



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การแยกบริสุทธิ์ การศึกษาสมบัติเฉพาะและ
ความสามารถในการฟอกจางสีเคมีสังเคราะห์ของเอนไซม์
แลคเคสที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ของเห็ดหลิน

โดย รักฤดี สารธิมาและคณะ

มิถุนายน พ.ศ. 2552

สัญญาเลขที่ MRG5080224

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การแยกบริสุทธิ์ การศึกษาสมบัติเฉพาะและ
ความสามารถในการฟอกจางสีเคมีสังเคราะห์ของเอนไซม์
แลคเคสที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ของเห็ดลม

คณะผู้วิจัย สังกัด

1. รักฤดี สารธิมา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
2. ศรัณยู คำเมือง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
3. ม.ร.ว. ชีษณุสร สวัสดิวัตน์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

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 ชนิดได้ถูกนำมาประเมินศักยภาพในการเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดหลิน เพื่อผลิตเอนไซม์แลคเคส พบว่าอาหารสูตรผสมระหว่างแกลบและรำข้าว (2:1 โดยน้ำหนัก) ให้ กิจกรรมรวมแลคเคสสูงที่สุด 1,425 U/L ด้วยค่ากิจกรรมจำเพาะ 10.0 U/g สับสเตรต นอกจากแลคเคสแล้วสารสกัดเอนไซม์หยาบยังมีกิจกรรมของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสทั้งชนิดต้องการและไม่ต้องการแมงกานีส โดยพบในสัดส่วนของแลคเคส:แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส:แมงกานีสอินดิเพนเดนท์ เปอร์ออกซิเดส เท่ากับ 1.9: 1.4: 1 ตามลำดับ การผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่สูงและใช้วัสดุเพาะเลี้ยง ราคาถูกนี้คาดว่าจะมีศักยภาพสูงในการประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรม ผลการทดลองพบว่าสารสกัด เอนไซม์หยาบสามารถฟอกจางสีอินดิโกคาร์มีนได้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งพบในสภาวะที่มีความเป็น เบส (pH 9.0) จึงมีศักยภาพในการประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่หลังโดยเห็ดชนิดนี้สำหรับฟอกจางสีดังกล่าว ในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมสิ่งทอ จากการศึกษาแยกบริสุทธิ์เอนไซม์จากเชื้อเห็ดชนิดนี้โดยการ ตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิมตัว 40–85% และเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีได้แก่ Concanavalin A, DEAE-cellulose และ Superdex 200 HR พร้อมทั้งศึกษาสมบัติบางประการ พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนประกอบด้วย 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 กิจกรรมแลคเคสถูก ยับยั้งโดยสมบูรณ์โดย 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+} . แต่ อย่างไรก็ตามกิจกรรมแลคเคสถูกกระตุ้นโดย Cu^{2+} หรือ Cd^{2+} ค่าจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์พบว่า เอนไซม์มีความชอบต่อสับสเตรต 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

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทำการแยกเอนไซม์แลคเคสที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ของเห็ดลมให้มีความบริสุทธิ์
2. เพื่อหาสมบัติเฉพาะและการทำงานของเอนไซม์ซึ่งรวมถึงขนาดโมเลกุล pI อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงาน ตัวกระตุ้นและตัวยับยั้ง ความจำเพาะต่อสับสเตรต จลนศาสตร์และเสถียรภาพของเอนไซม์
3. เพื่อศึกษาถึงความสามารถของเอนไซม์แลคเคสที่แยกได้บริสุทธิ์ในการฟอกจางสีเคมีสังเคราะห์ในกลุ่มต่างๆในหลอดทดลอง

วิธีทดลอง

1. การเลี้ยงเชื้อเห็ดเพื่อผลิตเอนไซม์แลคเคส

ทำโดยนำเชื้อเห็ดลมซึ่งเลี้ยงบนอาหารวุ้น PDA (Potato dextrose agar plate) มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ เมล็ดข้าวฟ่าง ชานอ้อย ฟางข้าว เปลือกกล้วย แกลบ และรำข้าว เป็นแหล่งคาร์บอนโดยไม่มีการเสริมเกลือแร่โดยทดลองเตรียมอาหารสูตรเดียว (6 สูตร) และสูตรผสมของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรสองชนิดในสัดส่วนต่างๆโดยน้ำหนัก (8 สูตร) ได้แก่ เมล็ดข้าวฟ่าง-ชานอ้อย (4:1), เมล็ดข้าวฟ่าง-รำข้าว (9:1), เมล็ดข้าวฟ่าง-รำข้าว (6:1), เมล็ดข้าวฟ่าง-รำข้าว (4:1), ชานอ้อย-รำข้าว (4:1), ฟางข้าว-รำข้าว (4:1), เปลือกกล้วย-รำข้าว (4:1), แกลบ-รำข้าว (1:2) ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 2-4 สัปดาห์ สกัดวัสดุเพาะเลี้ยงด้วยบัฟเฟอร์เป็นระยะๆ เพื่อตรวจวัดปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยลิกนิน

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์โดย วิธี Bradford (1976) โดยใช้สารละลายสำเร็จรูปของบริษัท Bio-Rad และใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐานที่ความเข้มข้นในช่วง 0-15 $\mu\text{g/mL}$

3. การตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ย่อยลิกนิน

แลคเคส (*Laccase*)

วัดโดยใช้ ABTS เป็นสับสเตรต โดยดัดแปลงวิธีของ Shin and Lee (2000) ตามที่รายงานก่อนหน้านี้ (Khammuang and Saranthima, 2007) การออกซิไดซ์ ABTS ตรวจวัดผลิตภัณฑ์อนุมูลอิสระที่ความยาวคลื่นแสง 420 nm ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ($\epsilon = 3.6 \times 10^4$ /M.cm) และยืนยันกิจกรรมของแลคเคสโดยใช้สับสเตรตจำเพาะ (0.2 mM) syringaldazine ($\epsilon = 6.5 \times 10^4$ /M.cm) ด้วยโดยติดตามปฏิกิริยาที่ 530 nm ตามวิธีของ Leonowicz and Grzywnowicz (1981)

ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (*Lignin peroxidase, LiP*)

วัดกิจกรรมโดยใช้ veratryl alcohol เป็นสับสเตรตในสภาวะที่มี H_2O_2 ตามวิธีของ Collins *et al.* (1996) ทำการยืนยันโดยทำปฏิกิริยาฟอกจางสี Azure B โดยวิธีดัดแปลงของ Archibald (1992) โดยฟอกจางสี Azure B ใน 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.5 ที่อุณหภูมิ 32 °C เป็นเวลา 50 min, 2 h และ 24 h ติดตามผลที่ความยาวคลื่นแสง 643 nm

แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (*Manganese peroxidase, MnP*) และแมงกานีสอินดิเพนเดนท์เปอร์ออกซิเดส (*manganese-independent peroxidase, MIP*)

ตรวจวัดโดยใช้วิธีดัดแปลงของ Ngo and Lenhoff (1980) โดยใช้สับสเตรตคือ MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone) และ DMAB (3, 3-dimethylaminobenzoic acid) ในสภาวะที่มี H_2O_2 และแมงกานีสซัลเฟต ในกรณีของกิจกรรม MIP เติม ethylene diamine- tetraacetate (EDTA) แทนแมงกานีสซัลเฟต

หนึ่งหน่วยเอนไซม์เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสับสเตรตได้ $\mu\text{mole/min}$ ที่สภาวะที่กำหนด

1

4. การฟอกจางสีสังเคราะห์บางชนิดโดยเอนไซม์แลคเคสหายาบ

สีอินดิโกคาร์มีน (*indigo carmine, indigoid; CI 73015*)

เริ่มต้นหาค่า pH ที่เหมาะสมในการฟอกจางสีโดยทำปฏิกิริยาใน McIlvaine buffer (0.2 M Na_2HPO_4 /0.1 M citric acid) ที่ pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 ซึ่งมีกิจกรรมแลคเคส 0.2 U/mL ของปฏิกิริยาและมีสีเข้มข้น 20 $\mu\text{g/mL}$ ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 32 °C ติดตามการฟอกจางสีที่ความยาวคลื่นแสง λ_{max} 610 nm นอกจากนี้ยังศึกษาการฟอกจางสีดังกล่าวที่ความเข้มข้นของสีต่างๆ (10-40 $\mu\text{g/mL}$) ที่สภาวะค่า pH ที่เหมาะสมที่สุด (pH 9.0)

การฟอกจางสีสังเคราะห์อื่นๆ

ศึกษาการฟอกจางสี Remazol brilliant blue R (RBBR, anthraquinone dye), Bromophenol blue (triarylmethane dyes) และ Methyl red (azo dye) โดยติดตามที่ค่าความยาวคลื่นที่สีแต่ละชนิดดูดกลืนได้สูงสุด ได้แก่ RBBR at 593 nm, Bromophenol Blue at 592 nm และ Methyl Red ที่ 524 nm ในบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ตั้งแต่ 2.0-9.0

5. การเตรียมเอนไซม์และการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์แลคเคส

นำเชื้อเห็ดบด (*Lentinus polychrous* Lév.) มาเลี้ยงในอาหารวุ้น PDA เป็นเวลา 7-10 วัน จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของเกลือกกับรำในอัตราส่วน (1:2 g) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 1 เดือน ทำการสกัดเอนไซม์โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวสกัดในสัดส่วน น้ำ 3 มิลลิลิตร ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 กรัม ทำการกวนเป็นเวลา 45 นาที จากนั้นกรองหยาบโดยใช้ผ้าขาวบางนำส่วนที่เป็นน้ำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่เป็นสารละลายใสมาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ อิ่มตัวที่ความเข้มข้น 0-40 % และ 40-85% ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ทำการปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที นำสารแขวนลอยโปรตีนที่ความเข้มข้นเกลืออิ่มตัว 40-85 % มาผ่านลงบนคอลัมน์ ConA-sepharose ที่อิ่มตัวด้วย 20 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 ที่มี Mn^{2+} และ Ca^{2+} อยู่ ที่อัตราการไหล 1.0 mL/min ทำ

การล้างโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันจากนั้นชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนต์ของ 0-1.0 M α -methylglucopyranoside ทำการเก็บ fractions (1 mL/fraction) นำไปตรวจวัดโปรตีนโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm และตรวจวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสโดยใช้ ABTS เป็นสับสเตรต รวม fractions ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสเข้าด้วยกัน (fractions 177-212) ทำการกำจัดเกลือด้วยวิธีการ dialyzed ใน 20 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 จากนั้นโหลดลงบนคอลัมน์ DEAE-cellulose ที่อ้อมตัวด้วย 20 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 ที่อัตราการไหล 2.0 mL/min ทำการล้างโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันจากนั้นชะโปรตีนที่จับกับคอลัมน์ด้วยเกรเดียนต์ของ 0-1.0 M NaCl ทำการเก็บ fractions (3 mL/fraction) นำไปตรวจวัดโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ทำการรวม fractions ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสเข้าด้วยกัน (fractions 135-141) จากนั้นทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้นก่อนนำไปโหลดลงคอลัมน์ Superdex 200 HR ที่อ้อมตัวด้วย 0.15 M NaCl ใน 20 mM sodium acetate buffer pH 4.5 ที่อัตราการไหล 0.3 mL/min โปรตีนจะถูกละอองออกจากคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ทำการเก็บ fractions (1 mL/fraction) นำไปตรวจวัดโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ทำการรวม fractions ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสเข้าด้วยกัน (fractions 37-46) นำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์และหามวลโมเลกุลด้วยเทคนิค Tricine-SDS-PAGE

6. การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของแลคเคส

ทำโดยวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสที่อุณหภูมิต่างๆในช่วง 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส ใน 0.1 sodium acetate buffer pH 4.5 โดยใช้ ABTS เป็นสับสเตรต

7. การหาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของแลคเคส

ทำโดยการวัดค่ากิจกรรมของแลคเคสที่ค่าพีเอชต่างๆในช่วงพีเอช 3.0 ถึง 9.0 (ซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์) และในช่วงพีเอช 3.5 ถึง 5.5 (sodium acetate buffer) โดยใช้ ABTS เป็นสับสเตรต

8. การหาผลของพีเอชต่อความเสถียรของแลคเคส

ทำโดยบ่มเอนไซม์ไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆในช่วงพีเอช 3.0 ถึงพีเอช 7.0 (citrate-phosphate buffer) ติดตามวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เป็นเวลา 1 เดือน

9. การหาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของแลคเคส

ทำโดยบ่มเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิต่างๆในช่วง 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมงโดยทำการติดตามวัดกิจกรรมของแลคเคสทุกๆ 1 ชั่วโมง

10. การศึกษาผลของตัวยับยั้งและไอออนของเกลือและโลหะหนักต่อกิจกรรมแลคเคส

ทำโดย วัดกิจกรรมของแลคเคสโดยใช้ ABTS เป็นสับสเตรตในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีตัวยับยั้งชนิดต่างๆหรือไอออนของเกลือและโลหะหนักอยู่ที่ความเข้มข้น (0.1 ถึง 10 มิลลิโมลาร์) ได้แก่ CuSO_4 , CdSO_4 , KCl, MgCl_2 , CaCl_2 , MnCl_2 , NaCl, ZnSO_4 , CoCl_2 โดยปริมาณโปรตีนที่ใช้ทำปฏิกิริยา เท่ากับ 0.375 μg

11. การศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์แลคเคสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์

ทำโดยการวัดอัตราเร็วเริ่มต้นในการทำปฏิกิริยาระหว่างสับสเตรตกับเอนไซม์ที่ความเข้มข้นของสับสเตรตต่างๆ ปฏิกิริยาจะทำในสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของแลคเคส สำหรับสับสเตรตแต่ละชนิด เริ่มปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ทำการวัดอัตราเร็วปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่อง UV-Vis spectrophotometer (hp 8453, Hewlett packard) ที่ λ_{max} ของสับสเตรตแต่ละชนิด โดย ABTS ที่ความเข้มข้น 0.1-2.0 mM ทำการวัดอัตราเร็วเริ่มต้นปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 420 nm ปริมาณโปรตีนที่ใช้ทำปฏิกิริยา 0.012 μg DMP ที่ความเข้มข้น 1-16 mM ทำการวัดอัตราเร็วเริ่มต้นปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 468 nm และ Guaiacol ที่ความเข้มข้น 0.25-8.0 mM ทำการวัดอัตราเร็วเริ่มต้นปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 436 nm ปริมาณโปรตีนที่ใช้ทำปฏิกิริยาสำหรับ DMP และ Guaiacol คือ 0.225 μg นำมาพล็อตกราฟแบบ Lineweaver-burke เพื่อหาค่า K_m และ V_{max}

