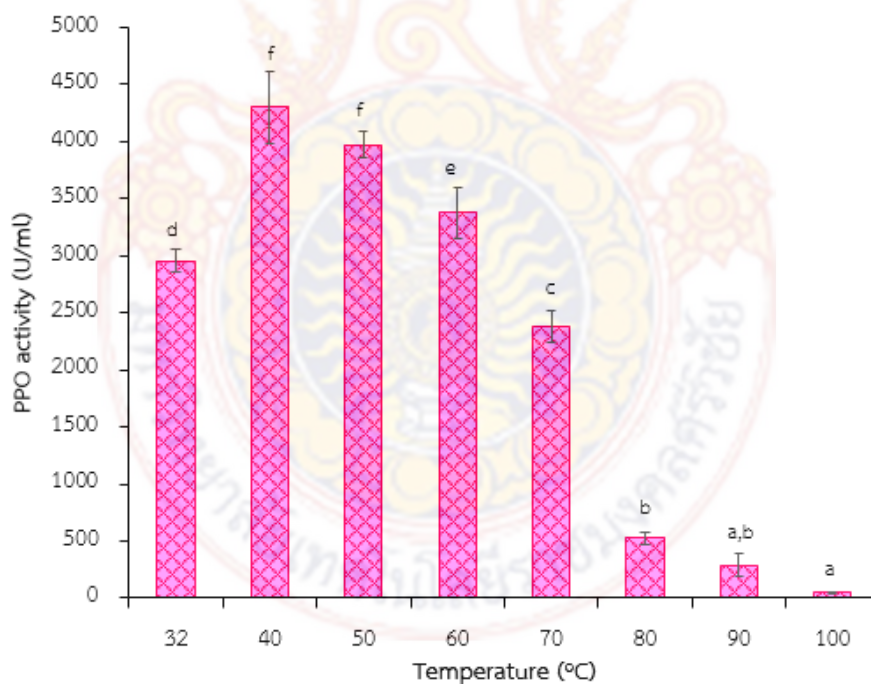


รูปที่ 3.13 การสลายสีของเม็ดบีทเมื่อบ่มด้วยพีเอชต่าง ๆ

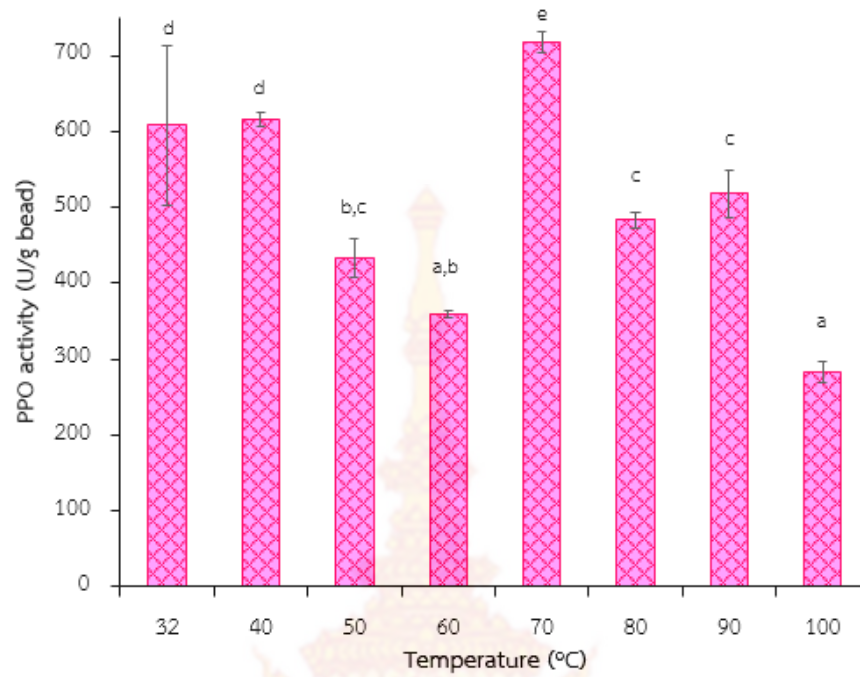
7.5 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส และความสามารถในการสลายสีคองโกเรด

ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสของสารสกัดหยาบ ซึ่งทำการบ่มสารสกัดหยาบที่อุณหภูมิต่าง ๆ (32 (อุณหภูมิห้อง), 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส) นาน 30 นาที ก่อนนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสพบว่า อุณหภูมิที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสสูงที่สุด คือ 40 องศาเซลเซียส รองลงมา คือ 50 60 32 70

