

ผลของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสจากก้านกะหล่ำดอกต่อการกำจัดไดโคฟอล

Effects of Peroxidase Enzyme from Cauliflower Stems on Dicofol Removal

วรรณิกา ชัยประสพผล¹, โสภิตา ดวงจันทร์¹, สุพัฒน์พงษ์ มัตราช¹, วิภาดา เดชะปัญญา¹, เทียมมะณีรัตน์วีระพันธ์¹,
สมภพ สนองราษฎร์¹ และ กรรณิการ์ รัตนพงศ์เลขา^{1,*}

ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี เมืองศรีโค วารินชำราบ อุบลราชธานี 34190

Wannika Chiaprasobphon¹, Sopita Dongjan¹, Supatpong Mattaraj¹, Wipada Dechapanya¹, Tiammanee

Rattanaweerapan¹, Sompop Sanongraj¹ and Karnika Ratanapongleka^{1,*}

Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Ubon Ratchathani University, Mueang Si Khai, Warin
Chamrap, Ubonratchathani, 34190, Thailand

*Corresponding Author E-mail: karnika.r@ubu.ac.th

Received: Apr 08, 2022; Revised: Aug 10, 2022; Accepted: Aug 16, 2022

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการกำจัดไดโคฟอลโดยใช้เพอร์ออกซิเดสสกัดจากก้านกะหล่ำดอก สำหรับปัจจัยที่ส่งผลต่อการกำจัดไดโคฟอลที่ได้นำมาทดสอบ ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นไดโคฟอล ค่าพีเอชของสารละลาย อุณหภูมิ และความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไดโคฟอล ความเข้มข้นของเพอร์ออกซิเดส ค่าพีเอชของสารละลาย อุณหภูมิ และความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ จะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการกำจัดไดโคฟอล โดยสภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาครั้งนี้คือใช้เพอร์ออกซิเดสความเข้มข้น 0.126 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ไดโคฟอลที่ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด่างของสารละลายเท่ากับ 7 อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 1 มิลลิโมลาร์ สามารถกำจัดไดโคฟอลได้ 94% ที่เวลา 6 ชั่วโมง ผลข้างต้นถูกนำมาใช้คำนวณสัดส่วนปริมาณไดโคฟอลที่ถูกกำจัดต่อหน่วยของเพอร์ออกซิเดสพบว่าเพอร์ออกซิเดส 1 ยูนิต สามารถกำจัดไดโคฟอลได้ 0.104 มิลลิกรัม ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสมีประสิทธิภาพในการกำจัดไดโคฟอลและสามารถนำผลการศึกษานี้ไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์ใช้ต่อไปได้

คำสำคัญ: เพอร์ออกซิเดส, ไดโคฟอล, ก้านกะหล่ำดอก, ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์, เอนไซม์

Abstract

This research aims to investigate dicofol removal by peroxidase extracted from cauliflower stem. The factors affecting dicofol removal such as concentration of the enzyme, dicofol concentration, pH value of the solution, temperature and concentration of hydrogen peroxide were tested. The results showed that changing in the enzyme concentration, the concentration of dicofol, the pH value of the solution, the temperature and the concentration of hydrogen peroxide affected the efficiency of dicofol removal. The optimum condition for removal in this study was peroxidase concentration 0.126 U/mL, dicofol 1 mg/L, the pH of the solution at 7, 30 °C and 1 mM hydrogen peroxide. The efficiency of dicofol removal was 94% at 6 h. The above results were used to calculate the amount of dicofol removed per unit of peroxidase and found

that 1 unit of peroxidase was able to remove 0.104 mg of dicofol. Therefore, it can be concluded that peroxidase is effective in removing dicofol and the results of this study can be used as a fundamental data for further application.

Keywords: Peroxidase, Dicofol, Cauliflower Stem, Hydrogen Peroxide, Enzyme

1. บทนำ

ไดโคฟอล (Dicofol) หรือเรียกว่า 2,2,2-trichloro-1,1 bis (4-chlorophenyl) ethanol เป็นสารกำจัดศัตรูพืชพวกหนอน เฟล็ก และแมลงต่าง ๆ นิยมนำมาใช้กับผลไม้ตระกูลส้ม พืชสวน หลากชนิด ใบชา รวมถึงไม้ดอกและไม้ประดับ [1],[2] ไดโคฟอลจัดอยู่ในกลุ่มออร์กาโนคลอรีน มีส่วนประกอบของ ไฮโดรเจน คาร์บอน ออกซิเจน และคลอรีน [3] ถึงแม้ว่าสารชนิดนี้จะเป็นพิษเฉียบพลันต่อสิ่งมีชีวิตต่ำแต่สามารถตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้เป็นเวลานานและถูกดูดซับกับอนุภาคดินได้ดี เมื่อหน้าดินถูกชะด้วยน้ำจะทำให้เกิดการปนเปื้อนในแหล่งน้ำและอาจพบการสะสมของไดโคฟอลในชั้นไขมันของสัตว์น้ำเนื่องจากมีคุณสมบัติละลายได้ดีในไขมัน การสะสมของสารนี้ในสิ่งแวดล้อมสามารถส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันในสิ่งมีชีวิตและสุขภาพของมนุษย์ การทำงานของต่อมไร้ท่อ ทำลายระบบประสาท และก่อให้เกิดมะเร็ง [4-6] การลดความเป็นพิษและผลกระทบของไดโคฟอลจึงมีความสำคัญ

การฟื้นฟูและปรับสภาพดินและแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในพื้นที่การเกษตรโดยใช้วิธีการทางชีวภาพทำให้สภาพแวดล้อมเกิดการฟื้นตัวมีหลายวิธีด้วยกัน เช่น การใช้จุลินทรีย์พวกแบคทีเรีย [7] เชื้อรา [8],[9] และจุลินทรีย์สาหร่าย [10] ในการฟื้นฟูสภาพแวดล้อม และสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชที่ปลูกได้ พร้อมทั้งสามารถลดความเป็นพิษและโทษที่เกิดจากการตกค้างของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในสิ่งแวดล้อมและเป็นผลดีในเชิงเศรษฐศาสตร์ เพราะวิธีทางชีวภาพเป็นวิธีการย่อยสลายสารพิษที่มีราคาถูกปลอดภัยและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม แต่การใช้จุลินทรีย์นี้จะต้องทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนได้และจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีประสิทธิภาพการทำงาน สภาพแวดล้อมการเจริญที่แตกต่างกัน จึงทำให้เกิดความยุ่งยาก ซับซ้อน และมีค่าใช้จ่ายค่อนข้าง

สูงในขั้นตอนการคัดเลือกเพื่อจะได้จุลินทรีย์ที่ต้องการมาใช้ในวิธีดังกล่าว

อย่างไรก็ตามนอกจากกระบวนการทางชีวภาพที่ใช้จุลินทรีย์แล้ว การใช้เอนไซม์ซึ่งเป็นตัวเร่งทางชีวภาพ โดยเฉพาะเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส กลุ่มออกซิโดรีดักเทส และกลุ่มทรานสเฟอเรส พบว่าสามารถนำมาย่อยสลายสารพิษในธรรมชาติได้เป็นอย่างดี [11] การใช้เอนไซม์จึงถูกจัดเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าจะนำมาใช้ในการกำจัดสารดังกล่าวได้นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีคุณสมบัติที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้น เกิดปฏิกิริยาได้รวดเร็ว ไม่เกิดปฏิกิริยารุนแรงง่ายต่อการจัดการ และไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และจากการค้นคว้าพบว่าเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (Peroxidase) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มออกซิโดรีดักเทส สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน และออกซิไดซ์ซับสเตรทที่ให้อิเล็กตรอนได้หลายชนิดทั้งในกลุ่มสารประกอบอินทรีย์และสารประกอบอนินทรีย์ [12] จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีการนำเพอร์ออกซิเดสไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายทั้งในทางการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหาร เกษตรกรรม และการบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรม [13],[14] แต่ยังไม่พบว่ามีงานวิจัยใดนำเพอร์ออกซิเดสไปใช้กับสารกำจัดศัตรูพืชชนิดไดโคฟอล ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีแนวคิดที่จะทดสอบผลของเพอร์ออกซิเดสที่มีต่อการกำจัดไดโคฟอล

เพอร์ออกซิเดสถูกพบในสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิดทั้งในสัตว์พืช และจุลินทรีย์ [13] เพอร์ออกซิเดสที่สกัดได้จากพืชฮอระดิส (Horseradish) นิยมใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบันเนื่องจากลักษณะสมบัติและการทำงานที่ดี แต่หากต้องนำมาใช้งานในปริมาณมากในประเทศไทยอาจไม่เหมาะสมเนื่องจากมีราคาสูงและต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เพอร์ออกซิเดสที่สกัดจากก้านกะหล่ำดอก เนื่องจากเป็นพืชที่หาได้ง่ายและเป็นการนำของเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์เนื่องจากก้านกะหล่ำเป็นส่วนที่

ไม่นิยมนำมาบริโภค โดยวัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้คือเพื่อศึกษาการกำจัดไดโคพอลด้วยเพอร์ออกซิเดสแบบหยาบ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเพอร์ออกซิเดส ความเข้มข้นของไดโคพอล ค่าความเป็นกรดต่างของสารละลาย อุณหภูมิและความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์

2. ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ เช่น สารไดโคพอลบริสุทธิ์ ($C_{14}H_9Cl_5O$) เมทานอล (Methanol, CH_3OH) (เกรดสำหรับวิเคราะห์ HPLC $\geq 99.9\%$) และสารวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ กัวไอเอคอล (Guaiacol, $C_7H_8O_2$) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide, H_2O_2) จากบริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา ส่วนสารเคมีที่ใช้เตรียมบัฟเฟอร์จากบริษัท AppliChem ประเทศเยอรมัน

2.2 การเตรียมเพอร์ออกซิเดสหยาบ

แหล่งของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่ใช้ในการศึกษานี้ได้จากก้านของกะหล่ำดอก ประเภทสายพันธุ์เบา ซึ่งนิยมปลูกและบริโภคในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย การเตรียมเอนไซม์ทำโดยนำก้านกะหล่ำดอก 1000 กรัม มาล้างด้วยน้ำสะอาด ตัดเป็นชิ้นเล็กนำไปผ่านเครื่องสกัดน้ำผลไม้แบบแยกกากและกรองด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนที่เป็นของเหลวไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเศษตะกอนอีกครั้ง ส่วนใสที่ได้คือเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสหยาบ เมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ 0.126 หน่วยต่อมิลลิลิตร เอนไซม์สกัดที่ได้ถูกนำไปแช่แข็งเพื่อรักษาเสถียรภาพการทำงานของเอนไซม์ให้มีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุดที่อุณหภูมิ -20 ± 3 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป และก่อนทำการทดลองจะมีการตรวจสอบค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เริ่มต้นทุกครั้ง