ผลการทดลอง

การเลี้ยงเชื้อเห็ดลมเพื่อผลิตเอนไซม์แลคเคส

ในงานวิจัยนี้กิจกรรมของแลคเคสที่หลังโดยเชื้อเห็ดลมซึ่งเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ เมล็ดข้าวฟ่าง ชานอ้อย ฟางข้าว เปลือกกล้วย แกลบและรำข้าว เป็นแหล่งคาร์บอนโดยไม่มีการเสริมเกลือแร่

อาหารสูตรเดี่ยว (single substrate formulas)

วัสดุทางการเกษตรชนิดต่างๆที่นำมาทำเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดในระยะเวลาต่างๆ นำมาสกัดเอนไซม์หยาบโดยใช้วัสดุเพาะเชื้อต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M Sodium acetate buffer (pH 4.5) ในอัตราส่วน 1:3 (w/v) กรองผ่านผ้าขาวบาง บั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายส่วนใสที่เรียกว่า สารละลายเอนไซม์หยาบมาตรวจวัดปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส ผลดังแสดงใน **Fig. 1** พบว่าอาหารสูตรรำข้าว (RB) ให้กิจกรรม แลคเคสสูงที่สุด 1449 U/L ในวันที่ 21 ของการเลี้ยง ในขณะที่อาหารสูตรอื่นๆให้กิจกรรมแลคเคสต่ำกว่า 200 U/L (**Fig. 1a**) ปริมาณโปรตีนก็สูงกว่าปริมาณโปรตีนของสารละลายเอนไซม์หยาบเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารสูตรอื่นๆด้วย ซึ่งให้น้อยกว่า 0.1 mg/mL (**Fig. 1b**)

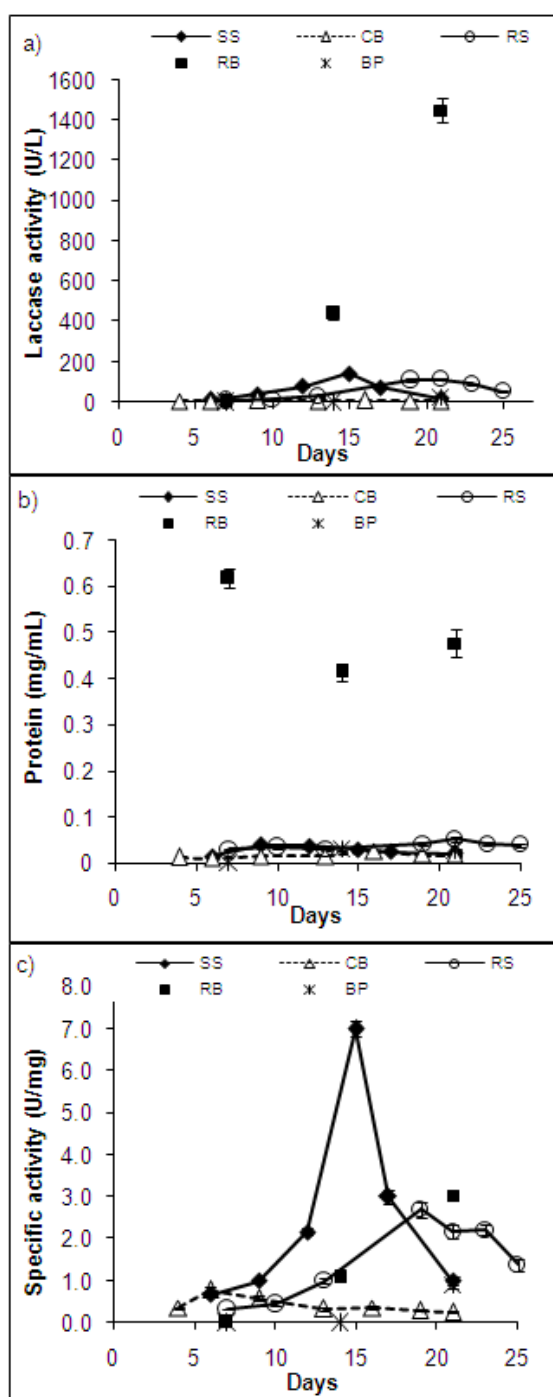


Fig. 1: Time course of enzyme activity and protein content of *Lentinus polychrous* Lé. grown on various single substrate agro-industrial wastes. **(a)** laccase activity, **(b)** soluble protein content and **(c)** laccase specific activity. SS (sorghum seed); CB (sugar cane bagasse); RS (rice straw); RB (rice bran); BP (banana peel)

การเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่ตรวจวัดปริมาณโปรตีนได้เพิ่มขึ้นเมื่อกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น แม้ว่าบางที่อาจจะมีเอนไซม์ย่อยลิิกนินอื่นๆที่หลั่งออกมา เช่นแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (manganese peroxidase, MnP) ลิิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase, LiP) หรือเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต เช่นเซลลูเลส เป็นต้น เมื่อพิจารณาถึงกิจกรรมจำเพาะของแลคเคสพบว่าอาหารสูตรข้าวฟ่าง (SS) ให้กิจกรรมจำเพาะของแลคเคสสูงสุดประมาณ 7.0 U/mg เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตรรำข้าว (RB) ที่ให้ค่าเพียงประมาณ 3.0 U/mg โปรตีน (**Fig. 1c**) เมื่อเทียบเป็นกิจกรรมแลคเคสต่อกรัมของวัสดุเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆจะได้ค่าดังแสดงใน **Fig. 2** อาหารสูตรรำข้าว (RB) ให้ค่าสูงที่สุดประมาณ 4.35 U/g เมื่อใช้ขานอ้อยเป็นวัสดุเพาะเลี้ยง พบว่าเชื้อเจริญเติบโตได้ดี แต่กิจกรรมแลคเคสตรวจพบได้ต่ำมากๆ (<10 U/L) อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อเห็ดลมสร้างเอนไซม์ชนิดอื่น เช่นเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรต ไซแลนเนส (xylanase) เนื่องจากขานอ้อยมีไซแลนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งควรมีการตรวจสอบต่อไป ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าขานอ้อยอาจจะไม่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อเห็ดลมเพื่อผลิตเอนไซม์แลคเคส เชื้อเห็ดลมเจริญเติบโตและผลิตแลคเคสในอาหารสูตรข้าวฟ่าง (SS) ได้ดีกว่าสูตรฟางข้าว (RS) แต่ฟางข้าวมีราคาถูกกว่าข้าวฟ่างและหาได้ง่ายกว่าเนื่องจากเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร

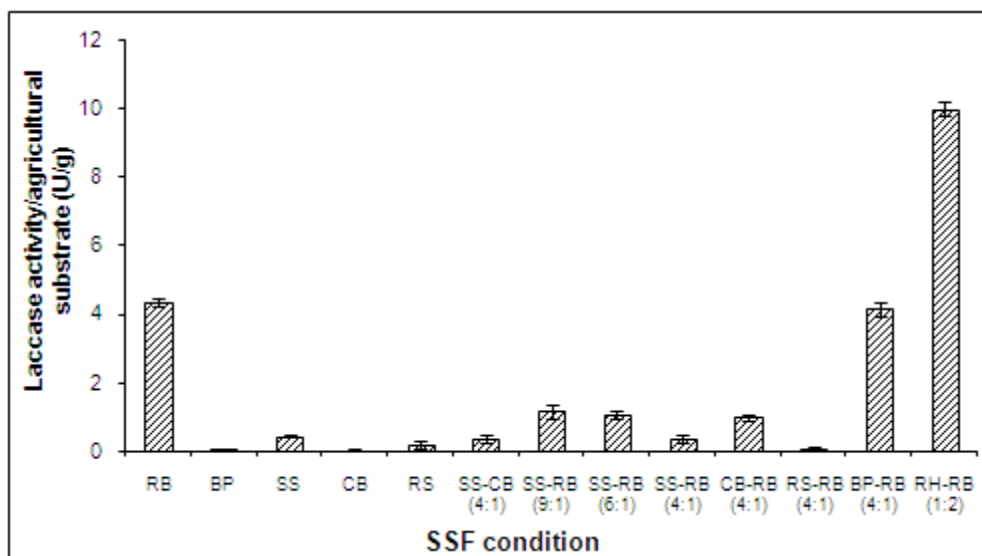


Fig. 2: Efficiency of laccase activity (U) produced per gram of single substrate and mixed substrate by solid state fermentation of *Lentinus polychrous* Lév., when grown on various single substrates and mixed agro-industrial wastes. SS-CB (sorghum seed-sugar cane bagasse); SS-RB (sorghum seed-rice bran); RH-RB (rice husk-rice bran); CB-RB (sugar cane bagasse-rice bran); RS-RB (rice straw-rice bran); BP-RB (banana peel-rice bran); SS (sorghum seed); CB (sugar cane bagasse); RS (rice straw); RB (rice bran); BP (banana peel)

อาหารสูตรผสม (mixed substrate formulas)

ในอาหารสูตรข้าวฟ่างเสริมรำข้าว (SS-RB) ในอัตราส่วน 9:1, 6:1 และ 4:1 โดยน้ำหนัก ให้กิจกรรมแลคเคสสูงสุด 261, 186 และ 119 U/L ตามลำดับ (**Fig. 3b**) โดยมีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 8.42, 8.40 และ 5.41 U/mg โปรตีน (**Fig. 3c**) และ 1.16, 1.07 และ 0.36 U/g วัสดุเพาะเชื้อ (**Fig. 2**) ในวันที่ 9, 8 และ 7 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่ารำข้าวในปริมาณน้อยจะให้กิจกรรมแลคเคสสูงกว่า ข้าวฟ่างผสมขาน้อย (SS-CB) ได้กิจกรรมแลคเคส และกิจกรรมจำเพาะสูงสุดประมาณ 126 U/L, 4.3 U/mg

โปรตีน หลังเลี้ยงได้ 13 วัน กิจกรรมแลคเคสสูงสุดได้จากอาหารสูตรกลบผสมรำข้าว (RH-RB) คือ 1,425 U/L (**Fig. 3b**) หรือ 15.6 U/mg โปรตีน (**Fig. 3c**) หรือ 10.0 U/g วัสดุเพาะเชื้อ (**Fig. 2**) ในวันที่ 17 ของการเลี้ยง กิจกรรมแลคเคสอาจสูงกว่านี้ถ้าเลี้ยงเป็นระยะเวลานานขึ้น กลบอย่างเดียวยังไม่เหมาะสำหรับใช้เลี้ยงเชื้อเห็ดลมเพื่อผลิตเอนไซม์แลคเคส อาจจะเนื่องจากย่อยสลายได้ยาก รำข้าวอย่างเดียวแม้จะเลี้ยงเชื้อแล้วให้กิจกรรมเอนไซม์มากแต่มีราคาค่อนข้างแพง เมื่อนำกลบมาผสมกับรำข้าวในสัดส่วนที่พอเหมาะคาดว่าจะใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีได้ ซึ่งควรจะมีการศึกษาในรายละเอียดต่อไป เพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมากและประหยัดมากที่สุด ข้อมูลนี้ยืนยันว่ารำข้าวมีสารอาหารที่มีคุณค่าต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ การทดลองในครั้งนี้อาศัยเชื้อแบบหมักบนอาหารแข็งโดยใช้วัสดุทางการเกษตรเป็นอาหารและไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนอื่นๆ การเพิ่มเติมในสิ่งเหล่านี้เล็กน้อยหรือการใช้สารเหนียวมาช่วยในการผลิตเอนไซม์ แลคเคส เช่น คอปเปอร์อาจช่วยให้ได้ปริมาณเอนไซม์ดีขึ้นกว่านี้ ซึ่งควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

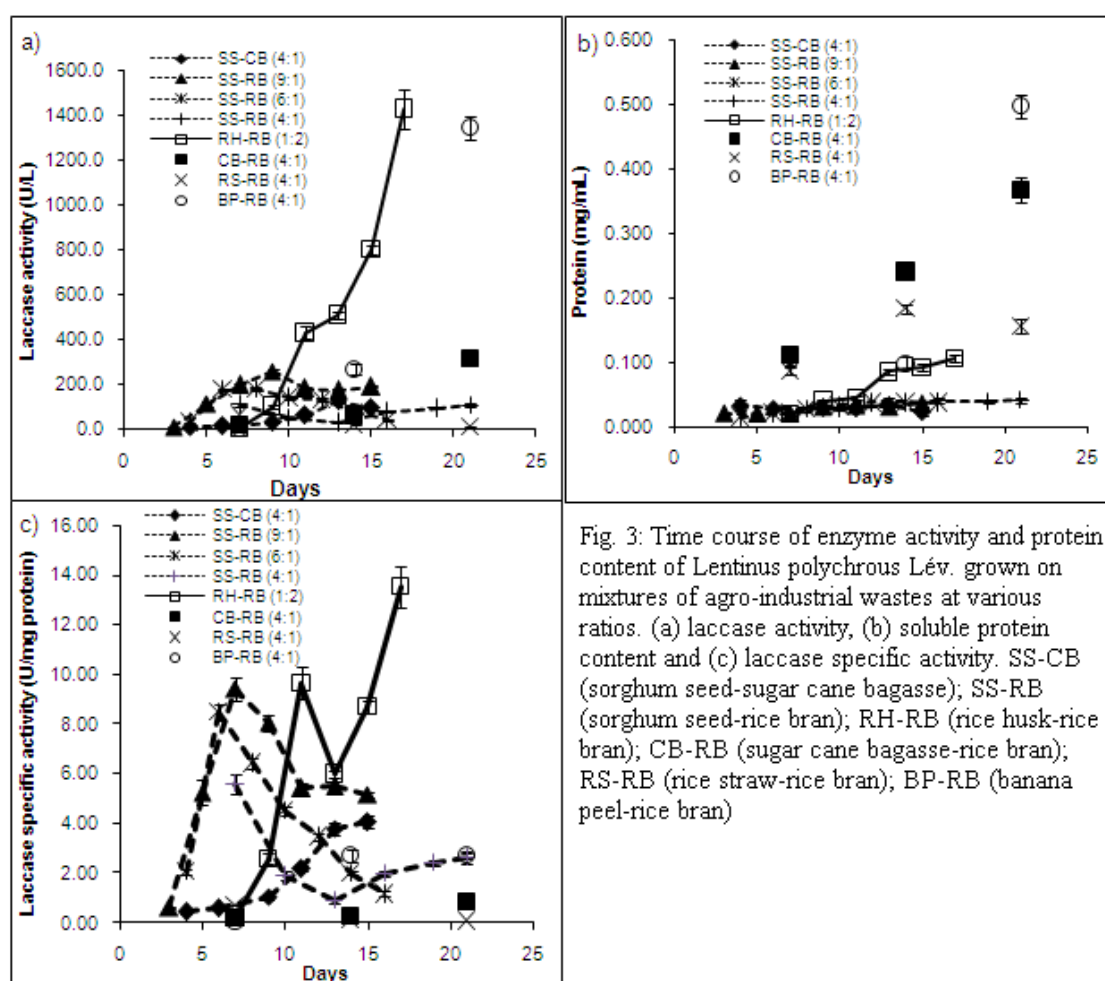


Fig. 3: Time course of enzyme activity and protein content of *Lentinus polychrous* Lé. grown on mixtures of agro-industrial wastes at various ratios. (a) laccase activity, (b) soluble protein content and (c) laccase specific activity. SS-CB (sorghum seed-sugar cane bagasse); SS-RB (sorghum seed-rice bran); RH-RB (rice husk-rice bran); CB-RB (sugar cane bagasse-rice bran); RS-RB (rice straw-rice bran); BP-RB (banana peel-rice bran)