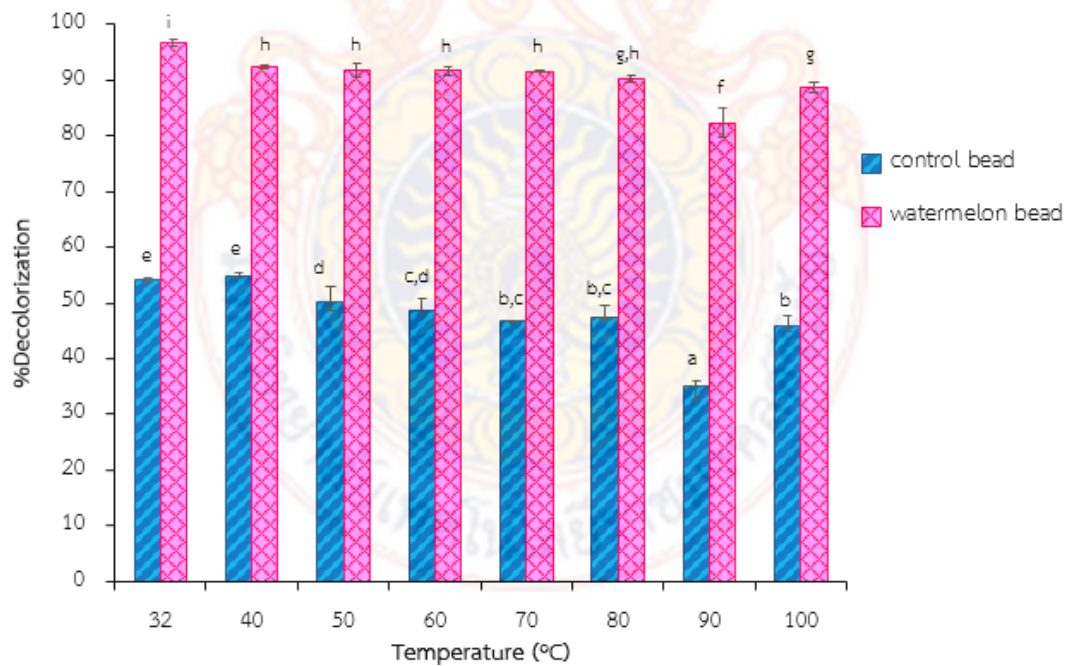
80 90 และ 100 ตามลำดับ โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ  $4,300.00 \pm 313.02$ ,  $3,969.44 \pm 115.83$ ,  $3,377.78 \pm 224.86$ ,  $2,957.41 \pm 93.22$ ,  $2,381.48 \pm 133.82$ ,  $528.70 \pm 55.39$ ,  $287.04 \pm 99.52$  และ  $46.30 \pm 5.24$  U/ml ตามลำดับ (รูปที่ 3.14) เมื่อนำเม็ดปืทไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 30 นาที แล้วทดสอบกิจกรรมเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสพบว่า มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส รองลงมาคือ 40 32 90 80 50 60 และ 100 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยมีค่าเท่ากับ  $717.33 \pm 13.20$ ,  $616.00 \pm 8.64$ ,  $608.67 \pm 105.15$ ,  $518.00 \pm 31.16$ ,  $483.33 \pm 10.87$ ,  $432.67 \pm 24.94$ ,  $360.00 \pm 4.90$  และ  $282.67 \pm 13.30$  U/g bead ตามลำดับ (รูปที่ 3.15) ส่วนผลการทดสอบการสลายสีย้อม (รูปที่ 3.16) พบว่าเม็ดปืทที่บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ มีความสามารถในการสลายสีคองโกเรดลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยมีความสามารถในการสลายสีย้อมในช่วงอุณหภูมิ 32-100 เท่ากับ  $92.34 \pm 0.32$ ,  $91.79 \pm 1.35$ ,  $91.64 \pm 0.90$ ,  $91.58 \pm 0.19$ ,  $90.33 \pm 0.55$ ,  $82.30 \pm 2.59$ ,  $88.72 \pm 0.96$  และ  $96.64 \pm 0.60\%$  ในขณะที่เม็ดปืทควบคุมสามารถสลายสีย้อมได้  $54.77 \pm 0.59$ ,  $50.09 \pm 2.81$ ,  $48.57 \pm 2.22$ ,  $46.75 \pm 0.19$ ,  $47.51 \pm 2.07$ ,  $35.16 \pm 0.98$ ,  $45.92 \pm 1.80$  และ  $54.29 \pm 0.16$  ตามลำดับ



รูปที่ 3.14 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดหยาบเปลือก  
แตงโม