2.3 การกำจัดไดโคพอลด้วยเพอร์ออกซิเดสในชุดทดลองแบบเบดซ์

การศึกษาการกำจัดไดโคพอลด้วยเพอร์ออกซิเดสในชุดทดลองแบบเบดซ์ทำการทดลองในขวดรูปชมพู่ขนาด 500

มิลลิลิตร โดยเติมสารละลายไดโคพอล 280 มิลลิลิตร และเอนไซม์ 20 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างในแต่ละชุดการทดลองที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง โดยผลการทดลองที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ยที่เกิดจากการทำชุดทดลอง 2 ชุด มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากค่ากลางน้อยกว่าร้อยละ 10 สำหรับปัจจัยที่ศึกษาประกอบด้วยความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นของไดโคพอล ค่าพีเอชของสารละลาย อุณหภูมิ และเข้มข้นไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ทำการศึกษาแต่ละปัจจัยตามลำดับ โดยนำผลการศึกษาที่ดีที่สุดในปัจจัยนั้นมาใช้สำหรับทดลองปัจจัยถัดไป สำหรับรายละเอียดวิธีการศึกษาแต่ละปัจจัยมีดังนี้

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.014, 0.030, 0.060 และ 0.126 หน่วยต่อมิลลิลิตรโดยใช้สารละลายไดโคพอล 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าพีเอชของสารละลายเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 1 มิลลิโมลาร์ และมีการเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้เอนไซม์เสื่อมสภาพการทำงาน

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณไดโคพอลในสารละลายที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้เพอร์ออกซิเดสความเข้มข้น 0.126 หน่วยต่อมิลลิลิตร ค่าพีเอชของสารละลายเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 1 มิลลิโมลาร์

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของสารละลายไดโคพอล 5–9 โดยที่พีเอช 5 ใช้อะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 6–7 ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และพีเอช 8–9 ใช้ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้นเพอร์ออกซิเดสควบคุมที่ 0.126 หน่วยต่อมิลลิลิตร ปริมาณไดโคพอล 1 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 1 มิลลิโมลาร์

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วง 20–60 องศาเซลเซียส และการศึกษาความเข้มข้นไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 0.25–1.50 มิลลิโมลาร์ ใช้เพอร์ออกซิเดสความเข้มข้น 0.126 หน่วยต่อมิลลิลิตร ปริมาณไดโคพอล 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าพีเอชของสารละลายเท่ากับ 7

2.4 การตรวจวิเคราะห์โคโคพอลและกิจกรรมการทำงานของเพอร์ออกซิเดส

การวิเคราะห์ปริมาณโคโคพอลด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography, HPLC) (VP 10AVP, Shimadzu, Japan) โดยใช้คอลัมน์ C18 (7.8 × 300 มิลลิเมตร) และเครื่องตรวจจับชนิดยูวี (UV detector) ที่ความยาวคลื่น 229 นาโนเมตร ตามวิธีของ Qiu et al., [15] โดยละลายโคโคพอลด้วยเมทานอลเฟสเคลื่อนที่ (Mobile phase) ที่ใช้คือเมทานอลต่อน้ำปราศจากประจุอัตราส่วน 80:20 โดยปริมาตร อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ 20 ไมโครลิตร อุณหภูมิที่สภาวะการวิเคราะห์ 28 ± 3 องศาเซลเซียส

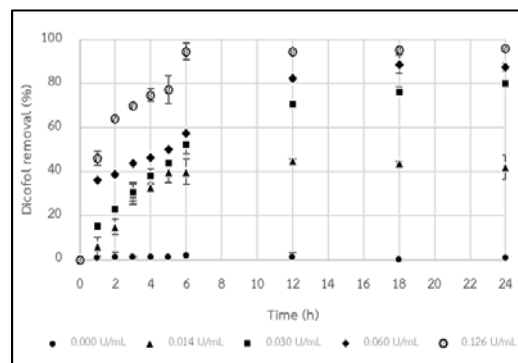
การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเพอร์ออกซิเดสตามวิธีของ Lakshmi [16] โดยนำเอนไซม์สกัดมาทำปฏิกิริยากับ 18 มิลลิโมลาร์ ถั่วไอเอคอลลซึ่งเป็นสารสับสเตรทร่วมกับร้อยละ 0.05 ของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ วัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องยูวี-วิสสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Ultraviolet-visible spectroscopy) (UV 1204, Shimadzu, Japan) ที่ความยาวคลื่น 436 นาโนเมตร โดยกำหนดให้ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เพอร์ออกซิเดส 1 หน่วย หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้เร่งการเปลี่ยน 1 ไมโครโมลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดสอบ

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

3.1 ผลของความเข้มข้นเพอร์ออกซิเดสต่อโคโคพอล

เอนไซม์เพอร์ออกซิเดสที่สกัดจากถั่วลิสงสำหรับการทดลองนี้มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 0.126 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อนำเอนไซม์ดังกล่าวมาทำการเจือจางที่ระดับต่างกันได้ความเข้มข้นในช่วง 0.014–0.126 หน่วยต่อมิลลิลิตร และทำปฏิกิริยากับโคโคพอล ผลการศึกษา (รูปที่ 1) พบว่าการกำจัดโคโคพอลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการทำปฏิกิริยามากขึ้น โดยเพอร์ออกซิเดสที่ 0.126 หน่วยต่อมิลลิลิตร สามารถกำจัดโคโคพอลได้อย่างรวดเร็วในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการทำปฏิกิริยา หลังจากนั้นค่าการกำจัดมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย และเมื่อทำปฏิกิริยาจนครบ 24 ชั่วโมง สามารถกำจัดโคโคพอลได้ร้อยละ 94 สำหรับความ

เข้มข้นของเพอร์ออกซิเดสที่ 0.030 และ 0.060 หน่วยต่อมิลลิลิตรสามารถกำจัดโคโคพอลได้อย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการทำปฏิกิริยา หลังจากนั้นค่าการกำจัดยังคงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ และเมื่อทำปฏิกิริยาจนครบ 24 ชั่วโมง สามารถกำจัดโคโคพอลได้ในช่วงร้อยละ 80 และ 88 ตามลำดับ ในขณะที่เพอร์ออกซิเดส 0.014 หน่วยต่อมิลลิลิตรให้ค่าการกำจัดลดลงเพียงเล็กน้อยหลัง 12 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ใช้เอนไซม์ที่ถูกทำให้เสื่อมสภาพ โดยก่อนการทดลองนำเอนไซม์ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที) พบว่าความเข้มข้นของโคโคพอลไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเวลาในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น

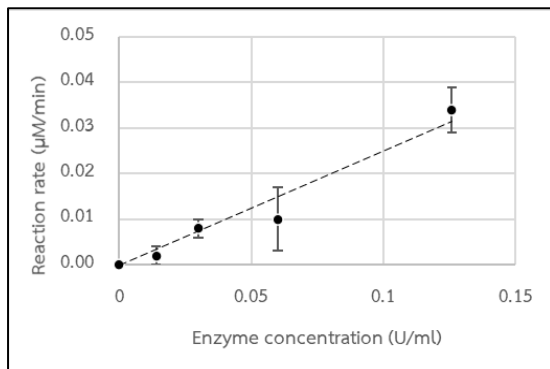


รูปที่ 1 การกำจัดโคโคพอลเมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเพอร์ออกซิเดส

จากผลการศึกษาข้างต้นอภิปรายได้ว่าการใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมหรือมีความเข้มข้นที่มากพอจะสามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้มาก แต่เมื่อเอนไซม์ลดลงความสามารถในการจับกับสารตั้งต้นจะน้อยลง การเกิดปฏิกิริยาลงไปด้วย ส่วนในบางกรณีที่ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยามากขึ้นแต่ผลการทำงานของเอนไซม์ลดลงอาจเป็นผลมาจากเสถียรภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลงเนื่องจากการเสื่อมสภาพของเอนไซม์ ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ที่มีต่อการทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นและมีทิศทางที่สอดคล้องกับงานวิจัยนี้คือ การใช้เพอร์ออกซิเดสจากถั่วลิสงความเข้มข้น 0.05–0.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร ถูกนำไปใช้กำจัดสีแอนทราควิโนน พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ที่ 0.05–0.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทำให้แนวโน้มการกำจัดเพิ่มขึ้นเมื่อเอนไซม์เพิ่มขึ้น และให้ค่าการกำจัดที่ดีที่สุด

ร้อยละ 88.39 แต่เมื่อเพิ่มเอนไซม์ที่ 0.4-0.6 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร พบว่าการกำจัดที่เกิดขึ้นลดลงเล็กน้อย [17]

เมื่อพิจารณาถึงอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารเทียบกับเวลา (รูปที่ 2) พบว่าอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาแปรผัน โดยตรงกับการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์

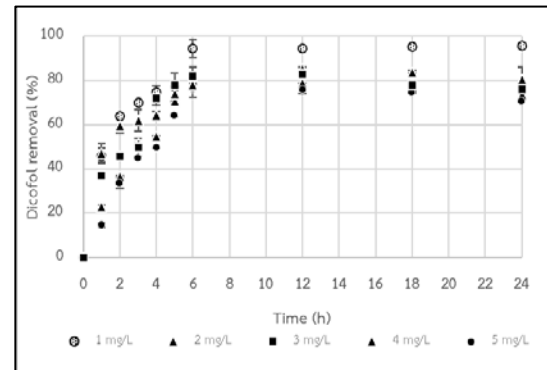


รูปที่ 2 ผลของความเข้มข้นเพอร์ออกซิเดสต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา

3.2 ผลของความเข้มข้นไดโคพอล

การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นไดโคพอลส่งผลต่อการกำจัดไดโคพอลด้วยเพอร์ออกซิเดส (รูปที่ 3) ความเข้มข้นของไดโคพอลที่เพิ่มขึ้นทำให้แนวโน้มการกำจัดลดลง ไดโคพอลที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าการกำจัดที่ดีที่สุดร้อยละ 94 ที่เวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นแนวโน้มการกำจัดจะเริ่มคงที่ ส่วนความเข้มข้นของไดโคพอลที่มากกว่า 1 มิลลิกรัมต่อลิตร การกำจัดเกิดได้ดีที่สุดที่เวลา 12 ชั่วโมง โดยพบว่าไดโคพอลที่ความเข้มข้น 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าร้อยละการกำจัดเท่ากับ 85, 83, 78 และ 76 ตามลำดับ จะเห็นว่าการเพิ่มความเข้มข้นไดโคพอลส่งผลให้การกำจัดเกิดได้ช้าลง ซึ่งอาจเกิดจากความเข้มข้นของเพอร์ออกซิเดสที่มีอยู่ในระบบมีไม่เพียงพอต่อการเข้าทำปฏิกิริยากับไดโคพอลที่เพิ่มขึ้น หรืออาจเกิดจากสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นหลังการทำปฏิกิริยาระหว่างเพอร์ออกซิเดสกับไดโคพอลไปขัดขวางการทำงานของเพอร์ออกซิเดส ทำให้ไม่สามารถจับกับไดโคพอลได้ดีเหมือนเดิม และเมื่อนำข้อมูลความเข้มข้นที่ลดลงของไดโคพอลมาคำนวณหาอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาพบว่ามีค่าต่างกันไม่มาก (อยู่

ในช่วง 0.034–0.054 ไมโครโมลาร์ต่อนาที) เนื่องจากความเข้มข้นของไดโคพอลที่ใช้แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย จึงทำให้มีข้อมูลไม่เพียงพอที่จะใช้ในการคำนวณหาอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาสูงสุด (V_{max}) และค่าคงที่ของมิเคลลิส-เมนเทน (K_m) ได้

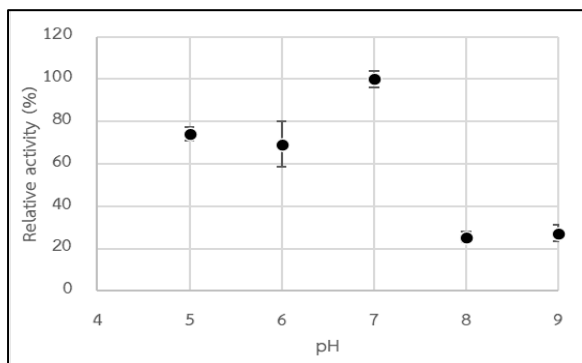


รูปที่ 3 การกำจัดไดโคพอลเมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไดโคพอล

3.3 ผลของความเป็นกรดต่างของสารละลายไดโคพอล

ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อม การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของสารละลายไดโคพอลส่งผลต่อการทำปฏิกิริยากับเพอร์ออกซิเดส และจากการศึกษาคุณลักษณะทั่วไปของเพอร์ออกซิเดสจากแหล่งต่างกันและทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นต่างชนิดพบว่าสามารถทำงานได้ดีที่ค่าพีเอชของสารละลายต่างกัน เช่น ค่าพีเอชที่เหมาะสมของเพอร์ออกซิเดสจากมะระขึ้นกับเท่ากับ 5 [18] จากผักกาดหัวสีแดงเท่ากับ 7 [19] จากจมูกข้าวสาลีอยู่ในช่วง 5.3–6.3 [20] และจากถั่วฝักยาวเท่ากับ 5 [21] จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นว่าเพอร์ออกซิเดสทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 5–7 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกช่วงดังกล่าวมาทดสอบการทำงานของเพอร์ออกซิเดส กับ สารละลายไดโคพอล ผลการศึกษาแสดงในรูปของกิจกรรมการทำงานสัมพัทธ์ของเอนไซม์กับค่าพีเอช (รูปที่ 4) โดยที่พีเอช 7 มีค่ากิจกรรมการทำงานสัมพัทธ์อยู่ที่ร้อยละ 100 สำหรับที่พีเอช 5 และ 6 มีค่ากิจกรรมการทำงานสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 74 และ 70 ตามลำดับ และพบค่ากิจกรรมการทำงานสัมพัทธ์ลดลงอย่างรวดเร็ว (ต่ำกว่าร้อยละ 30) เมื่อสารละลายมีพีเอชสูงกว่า 7 จากผลการศึกษานี้กล่าวได้

ว่าเพอร์ออกซิเดสสามารถทำปฏิกิริยากับไดโคพอลได้ดีที่สุดที่พีเอชของสารละลายเท่ากับ 7 เมื่อเพิ่มหรือลดค่าพีเอชส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง เนื่องจากเอนไซม์จะจับกับสารตั้งต้นที่บริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ ความสามารถในการจับกันและการเร่งปฏิกิริยาจะขึ้นกับความสมดุลของประจุที่บริเวณเร่งรวมถึงประจุของสารตั้งต้นที่เข้าทำปฏิกิริยด้วย ดังนั้นเมื่อเอนไซม์อยู่ในสารละลายที่มีค่าพีเอชสูงหรือต่ำกว่าค่าพีเอชของเอนไซม์ชนิดนั้นจะส่งผลให้ประจุของเอนไซม์ที่บริเวณเร่งเกิดการเปลี่ยนแปลง จนสารตั้งต้นไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้ หรืออาจทำปฏิกิริยาได้น้อยลง นอกจากนี้ค่าพีเอชที่สูงมากหรือต่ำมากอาจส่งผลต่อโครงสร้างของเอนไซม์ทำให้เกิดการเสียสภาพการทำงานได้