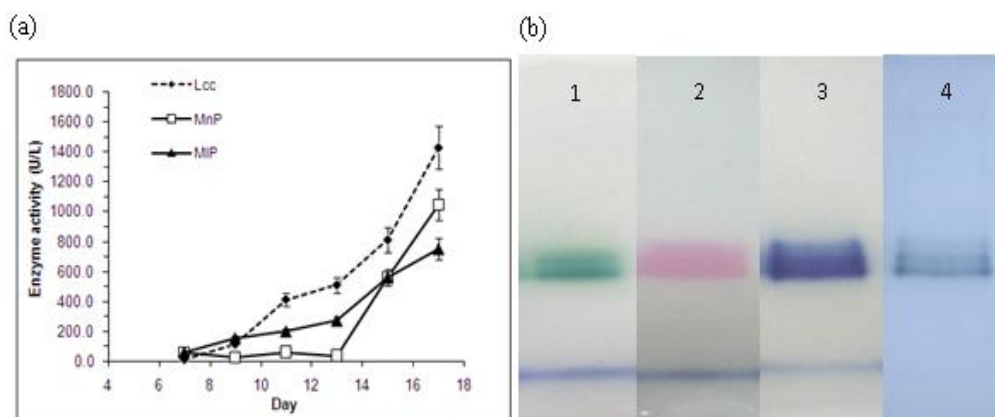


Fig. 4: Ligninolytic enzyme activity levels from *Lentinus polychrous* Lé. grown on rice husk-rice bran media (1:2 by wt). (a) Enzyme activity levels in relation to time, Lcc (laccase); MnP (manganese peroxidase); MIP (manganese-independent peroxidase) (b) Native-PAGE of extracts stained with substrates for different enzymes; 1, ABTS; 2, syringaldazine; 3, DMAB/MBTH/Mn²⁺/H₂O₂; 4, DMAB/MBTH/EDTA/H₂O₂

นอกจากกิจกรรมของแลคเคสแล้ว สารสกัดเอนไซม์ยับยั้งจากการเลี้ยงเชื้อเห็ดลมบนอาหารสูตรแกลบผสมรำข้าวยังมีกิจกรรมของเอนไซม์ MnP และเปอร์ออกซิเดสที่ไม่ต้องการแมงกานีส (manganese-independent peroxidase, MIP) ดังแสดงใน **Fig. 4a** ซึ่งสอดคล้องกับเชื้อราไวท์รอตอื่นๆ ที่มักจะสร้างและหลั่งเอนไซม์ย่อยลิกนินมากกว่าหนึ่งชนิด ซึ่งอาจแตกต่างกันในรูปแบบของไอโซเอนไซม์ แต่อย่างไรก็ตามผลจากการทดลองครั้งนี้ ตรวจไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสจากสารละลายเอนไซม์ยับยั้งโดยใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของสับสเตรต veratryl alcohol และทดลองยืนยันโดยปฏิกิริยาการฟอกจางสี Azure B (ตามวิธีของ Archibald, 1992) ซึ่งบ่งชี้ว่าเชื้อเห็ดดังกล่าวอาจไม่มียีนของลิกนินเปอร์ออกซิเดส หรืออาจจะมีแต่การเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรดังกล่าวไม่สามารถ

เหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน ควรมีการศึกษาเกี่ยวกับยีนของเอนไซม์ย่อยลิกลินในเชื้อเห็ดชนิดนี้ต่อไป

การฟอกจางสีเคมีสังเคราะห์โดยเอนไซม์หยาบแลคเคส

สีอินดิโกคาร์มีน

การฟอกจางสีอินดิโกคาร์มีนโดยใช้เอนไซม์หยาบที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตรเกลบ ผสมรำข้าว กิจกรรม 0.2 U/mL ความเข้มข้นสุดท้ายของสี 20 mg/L ที่ pH ต่างๆ (2.0-9.0) ติดตามการลดลงของสีที่เวลา 1 h และ 16 h ผลดังแสดงใน **Fig. 5** พบว่าที่ pH 9.0 สีอินดิโกคาร์มีนฟอกจางได้ 86.0% และ 93.1% ตามลำดับที่เวลาดังกล่าว การฟอกจางสีที่ pH 3.0 และ 8.0 ให้ผลใกล้เคียงกับที่ pH 5.0 ณ เวลาดังกล่าว ในขณะที่ pH 6.0 ให้เปอร์เซ็นต์การฟอกจางสีประมาณ 15% ในเวลา 1 h และสูงกว่า 70% ในเวลา 16 h ที่ pH 4.0 และ 7.0 ก็ให้ผลทำนองเดียวกันที่ 1 h และเกือบฟอกจางหมดในเวลา 16 h (98.1%) ที่ pH 7.0 ในขณะที่ pH 4.0 ได้ 87.6% แต่อย่างไรก็ตามที่ pH 2.0 การฟอกจางสีดังกล่าวเกิดขึ้นเพียง 17% เท่านั้นที่เวลา 1 h และได้เพียง 52.7% ที่เวลา 16 h

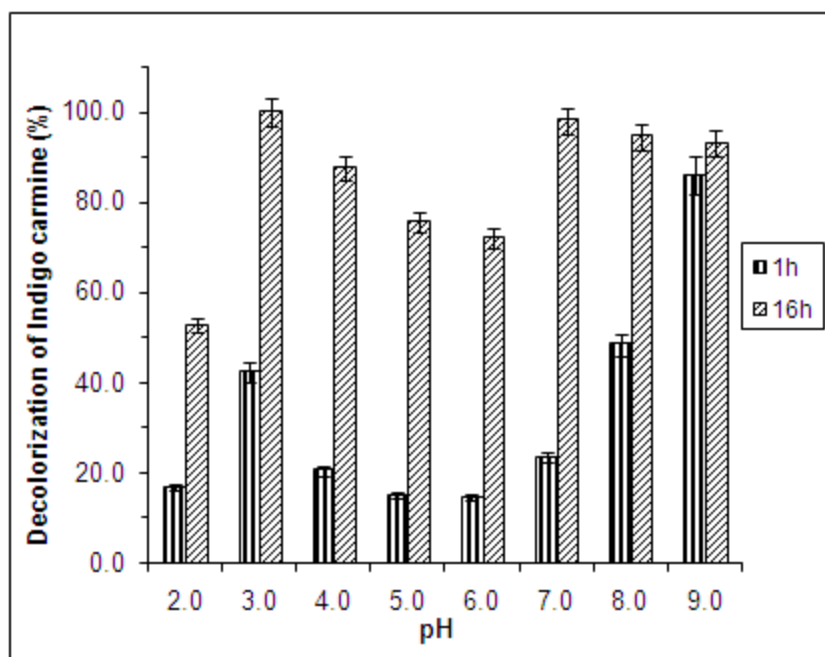


Fig. 5: Indigo carmine decolorization at different pH values. Reactions were performed in McIlvaine buffer containing crude enzyme 0.2 U/mL reaction mixture and dye final concentration of 20 mg/L reaction mixture, incubated at 32 °C.

ดังนั้นจึงเลือกที่ pH 9.0 สำหรับศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของสีต่อความสามารถในการฟอกจางสีอินดิโกคาร์มีนโดยเอนไซม์หยาบจากเชื้อเห็ดลม กิจกรรม 0.2 U/mL ในสภาวะที่มีสีความเข้มข้นต่างกัน (10-40 mg/L) ผลดังแสดงใน **Fig. 6**. อัตราการฟอกจางสีสูงสุด (2.5%D/min) เกิดขึ้นในกรณีความเข้มข้นสี 10 mg/L และอัตราการฟอกจางสีลดลงเมื่อความเข้มข้นของสีเพิ่มขึ้น (**Fig. 7**) ที่เวลา 180 min ในทุกความเข้มข้นสีให้การฟอกจางสีสูงกว่า 90% กล่าวคือ 98.7, 97.6, 96.5 และ 93.8% ในกรณีที่ความเข้มข้นสีเริ่มต้นเท่ากับ 10, 20, 30 และ 40 mg/L ตามลำดับ (**Fig. 6**) pH ที่เหมาะสมต่อการฟอกจางสีชนิดหนึ่งๆอาจขึ้นอยู่กับชนิด แหล่งและสมบัติเฉพาะของเอนไซม์ด้วย ผลการทดลองในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์หยาบจากเชื้อเห็ดลมสามารถเร่งปฏิกิริยาฟอกจางสีอินดิโกคาร์มีนได้ในทุกๆ

ค่า pH ที่ทดสอบ (2.0-9.0) แต่ในอัตราเร็วที่แตกต่างกัน ค่า pH ที่ให้การฟอกจางสีอินดิโกคาร์มีนเกิดขึ้นได้เร็วที่สุดคือ pH 9.0 ซึ่งสภาพเป็นเบส การใช้สัณฐานของเอนไซม์ในอุตสาหกรรมสิ่งทอส่วนใหญ่ น้ำทิ้งที่มีฤทธิ์เป็นเบส ข้อดีของเอนไซม์ในข้อนี้ อาจส่งผลให้การประยุกต์ใช้เอนไซม์ดังกล่าวในการบำบัดน้ำทิ้งอินดิโกคาร์มีนมีศักยภาพมากขึ้น อีกทั้งปริมาณการใช้เอนไซม์ที่น้อยและสามารถผลิตได้โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้โดยง่าย จึงน่าจะประหยัดต้นทุนด้วย ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

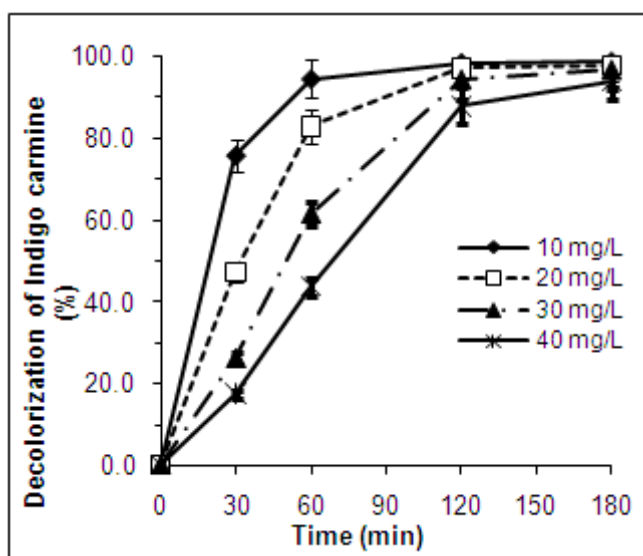


Fig. 6: Indigo carmine decolorization at different initial concentrations of synthetic dyes.

Reactions were performed with crude enzymes in McIlvaine buffer (0.2 U/mL reaction mixture) at pH 9.0 and 32 °C.

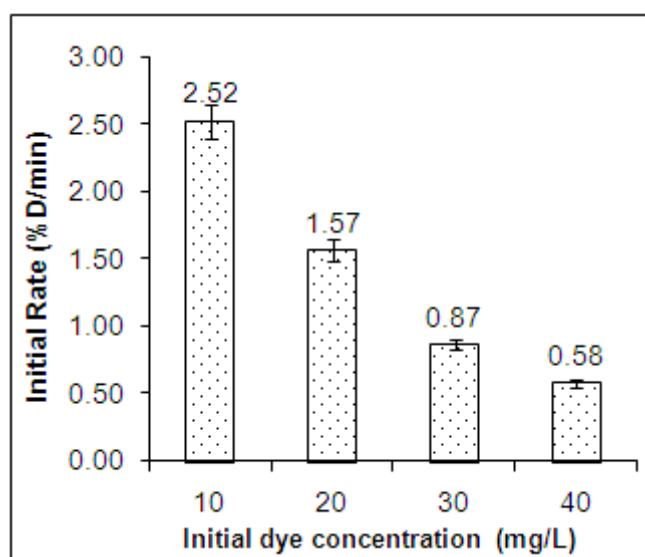


Fig. 7: Initial rate of indigo carmine decolorization at different initial dye concentrations.

Reactions were performed with crude enzymes in Mcllvaine buffer (0.2 U/mL reaction mixture) at pH 9.0 and 32 °C.

