

Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : MRG5080224

(รหัสโครงการ)

Project Title : Purification, characterization and dye decolorisation of Extracellular Laccases of *Lentinus* sp.

(ชื่อโครงการ) การแยกบริสุทธิ์ การศึกษาสมบัติเฉพาะและความสามารถในการฟอกจางสีเคมีสังเคราะห์ของเอนไซม์แลคเคสที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ของเห็ดลม

Investigator : Rakrudee Sarnthima Mahasarakham University

(ชื่อนักวิจัย) รักฤดี สารธิมา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

E-mail Address : rakrudee.s@msu.ac.th

Project Period : 2 ปี (2 กรกฎาคม 2550 ถึง 1 กรกฎาคม 2552)

(ระยะเวลาโครงการ)

Six agro-industrial wastes were evaluated as a support for ligninolytic enzyme production by the white-rot fungus *Lentinus polychrous* Lév. under solid-state fermentation. Rice bran supplemented with rice husk (RH) (2:1 by wt) showed high laccase activity of 1,425 U/L with specific activity 10.0 U/g substrate. The crude enzyme of this culture also contained manganese peroxidase (MnP) and manganese-independent peroxidase (MIP) activities in relative proportions of 1.9: 1.4: 1 of laccase: MnP: MIP, respectively. Our studies showed that the crude enzyme from this culture exhibited *in vitro* decolorization of Indigo carmine. The highest efficiency of dye decolorization was observed under alkaline conditions (pH 9.0). The rather high pH conditions and high efficiency in Indigo carmine decolorization, make the enzyme of further interest for applications in treatment of waste water from the textile industry, which contains this synthetic dyes. Extracellular laccase from the fungus was partially purified using 40–85% saturated ammonium sulfate fractionation and column chromatography techniques including Concanavalin A, DEAE-cellulose and Superdex 200 HR. The partially purified laccase contained three laccase isozymes with molecular masses of 65.6, 52.6 and 44.8 kDa by Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (Tricine-SDS-PAGE). The optimum pH and temperature for 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) were 4.5 and 50 °C, respectively. Laccase activity was completely inhibited by 0.10 mM dithiothreitol, thioglycolic acid, sodium azide, cysteine or 10.0 mM *p*-cumaric acid and was inhibited more than 50% in the presence of 10.0 mM Mn^{2+} or Mg^{2+} . However, with ABTS as a substrate, its laccase activity was slightly stimulated by Cu^{2+} or Cd^{2+} . The enzyme had a greater affinity for ABTS (K_m of 19.19 μM) than 2,6-dimethoxy-phenol (DMP) (K_m of 185 μM) and guaiacol (K_m of 472 μM). The V_{max} values for those substrates were 8.35, 4.65 and 4.90 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, respectively.

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 6 ชนิดได้ถูกนำมาประเมินศักยภาพในการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดลม เพื่อผลิตเอนไซม์แลคเคส พบว่าอาหารสูตรผสมระหว่างแกลบและรำข้าว (2:1 โดยน้ำหนัก) ให้กิจกรรมรวมแลคเคสสูงที่สุด 1,425 U/L ด้วยค่ากิจกรรมจำเพาะ 10.0 U/g สับสเตรต นอกจากแลคเคสแล้วสารสกัดเอนไซม์หยาบยังมีกิจกรรมของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสทั้งชนิดต้องการและไม่ต้องการแมงกานีส โดยพบในสัดส่วนของแลคเคส:แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส:แมงกานีสอินดิเพนเดนท์ เปอร์ออกซิเดส เท่ากับ 1.9: 1.4: 1 ตามลำดับ การผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่สูงและใช้วัสดุเพาะเลี้ยงราคาถูกนี้คาดว่าจะมีศักยภาพสูงในการประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรม ผลการทดลองพบว่าสารสกัดเอนไซม์หยาบสามารถฟอกจางสีอินดิโกคาร์มีนได้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งพบในสภาวะที่มีความเป็นเบส (pH 9.0) จึงมีศักยภาพในการประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่หลังโดยเห็ดชนิดนี้สำหรับฟอกจางสีดังกล่าว ในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมสิ่งทอ จากการศึกษาแยกบริสุทธิ์เอนไซม์จากเชื้อเห็ดชนิดนี้โดยการตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิมตัว 40–85% และเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีได้แก่ Concanavalin A, DEAE-cellulose และ Superdex 200 HR พร้อมทั้งศึกษาสมบัติบางประการพบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนประกอบด้วย 3 ไอโซเอนไซม์ที่มีขนาด 65.6, 52.6 และ 44.8 kDa โดยเทคนิค Tricine-SDS-PAGE มีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับสับสเตรต 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) เท่ากับ 4.5 และ 50 °C กิจกรรมแลคเคสถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์โดย 0.10 mM dithiothreitol, thioglycolic acid, sodium azide, cysteine หรือ 10.0 mM *p*-cumaric acid และถูกยับยั้งมากกว่า 50% ในสภาวะที่มี 10.0 mM Mn^{2+} หรือ Mg^{2+} . แต่อย่างไรก็ตามกิจกรรมแลคเคสถูกกระตุ้นโดย Cu^{2+} หรือ Cd^{2+} ค่าจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์มีความชอบต่อสับสเตรต ABTS (K_m 19.19 μM) มากกว่า 2,6-dimethoxy-phenol (DMP) (K_m 185 μM) และ guaiacol (K_m 472 μM) ตามลำดับ โดยมีค่า V_{max} สำหรับสับสเตรตดังกล่าวเท่ากับ 8.35, 4.65 และ 4.90 $\mu mol\ min^{-1}\ mg^{-1}$ ตามลำดับ

Keywords : solid-state fermentation, agro-industrial waste, ligninolytic enzyme, laccase, manganese peroxidase, decolorization, purification, characterization, *Lentinus polychrous* Lév.

(คำหลัก) การหมักบนอาหารแข็ง วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เอนไซม์ย่อยลิกนิน แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส การฟอกจางสีเคมีสังเคราะห์ การแยกบริสุทธิ์ การศึกษาสมบัติเฉพาะ เห็ดลม