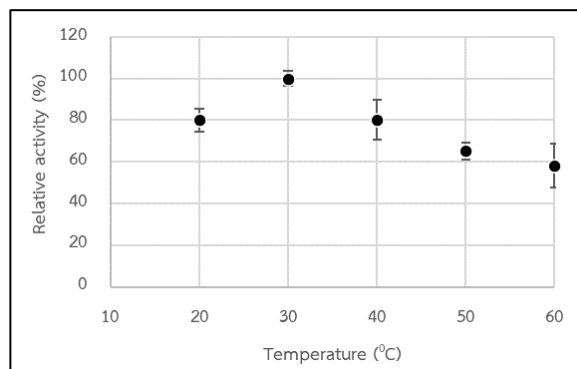


รูปที่ 4 ค่ากิจกรรมการทำงานสัมพัทธ์ของเพอร์ออกซิเดสกับค่าพีเอช

3.4 ผลของอุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเพอร์ออกซิเดส ร่วมกับไดโคพอล (รูปที่ 5) ถูกนำเสนอในรูปแบบของค่ากิจกรรมการทำงานสัมพัทธ์ซึ่งคำนวณได้จากร้อยละของค่าการกำจัดไดโคพอลที่เกิดขึ้นของแต่ละอุณหภูมิเทียบกับการกำจัดที่เกิดขึ้นที่อุณหภูมิที่ดีที่สุด ผลการศึกษพบว่าอุณหภูมิในช่วง 20-30 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมการทำงานสัมพัทธ์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และมีค่าสูงสุดที่ 30 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการกำจัดไดโคพอลคือ 30 องศาเซลเซียส เมื่อนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้งานที่อุณหภูมิแตกต่างจากนี้ (20-60 องศาเซลเซียส) จะทำให้

สามารถทราบได้ว่าการทำงานของเอนไซม์ต่อการกำจัดไดโคพอลจะลดลงเล็กน้อยเพียงใดเมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และในผลการศึกษาจะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจากจุดนี้ไปส่งผลให้ความสามารถในการทำปฏิกิริยาลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งในการเกิดปฏิกิริยาโดยทั่วไปการเพิ่มอุณหภูมิจะช่วยให้โมเลกุลของสารในปฏิกิริยานั้นเกิดการเคลื่อนที่และชนกันมากขึ้น ปฏิกิริยาจึงเกิดได้ดีขึ้น แต่เนื่องจากเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพซึ่งมีคุณสมบัติเหมือนโปรตีน การเพิ่มอุณหภูมิที่สูงขึ้นอาจทำให้เกิดปฏิกิริยาได้น้อยลงเนื่องจากโครงสร้างของเอนไซม์ถูกทำให้เปลี่ยนสภาพไป ส่งผลให้สารตั้งต้นอาจเข้าจับกับเอนไซม์ได้น้อยลงหรืออาจเข้าจับไม่ได้เลยหากเกิดการเสียสภาพของเอนไซม์ (enzyme denaturation)

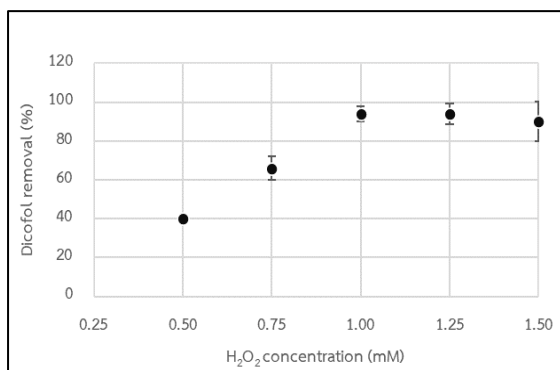


รูปที่ 5 ค่ากิจกรรมการทำงานสัมพัทธ์ของเพอร์ออกซิเดสกับอุณหภูมิ

3.5 ผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์

ผลการศึกษาค่าการกำจัดไดโคพอลด้วยเพอร์ออกซิเดส เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ที่ 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 และ 1.50 มิลลิโมลาร์ แสดงในรูปที่ 6 การเพิ่มความเข้มข้นไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ จาก 0.50 มิลลิโมลาร์ ถึง 1.00 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้ค่าการกำจัดไดโคพอลมีแนวโน้มสูงขึ้น และที่ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 1.00 มิลลิโมลาร์ และ 1.25 มิลลิโมลาร์ จะให้ค่าการกำจัดไดโคพอลสูงสุดและมีค่าเท่ากันคือร้อยละ 94 ส่วนที่ความเข้มข้น 1.50 มิลลิโมลาร์ พบว่าค่าการกำจัดลดลงเหลือร้อยละ 90 สำหรับชุดควบคุม (ไม่เติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ในปฏิกิริยา) พบว่าไม่สามารถ