สีเคมีสังเคราะห์อื่นๆ

สี RBBR ฟอกจางได้สูงสุดประมาณ 57.6% ภายในเวลา 1 h ที่ pH 3.0 สี Bromophenol blue และ Methyl red ฟอกจางได้สูงสุดค่อนข้างต่ำที่ pH 4.0 และ 4.0-5.0 ตามลำดับ กล่าวคือ ประมาณ 37.0 และ 38.0% ภายในเวลา 16 h ผลดังแสดงใน **Table 1** การฟอกจางสี RBBR อาจให้ผลดีมากขึ้น หากใช้ปริมาณเอนไซม์มากขึ้น ส่วนการฟอกจางสี Bromophenol blue และ Methyl red อาจจำเป็นต้องใช้สารตัวกลางรีดอกซ์ (redox mediator) ร่วมด้วยจึงจะประสบผลสำเร็จดีขึ้น ควรมีการศึกษาต่อไป

Table 1: Decolorization percentages of four structurally different synthetic dyes by the crude enzymes from *Lentinus polychrous* Lév. at its pH optimum

Dye	pH optimum	Decolorization (%)
Indigo carmine ^a	9.0	86.0 ± 0.32
RBBR ^a	3.0	57.6 ± 0.22
Bromophenol blue ^b	4.0	36.7 ± 0.30
Methyl red ^b	4.0-5.0	38.0 ± 0.29

^a after 1 h and ^b after 16 h enzymatic treatment at 32 °C.
The final dye concentration was 20 mg/L. The crude enzyme in each reaction was 0.2 U/mL reaction mixture

การแยกบริสุทธิ์แลคเคส

สารสกัดเอนไซม์หยาบนำมาตกตะกอนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวในช่วง 40-85% แยกบริสุทธิ์โดยผ่านลงคอลัมน์ Con A-sepharose, DEAE-cellulose และตามด้วย Superdex 200 HR ตามลำดับ รูปแบบการแยกบริสุทธิ์โปรตีนจากคอลัมน์ต่างๆ ดังแสดงใน **Fig. 8-10** เอนไซม์เมื่อผ่านขั้นตอนแยกบริสุทธิ์ดังกล่าวมีค่า specific activity เท่ากับ 68.08 U/mg โปรตีน คิดเป็นบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากส่วนสกัดเอนไซม์หยาบประมาณ 9.7 เท่า ผลสรุปดังแสดงในตารางที่ 2 (**Table 2**) เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ภายหลังขั้นตอนสุดท้ายด้วยเทคนิค Tricine-SDS-PAGE พบว่ามีแถบโปรตีนมากกว่า 3 แถบซึ่งแสดงว่าโปรตีนยังไม่บริสุทธิ์ (**Fig. 11**) โปรตีนทั้ง 3 แถบซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกันมาก คือ 65.6 52.6 และ 44.8 kDa ประกอบกับผลจาก Native-PAGE บ่งชี้ให้เห็นว่าโปรตีนทั้ง 3 แถบแสดงกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (**Fig. 12a,b**)

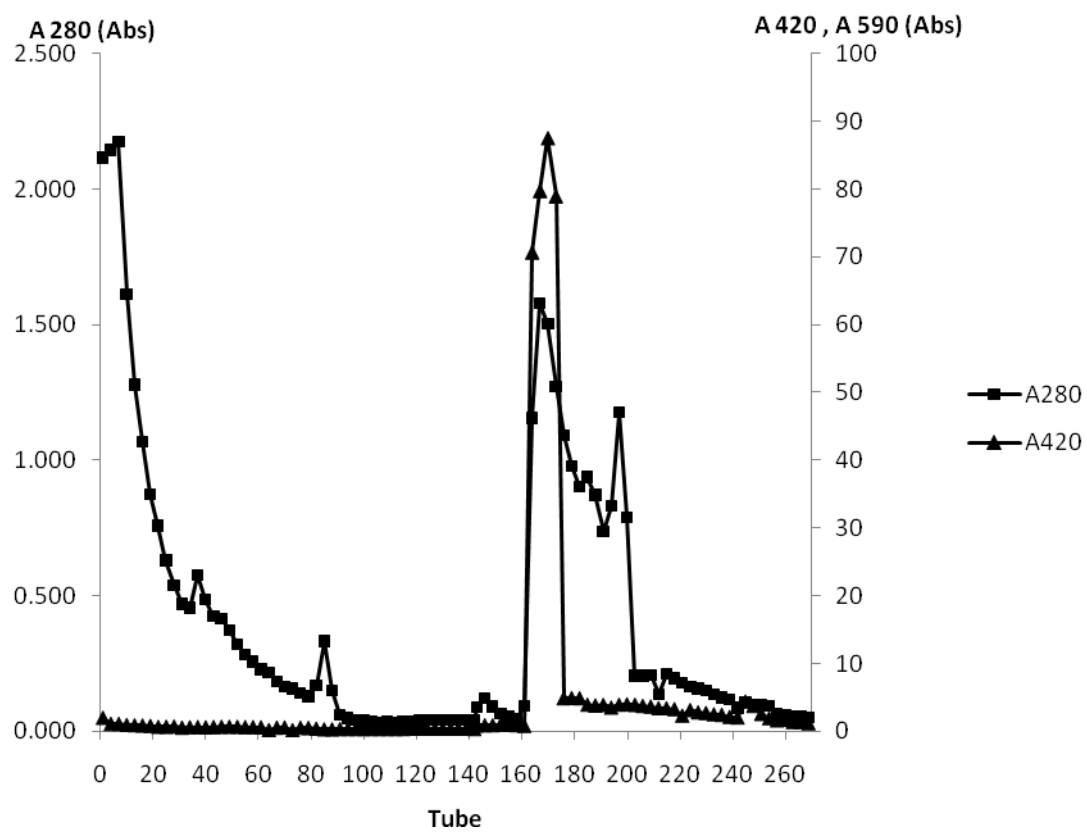


Fig. 8: Con A-sepharose affinity chromatography profile of 40-85% saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fraction.

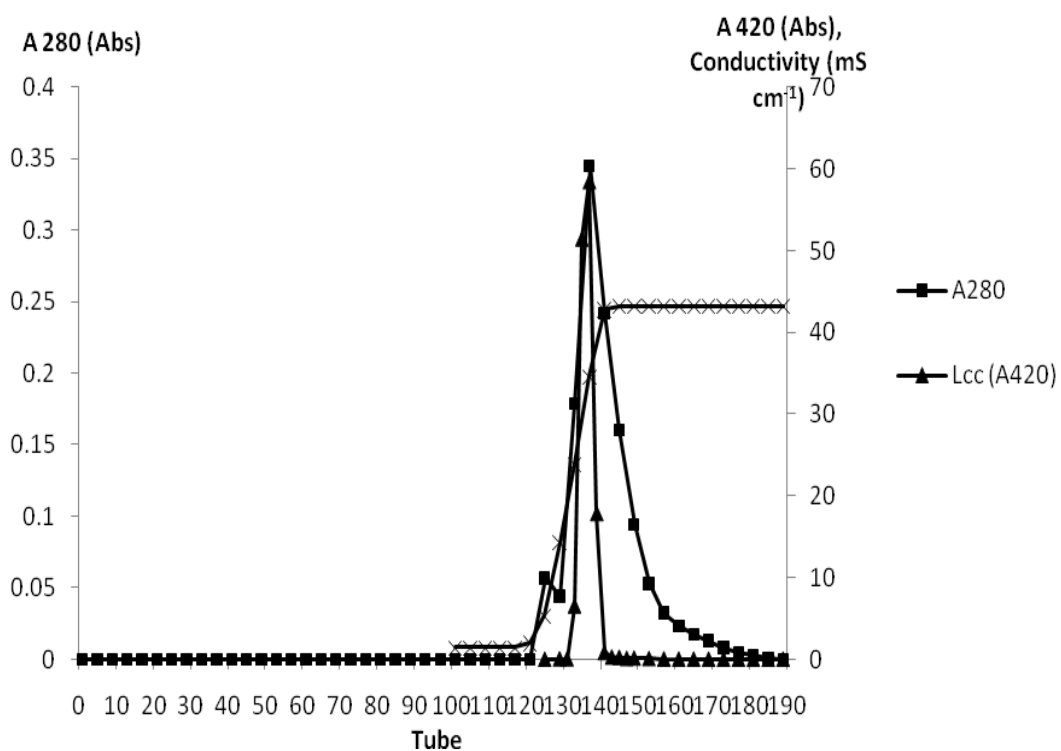


Fig. 9: DEAE-cellulose anion exchange chromatography profile of Con-A fraction.

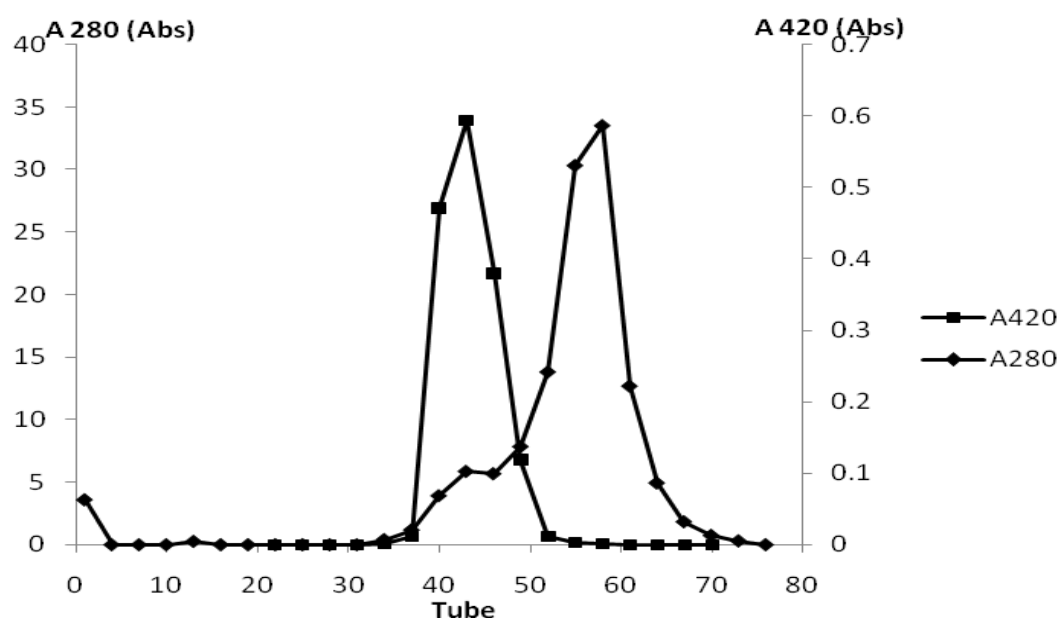


Fig. 10: Superdex 200 HR gel filtration chromatography profile of DEAE fraction.

Table 2: Purification table of laccase secreted by *Lentinus polychrous* Lév.

Purification step	Volume (mL)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purity (Fold)
Crude extract	100	758.00	108.40	6.99	100	1.0
40-85% sat. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	17	530.40	66.47	7.98	69.97	1.1
Con A Sepharose column	21	150.99	2.94	51.36	19.92	7.4
DEAE-cellulose column	52	44.04	1.14	38.50	5.81	5.5
Superdex 200 HR column	15	25.53	0.38	68.08	3.37	9.7

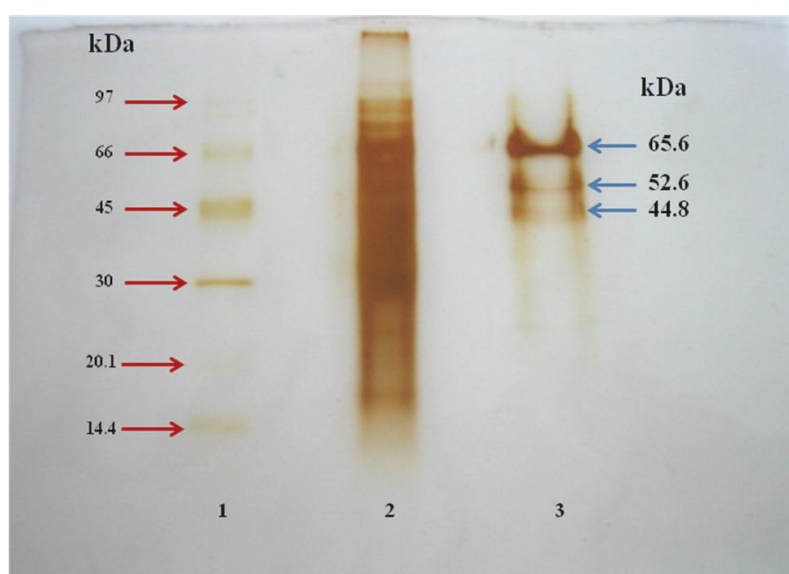


Fig. 11: Tricine-SDS-PAGE (12%), silver staining of purified laccase from *Lentinus polychrous* Lev. Lane 1; protein markers, lane 2; Crude enzyme, lane 3; purified laccase (after Superdex 200 HR)

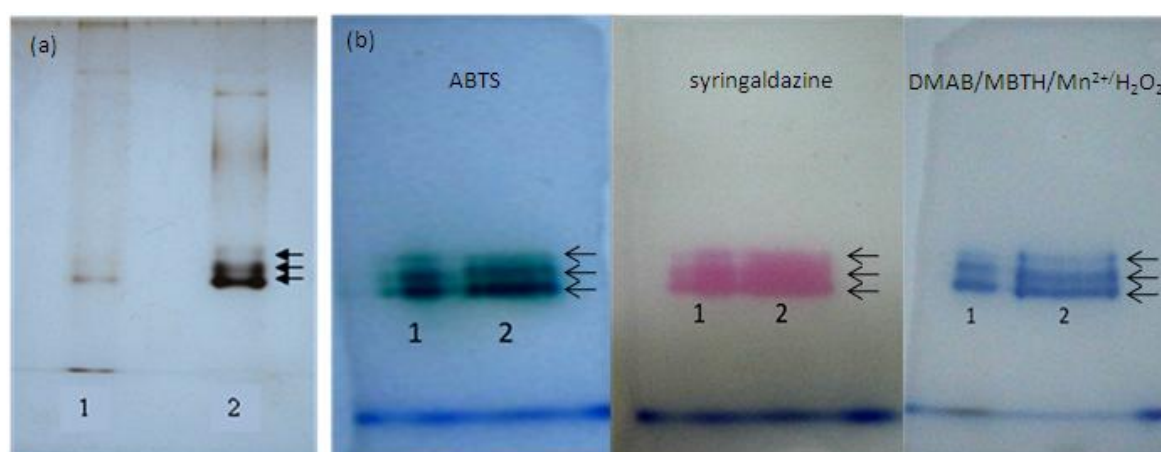


Fig. 12: Native-PAGE (12% gel), silver staining of purified laccase from *L. polychrous* Lév. (a) and zymograms stained with ABTS, syringaldazine and peroxidase substrate (b) lane 1: crude enzyme, lane 2: purified laccase

การศึกษาสมบัติของแลคเคส

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของแลคเคส คือ 50 °C ใน 0.1 sodium acetate buffer pH 4.5