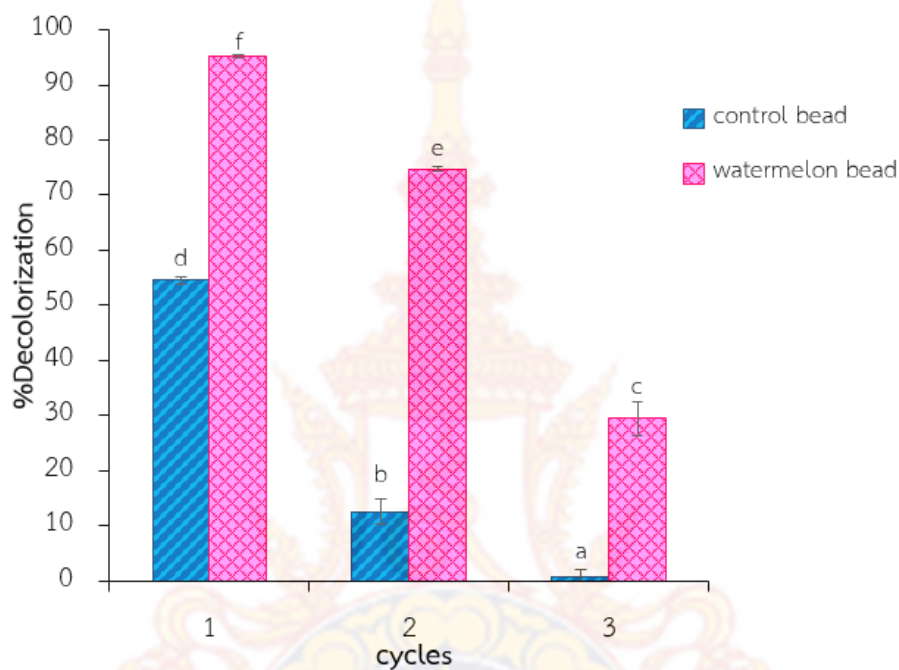
รูปที่ 3.15 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในเม็ดบีทแดงโม



รูปที่ 3.16 ผลของอุณหภูมิต่อการสลายสีของโกเรดของเม็ดบีท

## 7.6 การทดสอบความสามารถในการสลายสีของเม็ดบีท

การทดสอบความสามารถในการใช้ในการสลายสีย้อมซ้ำของเม็ดบีท โดยการนำเม็ดบีทสลายสีคองโกเรดเป็นเวลา 150 นาที แล้วนำเม็ดบีทแยกออกจากสารละลายสีย้อมที่สลาย นำไปสลายสีย้อมคองโกเรดอีกครั้ง เพื่อศึกษาความสามารถในการใช้ซ้ำพบว่า เม็ดบีทสามารถใช้งานได้เพียง 2 ครั้ง โดยการใช้งานครั้งแรกสามารถสลายสีคองโกเรดได้  $95.16 \pm 0.24$  เมื่อนำมาสลายซ้ำสามารถสลายสีได้  $74.79 \pm 0.32$  ส่วนครั้งที่สามสามารถสลายสีได้  $29.41 \pm 2.98$  %



รูปที่ 3.17 การสลายสีคองโกเรดซ้ำของเม็ดบีท

## บทที่ 4

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและโพลีฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดหยาบเปลือกแดงโสมสามารถตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตได้ที่ความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 50-100 และพบเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสและโพลีฟีนอลออกซิเดสมือน้อย 2 ไอโซไซม์ เมื่อตรึงสารสกัดหยาบเปลือกแดงโสมเป็นเม็ดบีดสามารถสลายสีย้อมได้ร้อยละ 91-96 และเม็ดบีดควบคุมสามารถสลายสีย้อมได้ร้อยละ 40-60 โดยเม็ดบีดที่ตรึงสารสกัดหยาบเปลือกแดงโสมสามารถสลายสี crystal violet, malachite green, bromophenol blue, methylene blue และ safranin-O ด้วยร้อยละการสลายสี  $98.01 \pm 0.13$ ,  $52.53 \pm 0.10$ ,  $34.48 \pm 0.10$ ,  $33.92 \pm 0.39$  และ  $25.85 \pm 0.20$  ตามลำดับ และการสลายสีโดยปราศจาก  $H_2O_2$  ของเม็ดบีดสามารถสลายสี bromothymol blue, crystal violet, malachite green และ congo red ได้ ด้วยร้อยละการสลายสีเท่ากับ  $74.24 \pm 0.35$ ,  $81.07 \pm 0.71$ ,  $84.58 \pm 0.23$  และ  $91.85 \pm 0.40$  ตามลำดับ โดยสามารถสลายสี congo red ได้ดี และเร็วที่สุดโดยใช้เวลาในการสลาย 2.5 ชั่วโมง เม็ดบีดยังมีความสามารถในการสลายสี congo red ได้หลังการบ่มด้วยพีเอชและอุณหภูมิในช่วงกว้าง โดยสามารถสลายสีได้ช่วงร้อยละ  $82.30 \pm 2.59$  -  $92.34 \pm 0.32$  แต่กิจกรรมของเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสในสารสกัดหยาบและในเม็ดบีดเปลี่ยนแปลงไปมาก และเม็ดบีดมีความสามารถในการใช้ซ้ำได้เพียง 2 รอบ โดยรอบที่ 2 มีร้อยละการสลายสี  $74.79 \pm 0.32$  จากการทดลองความสามารถในการสลายสีย้อมน่าจะมาจากการดูดซับสีของเม็ดบีดแคลเซียมอัลจิเนทและความสามารถในการสลายสีของสารสกัดหยาบโดยกิจกรรมของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และโพลีฟีนอลออกซิเดส สำหรับการระบุกลไกการสลายสีที่ชัดเจนของเม็ดบีดที่ตรึงสารสกัดหยาบเปลือกแดงโสมจำเป็นต้องทำการศึกษาต่อ รวมถึงการนำไปประยุกต์ในการสลายสีย้อมจำเป็นต้องปรับปรุงเม็ดบีดให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น