กำจัดไดโคฟอลได้ จากผลการศึกษานี้สามารถอธิบายได้ว่า ปกติแล้วไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จะทำให้เกิด $\text{OH}^\cdot$ ขึ้น โดย $\text{OH}^\cdot$ ที่เกิดขึ้นจะไปทำปฏิกิริยากับไดโคฟอลและมีเปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้ความเข้มข้นของไดโคฟอลลดลง ปกติแล้วเปอร์ออกซิเดสจะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) และออกซิไดส์สับสเตรทที่ให้อิเล็กตรอน แต่ถ้าความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มากเกินไป จะทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำปฏิกิริยากับ $\text{OH}^\cdot$ เกิดเป็นน้ำและสารผลิตภัณฑ์อื่น ($\text{HO}_2^\cdot$) ส่งผลให้ความเข้มข้นของ $\text{OH}^\cdot$ ลดลง การไปทำปฏิกิริยากับไดโคฟอลจึงลดลง ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกำจัดลดลงไปด้วย จึงกล่าวได้ว่าการเลือกใช้ความเข้มข้นของเปอร์ออกซิเดสที่เหมาะสมเป็นปัจจัยสำคัญต่อการทำงานของเปอร์ออกซิเดส ตัวอย่างงานวิจัยที่มีการศึกษาในประเด็นนี้ เช่น การนำเปอร์ออกซิเดสที่สกัดจากเปลือกมันฝรั่งและถั่วเหลืองมากำจัดสีข้อม โดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ 0.1–1.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าเปอร์ออกซิเดสจากทั้งสองแหล่งมีประสิทธิภาพการทำงานเพิ่มขึ้นเมื่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เพิ่มขึ้นและดีที่สุดที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ [17] และเมื่อนำมากำจัดคลอโรฟีนอลพบว่าการใช้เปอร์ออกซิเดสที่ความเข้มข้นต่ำหรือสูงกว่า 1 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง [22] ในขณะที่ [23] พบว่าเปอร์ออกซิเดสจากฮอสเรดิซทำงานได้ดีเมื่อใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้นต่ำ



รูปที่ 6 การกำจัดไดโคฟอลกับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

4. สรุปผลการศึกษา

การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเปอร์ออกซิเดส ความเข้มข้นของไดโคฟอล ความเป็นกรด่างของสารละลาย อุณหภูมิ และความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการทำงานของเปอร์ออกซิเดสต่อการกำจัดไดโคฟอล โดยสภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษานี้พบว่า การใช้เปอร์ออกซิเดส 0.126 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ไดโคฟอล 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าพีเอชของสารละลายเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 1 มิลลิโมลาร์ สามารถกำจัดไดโคฟอลได้ร้อยละ 94 ภายในเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งหากนำผลการศึกษาดังกล่าวมาคำนวณในเชิงปริมาณไดโคฟอลที่ถูกกำจัดต่อหน่วยของเปอร์ออกซิเดสที่ใช้ พบว่าไดโคฟอลปริมาณ 0.104 มิลลิกรัม ถูกกำจัดภายในเวลา 6 ชั่วโมง เมื่อใช้เปอร์ออกซิเดส 1 ยูนิต อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ในส่วนค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ การใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ มาอธิบายปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น รวมถึงการศึกษาวิถีการย่อยสลายไดโคฟอลด้วยเปอร์ออกซิเดสและทดสอบความเป็นพิษที่เกิดขึ้นหลังสิ้นสุดปฏิกิริยา ควรมีการดำเนินการเพิ่มเติมในอนาคต เมื่อผลการศึกษามีแนวโน้มที่จะนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้งานจริง โดยอาจนำไปใช้ในรูปแบบของการพ่นเอนไซม์ที่อยู่ในรูปของสารละลายนี้ลงในบริเวณพื้นที่เพาะปลูกที่มีการปนเปื้อนของไดโคฟอลโดยตรง หรือหากใช้กับแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนสารดังกล่าวอาจใช้เอนไซม์ในรูปแบบตรึงกับเยื่อกรองหรือตัวกลางต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้ร่วมด้วยต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- [1] C. R. Mourer, G. L. Hall, W. E. Whitehead, T. Shibamoto, L. R. Shull and S. E. Schwarzbach, "Chromatographic determination of dicofol and