โดยใช้ ABTS เป็นสับสเตรท ดังแสดงใน Fig. 13

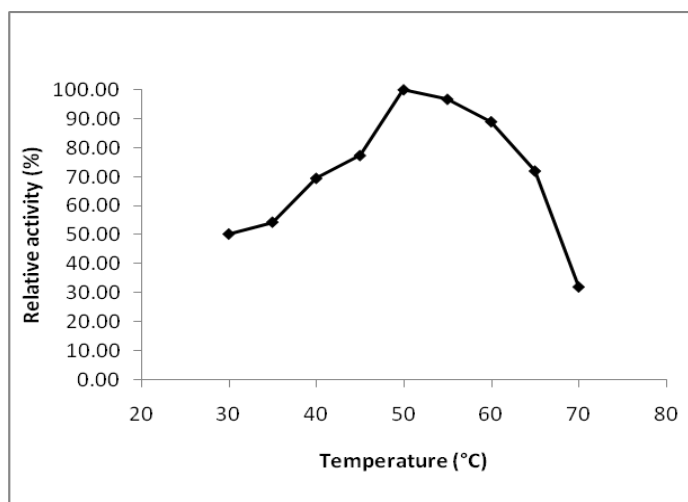


Fig. 13: Temperature optimum of purified laccase

ค่า pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของแลคเคสจากเชื้อเห็ดบดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสับสเตรทที่ใช้ กล่าวคือ ใน sodium acetate buffer pH 4.5 (ABTS), pH 4-4.5 (DMP) และ pH 4.5-5 (Guaiacol) ดังแสดงใน Fig. 14 นอกจากนี้ชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้ก็มีอิทธิพลด้วย เช่นเมื่อใช้ ABTS เป็นสับสเตรทใน citrate-phosphate buffer สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของแลคเคสจากเชื้อเห็ดบดคือ ช่วง pH 3-4 ดังแสดงใน Fig. 15

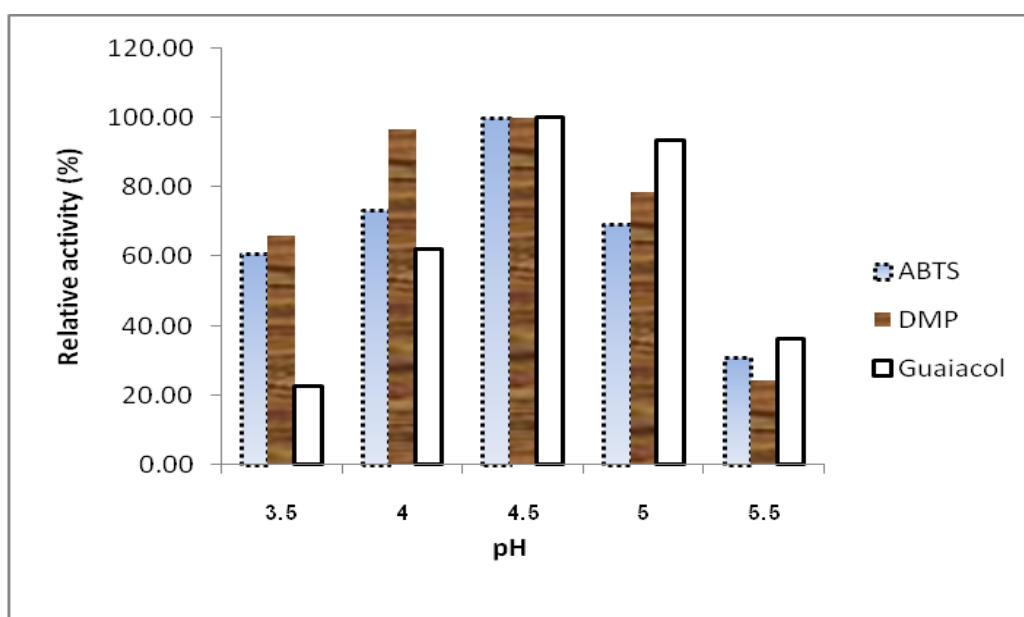


Fig. 14: Optimum pH of purified laccase using 0.1 M sodium acetate buffer

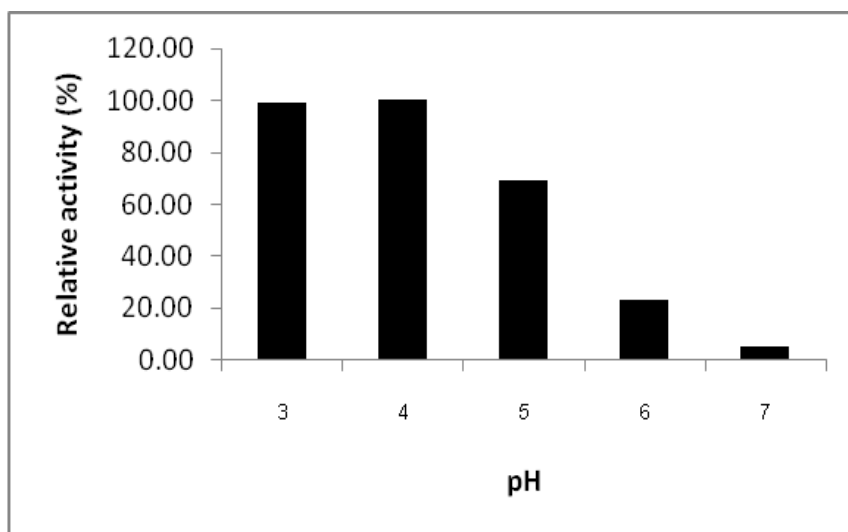


Fig. 15: pH optimum of purified laccase using citrate-phosphate buffer with ABTS substrate

อิทธิพลของ pH ต่อความเสถียรของแลคเคส ติดตามค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่บ่มไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ค่า pH ต่างๆในช่วง pH 3-7 (citrate-phosphate buffer) เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าในทุกๆ pH ที่ทดสอบกิจกรรมของแลคเคสลดลงประมาณ 50% ภายใน 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นกิจกรรมค่อนข้างคงที่ตลอด 1 เดือนที่ทำการติดตามในทุก pH ดังแสดงใน **Fig. 16**

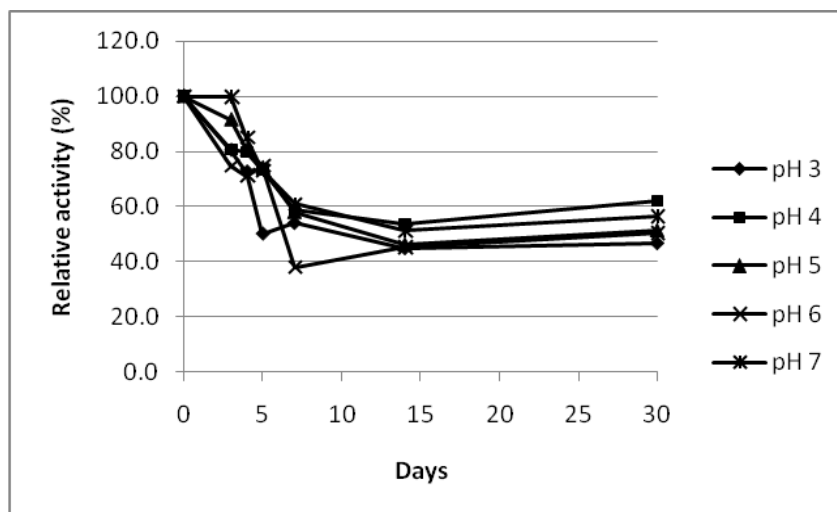


Fig. 16: pH stability of purified laccase at 4 °C

อิทธิพลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของแลคเคส ติดตามวัดกิจกรรมของแลคเคสทุกๆ 1 h หลังจากการบ่มเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ ในช่วง 30-60 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าแลคเคสมีเสถียรภาพดีที่อุณหภูมิ 30-40 °C มีเสถียรภาพค่อนข้างดีที่อุณหภูมิ 50 °C โดยมีกิจกรรมเหลืออยู่ประมาณ 80% เมื่อเวลาผ่านไป 1 h และประมาณ 50% ที่เวลา 2 h แต่แลคเคสสูญเสียกิจกรรมไปอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 60 °C ดังแสดงใน **Fig. 17**

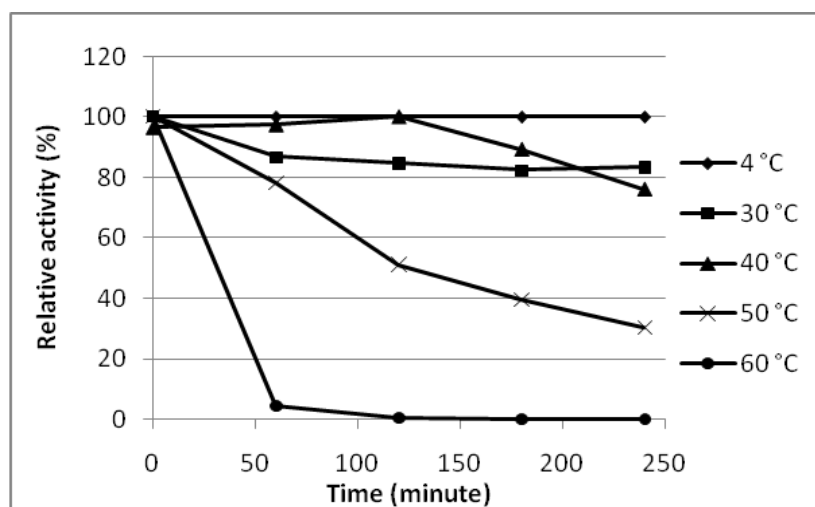


Fig. 17: Temperature stability of purified laccase at sodium acetate, pH 4.5

ผลของตัวยับยั้งและไอออนของเกลือและโลหะหนักต่อกิจกรรมของแลคเคส วัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้ ABTS เป็นสับสเตรทในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีตัวยับยั้งชนิดต่างๆหรือไอออนของเกลือและโลหะหนักอยู่ที่ความเข้มข้น (1-10 mM) ผลการทดลองพบว่าไอออนของโลหะต่างๆมีผลยับยั้งกิจกรรมของแลคเคสในระดับที่ต่างกัน ยกเว้นคอปเปอร์ (Cu^{2+}) และแคดเมียม (Cd^{2+}) ที่นอกจากจะไม่ยับยั้งกิจกรรมของแลคเคสแล้วยังมีผลกระตุ้นด้วย ส่วนแมกนีเซียม (Mg^{2+}) และแคลเซียม (Ca^{2+}) ยับยั้งกิจกรรมของแลคเคสจากเชื้อเห็ดบดประมาณ 50% ที่ความเข้มข้น 5 mM โคบอลต์ (Co^{2+}) และแมงกานีส (Mn^{2+}) ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้มากกว่า 50% ที่ความเข้มข้นดังกล่าว ดังแสดงในตารางที่ 3 (Table 3) และ SDS (10 mM) ยับยั้งเอนไซม์ได้ประมาณ 20% ขณะที่ citric acid และ EDTA ที่ความเข้มข้นดังกล่าวส่งผลให้สูญเสียกิจกรรมแลคเคสประมาณ 50% ส่วน *p*-coumaric acid ที่ความเข้มข้นเพียง 0.1 mM สูญเสียกิจกรรมไปกว่า 50% และที่ความเข้มข้นนี้ของ tropolone แลคเคสสูญเสียกิจกรรมไปกว่า 60% ส่วน DTT, TGA, NaN_3 และ cysteine กิจกรรมแลคเคสสูญเสียไปทั้งหมด 100% ดังแสดงในตารางที่ 4 (Table 4)

Table 3: Effect of salt and heavy metal ions on laccase activity of *L. polychrous* Lév.

Metal ions	Relative activity (%)		
	1 mM	5 mM	10 mM
No	100	-	-
Cu ²⁺	114.49	112.21	116.64
Cd ²⁺	108.60	109.05	128.40
Na ⁺	99.82	73.02	59.17
K ⁺	89.85	63.42	52.45
Co ²⁺	81.80	44.31	27.62
Mg ²⁺	80.16	50.53	32.33
Ca ²⁺	78.78	52.90	36.08
Mn ²⁺	73.66	44.44	28.07

Table 4: Effect of inhibitors on laccase activity of *L. polychrous* Lév.

Inhibitor (mM)	Relative remaining activity (%)								
	EDTA	Citric acid	<i>p</i> -Coumaric acid	SDS	Tropolone	DTT	TGA	NaN ₃	Cysteine
0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
0.1	100.2	101.4	51.8	100.3	39.6	0.0	0.0	0.0	0.0
0.5	98.0	94.8	31.5	103.1	24.5				
1.0	94.8	61.7	21.4	99.6	18.7				
10.0	48.9	53.2	0.0	84.0	6.6				

ศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์แลคเคสที่ผ่านการแยกบริสุทธิ์ โดยการวัดอัตราเร็วเริ่มต้นในการทำปฏิกิริยาระหว่างสับสเตรทที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กับเอนไซม์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของแลคเคส สำหรับสับสเตรทแต่ละชนิด เริ่มปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ทำการวัดอัตราเร็วปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่อง UV-Vis spectrophotometer (hp 8453, Hewlett packard) ที่ λ_{\max} ของสับสเตรทแต่ละชนิด โดย ABTS ที่ความเข้มข้น 0.1-2.0 mM ทำการวัดอัตราเร็วเริ่มต้นปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 420 nm ปริมาณโปรตีนที่ใช้ทำปฏิกิริยา 0.012 μg DMP ที่ความเข้มข้น 1-16 mM ทำการวัดอัตราเร็วเริ่มต้นปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 468 nm และ Guaiacol ที่ความเข้มข้น 0.25-8.0 mM ทำการวัดอัตราเร็วเริ่มต้นปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 436 nm ปริมาณโปรตีนที่ใช้ทำปฏิกิริยาสำหรับ DMP และ Guaiacol คือ 0.225 μg นำมาพล็อตกราฟแบบ Lineweaver-burke (Fig. 18) และค่า K_m และ V_{\max} ของสับสเตรทแต่ละชนิดแสดงดังตารางที่ 5 (Table 5)

Table 5: Kinetics properties of *L. polychrous* Lév laccase towards laccase substrates

Substrate	K_m (μM)	V_{\max} ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}$)	V_{\max} / K_m
ABTS	19.2	8.347	0.4350
DMP	185	4.649	0.0251
Guaiacol	472	4.902	0.0104