## บรรณานุกรม

- ธรรมศักดิ์ ศรีสุกใส การกำจัดสารประกอบฟีนอลในน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์มโดยใช้เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสจากใบยางพารา วิทยานิพนธ์ 2547.
- Almagro L., L. V. Go ´mez Ros, S. Belchi-Navarro, R. Bru, A. Ros Barcelo and M. A. Pedren. (2009). REVIEW PAPER Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany* 60 (2): 377–390.
- Bilal, M. and Asgher M. (2015). Dye decolorization and detoxification potential of Ca-alginate beads immobilized manganese peroxidase *BMC Biotechnology* 15: 111.
- Bradford, MM. (1976). A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Chanwun, T., Muhamad, N., Chirapongsatonkul, N. and Churngchow, N. Hevea brasiliensis cell suspension peroxidase: purification, characterization and application for dye decolorization. *AMB Express*. 2013, 3:14.
- Gajhede, M., Schuller, D.J., Henriksen, A., Smith, A.T. and Poulos, T.L. 1997. Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nature Structural Biology* 4: 1032-1038.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y. and Matsui, H. 2001. A large family of class III peroxidases. *Plant Cell Physiology* 42(5): 462-468.
- <https://th.wikipedia.org/wiki/แตงโม> (accessed 28/4/2018).
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.

- Maurícia B. Fritzen-Garcia, Fabíola F. Monteiro, Tatiane Cristofolini, José Javier S. Acuña, Betina G. Zanetti-Ramos, Inês Rosane W.Z. Oliveirae, Valdir Soldif, André A. Pasag. (2013). Characterization of horseradish peroxidase immobilized on PEGylated polyurethane nanoparticles and its application for dopamine detection. *Sensors and Actuators B* 182: 264– 272.
- Nandi, B.K., Goswami, A. and Purkait, M.K. 2009. Adsorption characteristics of brilliant green dye on kaolin. *Journal of Hazardous Materials* 161(1): 387-395.
- Odewunmi, N.A., Umoren, S.A. and Gasem Z.M. (2015). Utilization of watermelon rind extract as a green corrosion inhibitor for mild steel in acidic media. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 21: 239-247.
- Odewunmi, N.A., Umoren, S.A. and Gasem Z.M. (2015). Watermelon waste products as green corrosion inhibitors for mild steel in HCl solution. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 3 (1): 286-296.
- Prakash Marana J., Sivakumara, V, Thirugnanasambandhama, K. and Sridharb R. (2014). Microwave assisted extraction of pectin from waste *Citrullus lanatus* fruit rinds. *Carbohydrate Polymers* 101: 786– 791.
- Schuller, D.J., Ban, N., van Huystee, R.B. McPherson, A. and Poulos, T.L. 1996. The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure* 4: 311-321.
- Shannon ML, Kay E, Lew JY (1996) Peroxidase isozyme from horseradish root. *Journal of Biochem* 9: 2166–2172.
- Taranto, P, Pasqualone, A., Mangini, G., Tripodi, P., Miazzi, M.M., Pavan, S. and Montemurro, C. 2017. Polyphenol oxidase in crops: biochemical, physiological and genetic aspects. *International Journal Molecular Sciences* 18(337): 1-16.
- Tarazona-Díaz, M.P., Viegas, J., Moldao-Martins, M. and Aguayo, E. (2010). Bioactive compounds from flesh and by-product of fresh-cut watermelon cultivars. *Journal of the science of food and agriculture*. 91 (5): 805-812.

Welinder, K.G. 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology* 2(3): 388-393.

Zhanga, H., Zhang, J., Zhang, X. and Geng, A. (2018). Purification and characterization of a novel manganese peroxidase from white-rot fungus *Cerrena unicolor* BBP6 and its application in dye decolorization and denim bleaching. *Process Biochemistry* 66: 222–229