- metabolites in egg yolks,” *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 19, no. 1, pp. 154–156, 1990, doi: 10.1007/bf01059825.
- [2] X. Yang, S. Wang, Y. Bian, F. Chen, G. Yu, C. Gu and X. Jiang, “Dicofol application resulted in high DDTs residue in cotton fields from northern Jiangsu province, China,” *Journal of Hazardous Materials*, vol. 150, no. 1, pp. 92–98, 2008, doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.04.076.
- [3] A. H. Neilson, “An environmental perspective on the biodegradation of organochlorine xenobiotics,” *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 37, no. 1, pp. 3–21, 1996, doi: 10.1016/0964-8305(95)00092-5.
- [4] J. Zhang, H. Yan, T. Yang and Y. Zong, “Removal of dicofol from water by immobilized cellulase and its reaction kinetics,” *Journal of Environmental Management*, vol. 92, no. 1, pp. 53–58, 2011, doi: 10.1016/j.jenvman.2010.08.008.
- [5] F. Wang, X. Zhang, C. Huangfu, M. Zhu, C. Li and L. Feng, “The BODIPY-based chemosensor for the fluorometric determination of organochlorine pesticide dicofol,” *Food Chemistry*, vol. 370, 2022, Art. no. 131033, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.131033.
- [6] J. -Z. Yang, Z. -X. Wang, L. -H. Ma, X. -B. Shen, Y. Sun, D. -W. Hu and L. -X. Sun, “The organochlorine pesticides residues in the invasive ductal breast cancer patients,” *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 40, no. 3, pp. 698–703, 2015, doi: 10.1016/j.etap.2015.07.007.
- [7] N. Gaur, K. Narasimhulu, and P. Y, “Recent advances in the bio-remediation of persistent organic pollutants and its effect on environment,” *Journal of Cleaner Production*, vol. 198, pp. 1602–1631, 2018, doi: 10.1016/j.jclepro.2018.07.076.
- [8] A. A. Sari, S. Tachibana and K. Itoh, “Determination of co-metabolism for 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl) ethane (DDT) degradation with enzymes from *Trametes versicolor* U97,” *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 114, no. 2, pp. 176–181, 2012, doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.03.006.
- [9] R. Zhuo and F. Fan, “A comprehensive insight into the application of white rot fungi and their lignocellulolytic enzymes in the removal of organic pollutants,” *Science of The Total Environment*, vol. 778, 2021, Art. no. 146132, doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.146132.
- [10] J. Nie, Y. Sun, Y. Zhou, M. Kumar, M. Usman, J. Li, J. Shao, L. Wang and D. C. W. Tsang, “Bioremediation of water containing pesticides by microalgae: Mechanisms, methods, and prospects for future research,” *Science of The Total Environment*, vol. 707, 2020, Art. no. 136080, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.136080.
- [11] A. Saravanan, P. S. Kumar, D. -V. N. Vo, S. Jeevanantham, S. Karishma and P. R. Yaashikaa, “A review on catalytic-enzyme degradation of toxic environmental pollutants: Microbial enzymes,” *Journal of Hazardous Materials*, vol. 419, 2021, Art. no. 126451, doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.126451.
- [12] Q. Chang, J. Huang, Y. Ding and H. Tang, “Catalytic oxidation of phenol and 2,4-Dichlorophenol by using horseradish peroxidase immobilized on graphene oxide/Fe₃O₄,” *Molecules*, vol. 21, no. 8, 2016, Art. no. 1044, doi: 10.3390/molecules21081044.
- [13] M. Hamid and R. Khalil ur, “Potential applications of peroxidases,” *Food Chemistry*, vol. 115, no. 4, pp. 1177–1186, 2009, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.02.035.
- [14] K. Sellami, A. Couvert, N. Nasrallah, R. Maachi, M. Abouseoud, and A. Amrane, “Peroxidase enzymes as

- green catalysts for bioremediation and biotechnological applications: A review,” *Science of The Total Environment*, vol. 806, 2022, Art. no. 150500, doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.150500.
- [15] X. Qiu, T. Zhu, B. Yao, J. Hu and S. Hu, “Contribution of dicofol to the current DDT pollution in China,” *Environmental Science & Technology*, vol. 39, no. 12, pp. 4385–4390, 2005, doi: 10.1021/es050342a.
- [16] M. C. Lakshmi and K. S. M. S. Raghavarao, “Downstream processing of soy hull peroxidase employing reverse micellar extraction,” *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 15, pp. 937–945, 2010, doi: 10.1007/s12257-010-0071-6.
- [17] M. Svetozarević, N. Šekuljica, A. Onjia, N. Barać, M. Mihajlović, Z. Knežević-Jugović and D. Mijin, “Biodegradation of synthetic dyes by free and cross-linked peroxidase in microfluidic reactor,” *Environmental Technology & Innovation*, vol. 26, 2022, Art. no. 102373, doi: 10.1016/j.eti.2022.102373.
- [18] A. Fatima and Q. Husain, “Purification and Characterization of a Novel Peroxidase from Bitter Gourd (*Momordica charantia*),” *Protein & Peptide Letters*, vol. 15, no. 4, pp. 377–384, 2008, doi: 10.2174/092986608784246452.
- [19] S. S. Kim and D. J. Lee, “Purification and characterization of a cationic peroxidase Cs in *Raphanus sativus*,” *Journal of Plant Physiology*, vol. 162, no. 6, pp. 609–617, 2005, doi: 10.1016/j.jplph.2004.10.004.
- [20] C. Billaud, L. Louarme and J. Nicolas, “Comparison of peroxidases from barley kernel (*Hordeum vulgare* L.) and wheat germ (*Triticum aestivum* L.): isolation and preliminary characterization,” *Journal of Food Biochemistry*, vol. 23, no. 2, pp. 145–172, 1999, doi: 10.1111/j.1745-4514.1999.tb00011.x.
- [21] T. Köktepe, S. Altın, H. Tohma, İ. Gülçin and E. Köksal, “Purification, characterization and selected inhibition properties of peroxidase from haricot bean (*Phaseolus vulgaris* L.),” *International Journal of Food Properties*, vol. 20, no. sup2, pp. 1944–1953, 2017, doi: 10.1080/10942912.2017.1360903.
- [22] J. L. Gómez, E. Gómez, J. Bastida, A. M. Hidalgo, M. Gómez and M. D. Murcia, “Experimental behaviour and design model of a continuous tank reactor for removing 4-chlorophenol with soybean peroxidase,” *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, vol. 47, no. 9, pp. 1786–1792, 2008, doi: 10.1016/j.cep.2007.09.019.
- [23] N. Amini and M. Shamsipur, “Impedimetric mechanism study of horseradish peroxidase at low and high concentrations of hydrogen peroxide based on graphene/sol-gel/horseradish peroxidase,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 123, pp. 677–681, 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.091.