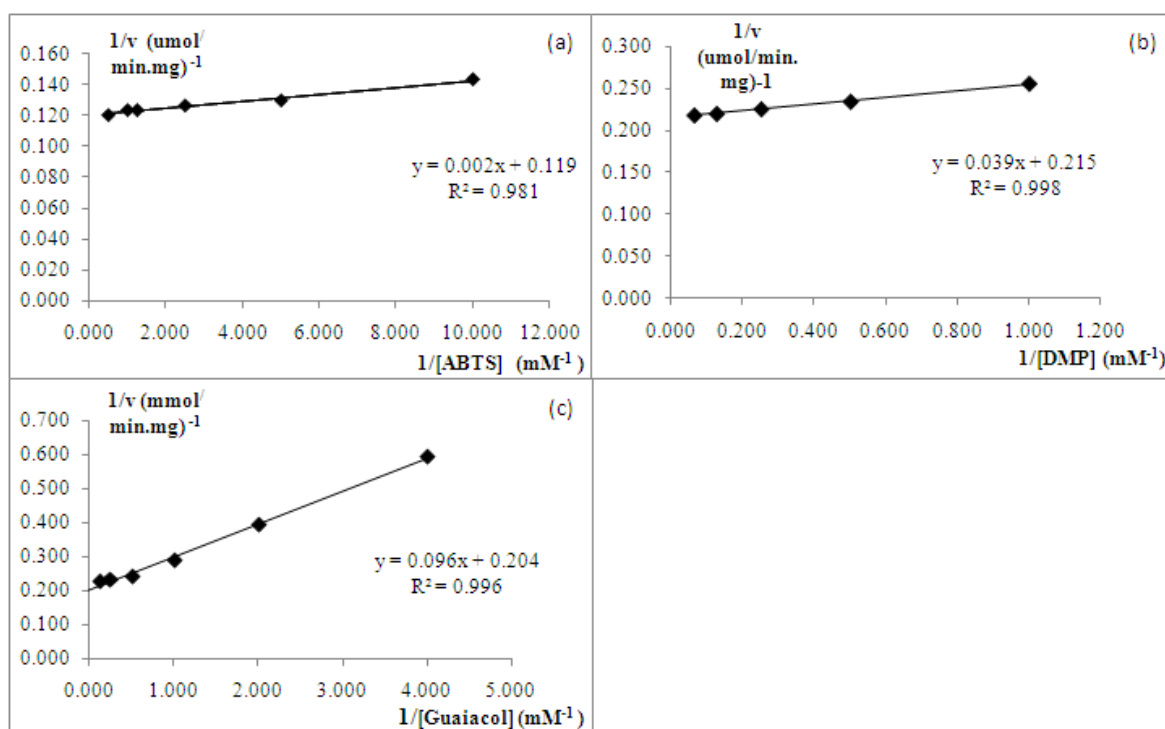


Fig. 18: Lineweaver-burke plots of substrates ABTS (a), DMP (b) and Guaiacol (c)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

วัสดุทางการเกษตรแกลบและรำข้าวมีศักยภาพสูงในการเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อเห็ดลมเพื่อผลิตเอนไซม์แลคเคส โดยอาหารสูตรผสมระหว่างแกลบและรำข้าว (2:1 โดยน้ำหนัก) ให้กิจกรรมรวมแลคเคสสูงที่สุด 1,425 U/L ด้วยค่ากิจกรรมจำเพาะ 10.0 U/g สับสเตรต นอกจากแลคเคสแล้วสารสกัดเอนไซม์หยาบจากเชื้อเห็ดชนิดนี้ยังมีกิจกรรมของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสทั้งชนิดต้องการและไม่ต้องการแมงกานีส โดยพบในสัดส่วนของแลคเคส :แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส :แมงกานีสอินดิเพนเดนท์ เปอร์ออกซิเดส เท่ากับ 1.9: 1.4: 1 ตามลำดับ การผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณที่สูงและใช้วัสดุเพาะเลี้ยงราคาถูกนี้คาดว่ามีความศักยภาพสูงในการประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรม สารสกัดเอนไซม์หยาบสามารถฟอกจางสีอินดิโกคาร์มินได้อย่างมีประสิทธิภาพในสภาวะที่มีความเป็นเบส (pH 9.0) จึงมีศักยภาพสูงในการประยุกต์ใช้เอนไซม์นี้สำหรับฟอกจางสีดังกล่าวในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมสิ่งทอซึ่งโดยปกติ

จะมีสภาพเป็นเบส จากการศึกษายแยกบริสุทธิ์เอนไซม์จากเชื้อเห็ดชนิดนี้โดยการตกตะกอนเกลือ แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40–85% และเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีได้แก่ Concanavalin A, DEAE-cellulose และ Superdex 200 HR เพื่อศึกษาสมบัติบางประการ พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน ประกอบด้วย 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 μ M) มากกว่า 2,6-dimethoxy-phenol (DMP) (K_m 185 μ M) และ guaiacol (K_m 472 μ M) ตามลำดับ โดยมีค่า V_{max} สำหรับสับสเตรตดังกล่าวเท่ากับ 8.35, 4.65 และ 4.90 μ mol min⁻¹ mg⁻¹ ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

ที่น่าสนใจมากคือเมื่อย้อมเจลที่รันในสภาพไม่ทำลายสภาพธรรมชาติ (native-PAGE) แล้วย้อมด้วยสับสเตรตของเอนไซม์ย่อยลิกนินแต่ละชนิด ปรากฏว่ากิจกรรมของทั้งเอนไซม์แลคเคส MnP และ MIP นั้นเกิดจากโปรตีนแถบเดียวกันทั้ง 3 แถบ ซึ่งโปรตีนทั้ง 3 แถบมีขนาดที่ใกล้เคียงกันมากและการแสดงกิจกรรมของเอนไซม์เหมือนกันนั้น อาจเป็นแลคเคสไอโซเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อสับสเตรตต่ำ หรืออาจเป็นไปได้ว่าโปรตีนเดียวกันแต่มีกิจกรรมเอนไซม์ได้มากกว่า 1 ชนิด (multifunctional enzyme) จึงควรมีการศึกษาต่อไปเพื่อให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับสมบัติของเอนไซม์ที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ โดยเชื้อเห็ดชนิดนี้ ความสัมพันธ์ของโครงสร้างและหน้าที่ กลไกการเร่งปฏิกิริยา การโคลนนิ่งและการแสดงออกของยีน รวมทั้งในแง่ของการประยุกต์ใช้เอนไซม์ในด้านต่างๆ อย่างเป็นรูปธรรม เช่น ระบบ

เอนไซม์บำบัดหรือชีวบำบัดน้ำทิ้งสีจากโรงงานอุตสาหกรรมสิ่งทอ การกำจัดลิกนินและการฟอกเยื่อกระดาษ รวมทั้งบำบัดดินที่ปนเปื้อนสารเคมีอันตราย เป็นต้น

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Sarnthima, R.*, S. Khammuang and J. Svasti (2009) Extracellular Ligninolytic Enzymes by *Lentinus polychrous* Lév. under Solid-State Fermentation of Potential Agro-industrial Wastes and Their Effectiveness in Decolorization of Synthetic Dyes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* (in press). Peer reviewed.

Impact factor = **1.653** (2008)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
 - หัวข้อวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโทของนิสิต จำนวน 1 คน คือ นางสาวพิมพ์ใจ สุวรรณวงศ์ รหัส 50010250105
- อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)
 - โปสเตอร์เสนอผลงานในการประชุมวิชาการ 8th Thailand research fund annual conference, Thailand October 16-18, 2008 เพชรบุรี

เรื่อง "Laccases production by *Lentinus polychrous* Lev. under solid-state fermentation of potential agro-industrial wastes and indigo carmine decolourisation"

- โพสต์เตอร์เสนอผลงานในการประชุมวิชาการ 6th PERCH-CIC Conference, Thailand May 3-6, 2009 ชลบุรี

เรื่อง "Purification and Synthetic dyes Decolorization of Laccases from *Lentinus polychrous* Lev."

- โพสต์เตอร์เสนอผลงานในการประชุมวิชาการ 2th BMB Conference, May 7-8, 2009 ขอนแก่น Thailand


เรื่อง "Decolorization of synthetic dyes, Rhodamine B and Congo red by partial purified laccase from *Lentinus polychrous* Lev."

ภาคผนวก

ก. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

Extracellular Ligninolytic Enzymes by *Lentinus polychrous* Lév. under Solid-State Fermentation of Potential Agro-industrial Wastes and Their Effectiveness in Decolorization of Synthetic Dyes. Peer reviewed. Impact factor = **1.653** (2008)

Extracellular Ligninolytic Enzymes by *Lentinus polychrous* Lév. under Solid-State Fermentation of Potential Agro-industrial Wastes and Their Effectiveness in Decolorization of Synthetic Dyes

Rakrudee Sarnthima,¹  Saranyu Khammuang,¹ Jisnuson Svasti²

¹Protein and Enzyme Technology Research Unit and Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahasarakham University, Maha Sarakham 44150 Thailand

²Center of Protein Structure and Function and Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

 Corresponding Author: Rakrudee Sarnthima

Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahasarakham University, Maha Sarakham 44150 Thailand

Tel.: +66 43 754246

Fax: +66 43 754246

E-mail: R. Sarnthima (rakrudee.s@msu.ac.th)

Abstract

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. Enzyme production was markedly different according to the substrate used. Rice bran (RB) yielded the highest laccase activity of 1,449 U/L (after 21 days of culture) with specific activity of 4.4 U/g substrate. Rice bran supplemented with rice husk (RH) (2:1 by wt) showed high laccase activity of 1,425 U/L with specific activity of 10.0 U/g substrate (after 17 days of culture). The crude enzyme of the RH-RB 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. Zymogram studies showed the same isoenzyme pattern with these ligninolytic enzymes. The high enzyme production level and low substrate cost of SSF- *L. polychrous* Lév. suggest that it has potential for industrial applications. 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) at an initial dye concentration of 10 mg/L. 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 synthetic dyes.

Key words: laccase, ligninolytic enzyme, *Lentinus polychrous* Lév., solid-state fermentation, agricultural wastes, decolorization

1. INTRODUCTION

Among the ligninolytic enzymes, laccase (EC 1.10.3.2; benzenediol:oxygen oxidoreductases), a copper-containing oxidase, is of great interest due to its broad range of substrates, which include polyphenols, aromatic amines, polycyclic aromatic hydrocarbons and synthetic dyes [1]. Moreover, other non-phenolic compounds, and redox mediators such as *N*-hydroxybenzothiazone and 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) diammonium salt (ABTS) have also been reported to be substrates [2]. This enzyme shows high potential for application in various industries, such as pulp and paper delignification [3,4], dye decolorization, waste water and contaminated soil treatment [5-7], as well as uses in organic synthesis [8], biosensor applications [9] and inhibition of HIV-1 reverse transcriptase [10].

However, a major limitation for extensive industrial application of fungal enzymes is their high cost. Therefore, culture conditions need to be optimized to increase the productivity of enzymes to reduce investment cost. An interesting approach is to use lignocellulosic wastes, which may contain significant concentrations of nutritive substances and inducers of ligninolytic enzymes [11]. These agro-industrial wastes can be used

to support fungal growth by solid state fermentation (SSF), where microorganisms are grown on solid materials in the absence or near absence of free water [12]. Several agricultural by-products have been successfully used in SSF for the production of ligninolytic enzymes by several white-rot fungi [13-17; for review see ref. 18].

Apart from laccase, other ligninolytic enzymes such as Manganese peroxidase (MnP, EC 1.11.1.13) and Lignin peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14) are directly involved in the degradation of lignin by fungi. MnP or Mn-dependent peroxidase, catalyse the oxidation of phenolic compounds and aromatic amines in the presence of Mn^{2+} , whereas Mn-independent peroxidase (MIP) does not require Mn^{2+} to catalyse such reactions: both can oxidize both phenolic- and non-phenolic lignin. LiP catalyzes the oxidation of non-phenolic aromatic lignin moieties and similar compounds. MnP, MIP and LiP are heme-containing enzymes which require H_2O_2 as co-substrate in the enzymatic reaction [19]. Some white rot fungi produce all three types of ligninolytic enzymes; some of them secrete only one or two types [20-23].

One basidiomycetous white rot fungus, *Lentinus polychrous* Lév., is classified in order Poreales, family

Lentinaceae [24]. The mushroom is edible and is a popular commercial mushroom in Thailand, in addition to *Lentinula edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sarjor-caju* and *Flammulina velutipes*, especially in the North and Northeast regions. Apart from being a good source of nutrition, the mushroom is also used as a major herb in several folk medicines [25, 26].

Pukahuta et al. (2004) has reported a combination of laccase, xylanase and cellulase in lignocellulose degradation by this white rot fungus [27]. In previous study, we have shown that the fungus secretes soluble proteins with some extracellular ligninolytic enzyme activity [28], mainly laccase and manganese peroxidase, into its culture substrate. Laccase was partially purified, characterized and studied in terms of its use for the decolorization of synthetic dyes [28].

This paper compares for the first time the ability of *L. polychrous* Lév. to produce extracellular ligninolytic enzymes from various plant raw materials by solid state fermentation. In addition, the ability of the extracellular enzymes to decolorize four structural different synthetic dyes including Bromophenol blue (triaryl methane), Indigo carmine (indigoid dye), Methyl red (azo dye) and Remazol Brilliant Blue R (RBBR) (anthraquinone dye) was

also investigated, to see which chemical classes of industrial dyes could be decolorized. Most of the dyes in these classes are hazardous, and many of them are experimental carcinogens according to material safety data sheet.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Chemicals and Materials

ABTS, MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone), DMAB (3, 3-dimethylaminobenzoic acid) and Remazol brilliant blue R (RBBR) were purchased from Sigma, USA. Bromophenol blue and MnSO_4 were from Carlo Erba, France. Potato dextrose agar (PDA) was purchased from HIMEDIA, India. Azure B and Indigo carmine were from Fluka, UK. Ethylenediaminetetraacetate (EDTA) was from Riedel-deHaën, Germany. Sodium acetate, Na_2HPO_4 and citric acid were purchased from BDH, England. Bio-Rad Protein Assay Reagent was purchased from Bio-Rad, USA. Methyl red and acetic acid were products of Merck, Germany. H_2O_2 was a product of UNIVAR, Australia. Sorghum seeds (SS), banana peel (BP) and sugarcane bagasse (CB) were obtained from the local market in Maha Sarakham province (Northeast, Thailand). Rice straw (RS) was obtained from the rice field, while rice husk (RH) and rice bran (RB) were

obtained from a local mill in Maha Sarakham province.

2.2 Microorganism

Lentinus polychrous Lév. was isolated from the Rujira mushroom farm in Ka La Sin province (Northeast, Thailand). It was maintained at 4 °C on PDA plates with periodic subculture.

2.3 Culture conditions

Prior to use, the sorghum seeds were boiled or soaked in water overnight. Rice straw was cut into pieces of about 2-3 cm and soaked under tap water for 48 h. Sugarcane bagasse was cut into small pieces of 2-3 cm, while banana peels were cut into small pieces of 0.3 cm x 2.0 cm. Cultures were performed in a cotton-plugged Erlenmeyer flask (125 ml) containing about 50 g of each agricultural material. Each single agricultural material or mixed agricultural materials (by wt.) of RH-RB (1:2), BP-RB (4:1), RS-RB (4:1), CB-RB (4:1), SS-RB (6:1), SS-RB (9:1) and SS-CB (4:1) was moistened by adding distilled water and then sterilized by autoclaving at 121 °C for 30 min. After cooling, the substrate was inoculated directly into the Erlenmeyer flasks with an agar plug (diameter 0.4 cm) cut out from the rim of a 5 day-old active growing fungus on PDA medium. The cultures

were kept under an air atmosphere at room temperature (approximately 30 ± 2 °C). The experiments were performed using three independent replicates. The data presented in the results correspond to average values with standard deviation.

2.3 Enzyme activity assay

The SSF samples were extracted with 0.05 M sodium acetate buffer, pH 4.5 (5 ml buffer per g of substrate), stirring for 30 min at room temperature. The suspension was filtered through cheesecloth to remove solid substrates, centrifuged (3,000 rpm, 10 min) and the supernatant was used in enzyme assays.

The laccase activity (Lcc) assay was based on the oxidation of ABTS, according to the modified method of Shin and Lee (2000) [29] as previously described [28]. Oxidation of ABTS was monitored by a spectrophotometer at 420 nm ($\epsilon = 3.6 \times 10^4$ /M.cm). However, ABTS may be sometimes oxidized by some peroxidases in the presence of H_2O_2 , so a more specific laccase substrate (0.2 mM) syringaldazine ($\epsilon = 6.5 \times 10^4$ /M.cm) was also used on occasions, following absorbance at 530 nm [30].

Lignin peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14) activity was measured using veratryl alcohol as substrate in the presence of H_2O_2 , as according to Collins *et al.* [31]. To avoid the interference of

phenolic compounds that might remain in the crude enzyme extract, as well as to determine whether LiP activity was present, the Azure B decolorization was also used according to the method of Archibald [32] with slight modifications. Briefly, Azure B reduction was measured at 32 °C after 50 min, 2 h and 24 h at 643 nm, using 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.5 instead of 0.05 M sodium tartrate buffer, pH 4.5.

Manganese peroxidase (MnP, EC 1.11.1.13) and manganese-independent peroxidase (MIP) activities were measured by a modified method of Ngo and Lenhoff [33] as described previously [34]. MBTH (3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone) and DMAB (3, 3-dimethylaminobenzoic acid) oxidation were measured in the presence of H₂O₂. MnP activity was corrected by the activity present in the reaction without manganese (MIP), where manganese sulfate was substituted by ethylene diaminetetraacetate (EDTA). All enzyme activities at each time point were reported as an average value ± SD of three culture flasks. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme required to oxidize substrate 1 µmole/min under each assay condition.

2.4 Enzyme activity on gel

To analyze isoform patterns of extracellular ligninolytic enzymes, native polyacrylamide gel electrophoresis (Native-PAGE), was performed with a 15% separating gel and a 4% stacking gel. Electrophoresis was performed at a constant 100 V for 60 min using a Mini-PROTEAN III (Bio-Rad). For activity staining, the gel was washed twice at room temperature with sodium acetate buffer (0.1 M, pH 4.5), and then stained with the substrate for each enzyme, including ABTS and syringaldazine for laccase activity, DMAB and MBTH in the presence of Mn²⁺ and H₂O₂ for MnP activity, with Mn²⁺ being replaced by EDTA when staining for MIP activity. After running, the gels were removed from the glass plates, rinsed twice with distilled water and then incubated with 10 mL of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.5), containing the specific substrate of each enzyme (final concentration of 0.1 mM), at 32 °C for about 10 min or until the activity band can be visualized.

2.5 Protein determination

Soluble proteins in the crude extract were determined by the Bradford method [35] using Bio-Rad Protein Assay Reagent (Bio-Rad) with bovine serum albumin as standard. In brief, 800 µL of BSA standard solution at a concentration

of 0-15 $\mu\text{g/mL}$ was pipetted into test tubes, and 200 μL of Bio-Rad Protein Assay Reagent was added. After mixing, the reaction was allowed to stand for 5 min and then absorbance at 595 nm was measured. Samples were analyzed in parallel with the standard, and reactions were performed in triplicate.

2.6 Indigo carmine dye decolorization

The synthetic dye indigo carmine (indigoid; CI 73015) was used to study decolorization activity of the crude enzyme of *L. polychrous* Lév., grown in the rice husk-rice bran medium (1:2 by wt), which had the highest laccase specific activity.

First, the pH optimum for decolorization was first studied. Reaction mixtures (2.0 mL) contained McIlvaine buffer (0.2 M Na_2HPO_4 /0.1 M citric acid) at pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 and 9.0, and enzyme solution (0.2 U/mL reaction mixture). Reactions were started by the addition of synthetic dye (final concentration of 20 $\mu\text{g/mL}$). The solutions were incubated at 32 °C and then samples were taken at 1 and 16 h. At each time point, the residual dye concentration was measured by a spectrophotometer (JENWAY 6400 LABQUIP, England) at the λ_{max} (610 nm) and the decrease absorbance at 610 nm expressed in terms of percentage calculated according to the

equation as previously described by Khammuang and Sarnthima (2007) [28].

The effect of dye concentrations was studied in McIlvaine buffer (pH 9.0). Reaction mixtures (5.0 mL) were incubated at 32 °C for 180 min containing enzyme (0.2 U/mL reaction mixture) and the dye at a final concentration of 10, 20, 30 and 40 $\mu\text{g/mL}$ reaction mixture.

Decolorization of other dyes by the crude laccase was also studied including Remazol brilliant blue R (RBBR, anthraquinone dye), Bromophenol blue (triaryl-methane dyes) and Methyl red (azo dye). The decolorization ability of each dye was followed by the decrease in absorption at the appropriate λ_{max} for each dye (RBBR at 593 nm, Bromophenol Blue at 592 nm and Methyl Red at 524 nm) at various pH condition (ranging from pH 2.0-9.0). Highest percent decolorization was used to determine optimum pH for decolorization.

3. RESULTS AND DISCUSSION

In this study, the laccase activity excreted by *L. polychrous* Lév. was investigated in fungus cultivated by SSF on agro-industrial by-products including SS, CB, RS, BP, RH and RB as the sole carbon source, without any mineral supplementation.

3.1 Laccase activity of single substrate formulas

Extracts from cultures were periodically assayed to determine the laccase activity and soluble protein content. Results of culture on different substrates are shown in **Fig. 1**, with laccase enzyme profiles shown in **Fig. 1b**, soluble protein content in **Fig. 1b**, and laccase specific activity in **Fig. 1c**. Interestingly, with the single substrate fermentations, rice bran gave the highest laccase activity of 1,449 U/L after 21 days of culture, while other substrates gave less than 200 U/L (**Fig. 1a**). Although the laccase activity was highest in the rice bran culture, the soluble protein content was also high compared to other substrates, which gave less than 0.1 mg/mL (**Fig. 1b**). Since the fungus grew at different rates on different agricultural substrates, cultures with more rapid growth were first sampled for enzyme activity at day-4, while cultures with slower growth were first sampled at day-7, and thereafter at periodic time points.

Most cultures showed a trend of increasing soluble protein content correlating with the laccase activity, although there several types of enzymes might be secreted apart from laccase, such as other ligninolytic enzymes (i.e. MnP, MIP, LiP) and carbohydrate

degrading enzymes (i.e. cellulases, xylanases).

When laccase specific activity was considered, the highest value was obtained with SS medium, amounting about 7.0 U/mg, compared to rice bran, which gave about 3.0 U/mg protein (**Fig. 1c**). Laccase activities per gram substrate obtained with different substrates are shown in **Fig. 2**. Rice bran also yielded highest laccase activity per gram of substrate (4.35 U/g) compared with other substrates.

When the fungus was cultured in a sweet sorghum formula (SS), maximum laccase activity was approximately 145 U/L (**Fig. 1b**) and specific activity was 7 U/mg protein (**Fig. 1c**), with a conversion efficiency of 0.42 U/g substrate (**Fig. 2**) after 15 days. This then sharply decreased to 20 U/L by day 21 of cultivation. The laccase activity in rice straw medium peaked after 21 days at 115 U/L (**Fig. 1b**) and decreased to 55 U/L at day 25.

In sugar cane bagasse culture, less than 10 U/L of laccase activity was observed through the three weeks of cultivation. However, the fungus grew well even though the content of laccase was very low, so other enzymes apart from laccase might be produced, such as carbohydrate degrading enzymes, e.g.

xylanases. This indicates that sugar cane bagasse may not a suitable substrate for laccase production by this fungus. However, successful laccase production with sugar cane bagasse has been reported with *Pycnoporus cinnabarinus* ss3 [14]. Laccase production in SS medium was better than in RS culture, but SS is more expensive than RS, which is available in enormous amounts as waste from rice fields. Niladevi and co-workers (2007) [15] have reported that rice straw was a suitable substrate for laccase production by *Streptomyces psammoticus* (17.3 U/g).

3.2 Laccase productions by mixed substrate formulas

In SS media supplemented with rice bran (9:1, 6:1 and 4:1 by wt), laccase activity reached peak values of 261, 186 and 119 U/L respectively (Fig. 3b). Specific activities were 8.42, 8.40 and 5.41 U/mg protein (Fig. 3c) and yields of 1.16, 1.07 and 0.36 U/g substrate (Fig. 2) were observed after 9, 8 and 7 days of culture, respectively. The small amount of rice bran supplemented to the SS culture helped in the production of higher laccase activity. Apart from ligninocellulosic components, RB contains vitamins which may promote growth promotion and

phenolic compounds that might be good inducers of ligninolytic enzyme production

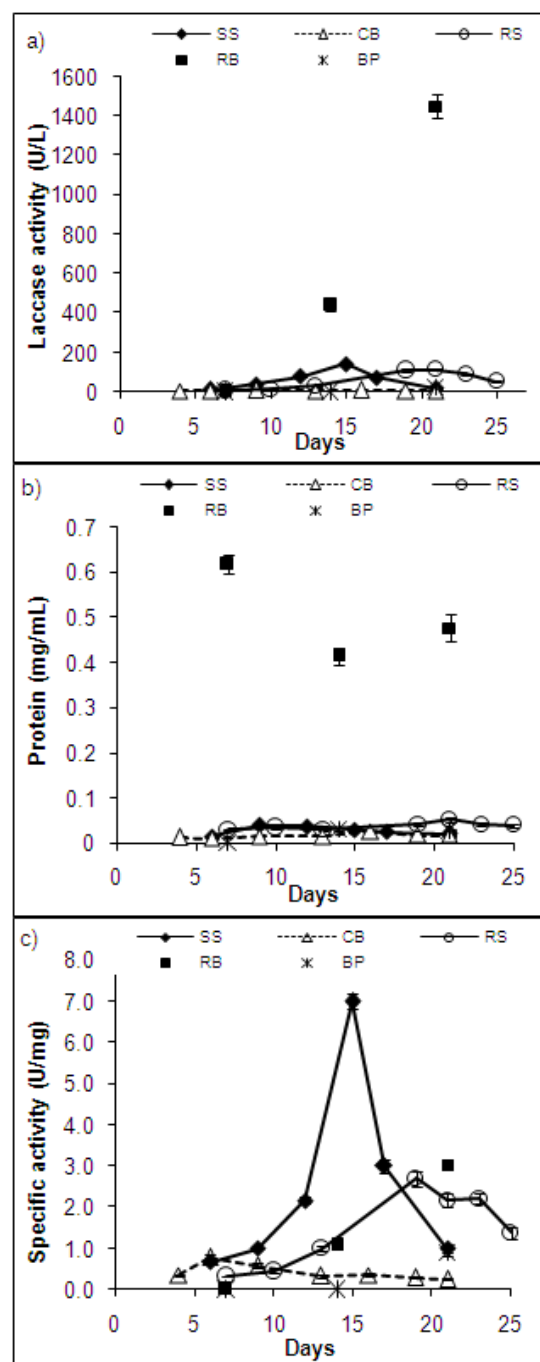


Fig. 1: Time course of enzyme activity and protein content of *Lentinus polychrous* Lév. grown on various single substrate agro-industrial wastes. (a) laccase activity, (b) soluble protein content and (c) laccase specific activity. SS (sorghum seed); CB (sugar cane bagasse); RS (rice straw); RB (rice bran); BP (banana peel)

[36]. Rice bran (20%) was also used as a supplement for *L. edodes* cultured on a medium composed of eucalyptus residues to improve growth and enzymic activities [16].

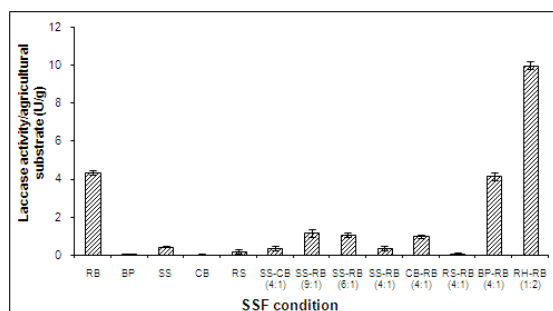


Fig. 2: Efficiency of laccase activity (U) produced per gram of single substrate and mixed substrate by solid state fermentation of *Lentinus polychrous* Lév., when grown on various single substrates and mixed agro-industrial wastes. SS-CB (sorghum seed-sugar cane bagasse); SS-RB (sorghum seed-rice bran); RH-RB (rice husk-rice bran); CB-RB (sugar cane bagasse-rice bran); RS-RB (rice straw-rice bran); BP-RB (banana peel-rice bran); SS (sorghum seed); CB (sugar cane bagasse); RS (rice straw); RB (rice bran); BP (banana peel)

In SS medium supplemented with CB, laccase activity and specific activity (**Fig. 3a, c**) reached a maximum value (126 U/L, 4.3 U/mg protein) after 13 days. Laccase activity was lower in RS, CB and SS media alone or when supplemented with CB or RB, compared to RH supplemented with RB. The highest laccase activity obtained was 1,425 U/L (**Fig. 3b**) or 15.6 U/mg protein (**Fig. 3c**) or 10.0 U/g substrate (**Fig. 2**) in RH-RB medium at day 17. This activity increased rapidly from day 7 to the last day of our

study, so higher levels of enzyme activity may be achieved with a longer cultivation time.

Rice husk is a by-product of rice milling and produced in enormous amounts each year in Thailand, so is very cost-effective. However, RH alone was not good enough as a substrate for laccase production on its own due to difficulty in degradation. But the mixture of RH and RB provided excellent results, although the ratio of the two substrates should be further optimized for the optimum and most economical enzyme production. Another report has shown that rice bran/wheat bran can be used as the sole carbon source for β -xylanase enzyme production, in this case a liquid culture of *S. actuosus* A-151 [17]. This reinforces the idea that bran contains valuable nutrients for microorganism growth.

However, the highest laccase production by *L. polychrous* Lév. under SSF in our study (1,425 U/L or 15.6 U/mg protein or 10.0 U/g substrate), obtained in rice husk-rice bran formula (RH-RB), was still much lower than that produced by *Trametes* sp. 420, grown in a glucose medium with induction by 0.5 mM Cu^{2+} and husk and rice bran as substrates, without supplementation with other carbon sources, nitrogen sources, minerals, or even inducers. Nevertheless, our study

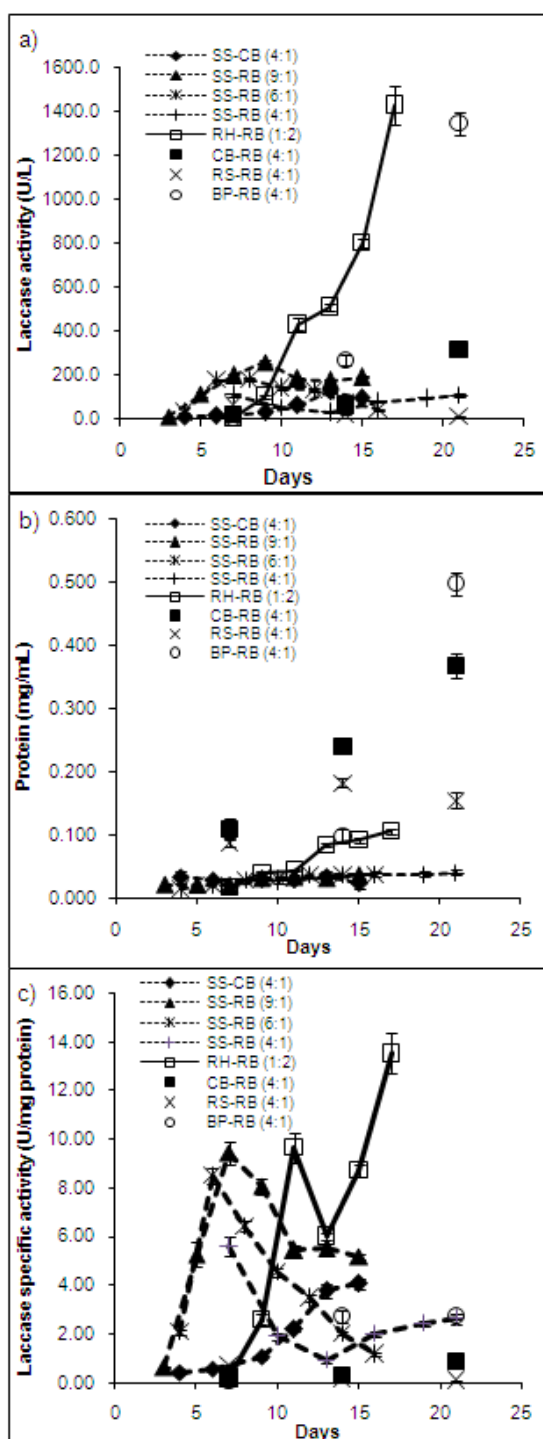


Fig. 3: Time course of enzyme activity and protein content of *Lentinus polychrous* Lév. grown on mixtures of agro-industrial wastes at various ratios. (a) laccase activity, (b) soluble protein content and (c) laccase specific activity. SS-CB (sorghum seed-sugar cane bagasse); SS-RB (sorghum seed-rice bran); RH-RB (rice husk-rice bran); CB-RB (sugar cane bagasse-rice bran); RS-RB (rice straw-rice bran); BP-RB (banana peel-rice bran)

(yielding 166.7 nkat/g substrate at 17 d after inoculation) was comparable to the maximum laccase activity from *Cerrena unicolor* T 71b (156 nkat/g substrate, 14 d after inoculation), also cultured on solid-state cultivation on oat husks, supplemented with 20% fiber and deinking sludge (FDS), as reported by Winquist *et al.*, 2008 [38]. The lower yield described with solid-state fermentation may be acceptable as SSF allows agricultural and environmental waste materials to be used, leading to lower substrate costs and eliminating disposal costs of such wastes incurred using more conventional methods [39]. In addition, since our studies were performed without supplementation, the addition of suitable carbon and nitrogen sources or suitable inducers may improve yields, which requires future study.

Apart from laccase activity, the crude enzyme in the RH-RB culture medium also contained MnP and MIP activities as shown in Fig. 4a. Like other white rot fungi, *L. polychrous* Lév. produces and secretes more than one ligninolytic enzyme activity, which may differ in the isozyme patterns, as well as in their proportions in each fungus. For example, *L. edodes* and *Pleurotus* species showed differences in lignocellulolytic enzyme activity in fermentation of tree

leaves [40]. Thus, SSF of tree leaves favored laccase and MnP secretion by the majority of *L. edodes* and *Pleurotus* strains, whereas submerged fermentation (SF) provided better production of hydrolytic enzymes [40]. However, LiP activity, which is believed to be a major lignin degrading enzyme [22], was not detected from our culture extract by the veratryl alcohol oxidation reaction. This implies that our fungus might not produce or secrete LiP under these culture conditions. This conclusion was confirmed by the lack of dye decolorization in Azure B assay, which shows less interference in LiP determination [32]. Even though LiP is believed to play a key role in lignin biodegradation, some white rot fungi produce other ligninolytic enzymes apart from LiP. *L. edodes* and many species of the genera *Pleurotus* were described as the producers of laccase and MnP [16,40-42] while *Trametes* sp., another white rot fungus, mainly produce laccases [37]. The fungus in our study has also been classified in the genus *Lentinus* sp., so like *L. edodes*, this fungus might not only produce LiP for lignin biodegradation. However, the nature and proportion of enzymes produced may depend on culture conditions, so the genes of each ligninolytic enzyme need to be further investigated in this fungus.

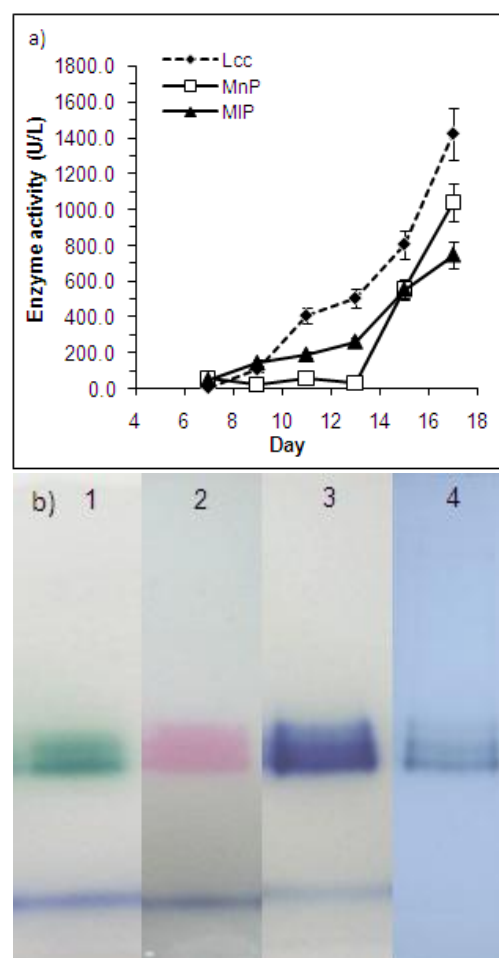


Fig. 4: Ligninolytic enzyme activity levels from *Lentinus polychrous* Lév. grown on rice husk-rice bran media (1:2 by wt). (a) Enzyme activity levels in relation to time, Lcc (laccase); MnP (manganese peroxidase); MIP (manganese-independent peroxidase) (b) Native-PAGE of extracts stained with substrates for different enzymes; 1, ABTS; 2, syringaldazine; 3, DMAB/MBTH/Mn²⁺/H₂O₂; 4, DMAB/MBTH/EDTA/H₂O₂

Interestingly, specific staining with each enzyme substrate showed that the Lcc, MnP, and MIP activities corresponded to the same three protein bands (**Fig. 4b**). This suggests that the three close bands might be similar isozymes having broad substrate specificities. Indeed, other studies have suggested that some peroxidase enzymes may be associated

with more than one activity, e.g. having both MnP and MIP activities [20,21], or having both MnP and LiP activities [22,23]. Further studies need to be performed to provide a more complete understanding of extracellular enzymes from this fungus. Purification and characterization of these enzymes are in progress in our laboratory.

3.3 Indigo carmine decolorization

Decolorization was initially performed at a concentration of 20 mg/L at various pH values (2.0-9.0) at 1 h and 16 h using the crude enzyme from RH-RB cultivation. In **Fig. 5**, significant decolorization of 86.0% and 93.1% were observed at pH 9.0 at 1 h and 16 h, respectively. Decolorization at pH 3.0 and pH 8.0 gave similar percentages at both 1 and 16 h. pH 5.0, while pH 6.0 showed similar levels of decolorization of about 15% in 1 h and above 70% in 16 h. Decolorization was also similar for pH 4.0 and 7.0 when observed at 1 h of enzymatic treatment, although a nearly complete decolorization (98.1%) occurred at pH 7.0 instead of 87.6% at pH 4.0 after 16 h. However, at pH 2.0, decolorization was only 17% at 1 h and 52.7% after 16 h of incubation. Moreover, at this pH, a high auto degradation of Indigo carmine dye was also observed (data not shown).

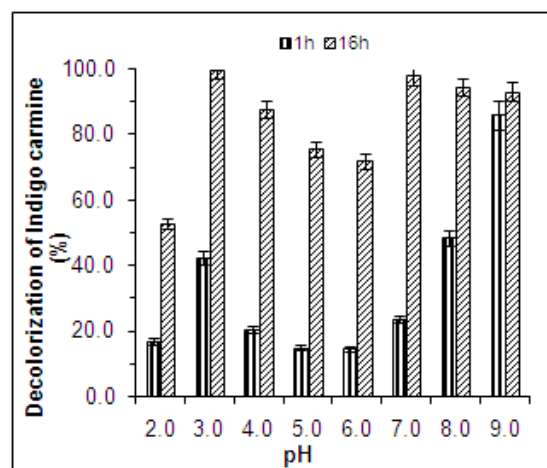


Fig. 5: Indigo carmine decolorization at different pH values. Reactions were performed in McIlvaine buffer containing crude enzyme 0.2 U/mL reaction mixture and dye final concentration of 20 mg/L reaction mixture, incubated at 32 °C.

Therefore, pH 9.0 was chosen to study the effect of initial dye concentration on decolorization of Indigo carmine. A time course of dye decolorization by the crude enzyme of *L. polychrous* Lév., at a fixed enzyme activity (0.2 U/mL), with different initial concentrations of substrate (10-40 mg/L), is shown in **Fig. 6**. The initial dye decolorization rate (2.5%D/min) was highest at the initial dye concentration of 10 mg/L and lower at higher initial dye concentrations (**Fig. 7**). At 180 minutes, all initial dye concentrations yielded greater than 90% decolorization, where 98.7, 97.6, 96.5 and 93.8% decolorization were achieved at initial dye concentrations of 10, 20, 30 and 40 mg/L, respectively (**Fig. 6**).

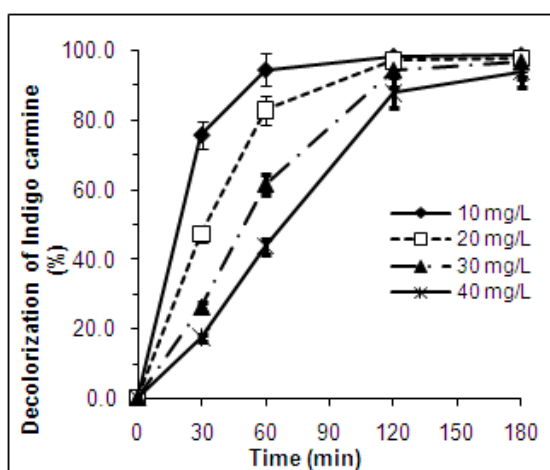


Fig. 6: Indigo carmine decolorization at different initial concentrations of synthetic dyes. Reactions were performed with crude enzymes in McIlvaine buffer (0.2 U/mL reaction mixture) at pH 9.0 and 32 °C.

Different sources of enzymes have been reported to have different optimum pH for Indigo carmine decolorization. In this work, the optimum pH for this dye decolorization was similar to that reported by Singh and co-worker (2007) [43], who showed that a new bacterial laccase from γ -proteobacterium degraded indigo carmine optimally at 55 °C and a pH of 9 in 0.1 M Tris-HCl buffer. However, our work clearly showed a higher percentage of decolorization. Effective decolorization in the work of Singh *et al.* (2007) [43] occurred only when some redox mediators were present in the reactions, which required use of high load enzyme, higher temperature and a longer time, and even then yielded less than 90% decolorization.

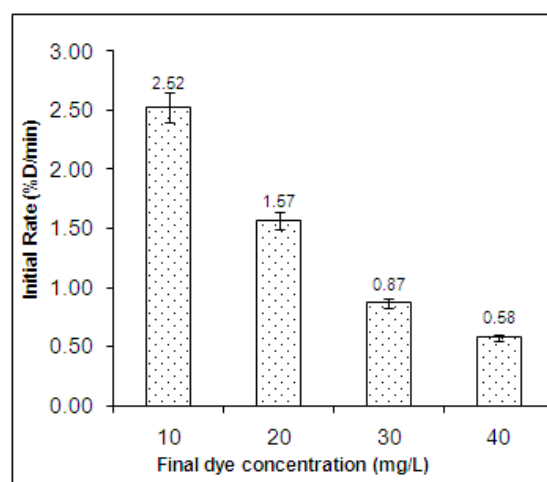


Fig. 7: Initial rate of indigo carmine decolorization at different initial dye concentrations. Reactions were performed with crude enzymes in McIlvaine buffer (0.2 U/mL reaction mixture) at pH 9.0 and 32 °C.

Comparison of Indigo carmine decolorization by other fungal enzymes showed that our enzyme appears to be more effective. Basto *et al.*, (2007) [44], showed the best results were obtained when the dye solution was treated with ultrasound and *T. villosa* laccase stabilized with polyvinyl alcohol, with about 65% of decolorization obtained within 1 h, compared to only 20% decolorization observed with the enzyme alone. In our work, at the same pH value, 15% decolorization was obtained after 1 h, but 75.5% after 16 h. In terms of economic considerations, our enzymes might be more effective because of their ability to work with higher dye concentrations, lower temperature and lower amounts of biocatalyst, in addition to not requiring ultrasound and/or other chemicals.

In a previous report, complete decolorization of indigo carmine was obtained by an alginate-immobilized laccase from *T. hirsuta* after more than 30 h of treatment [13] or about 3 days with immobilized fungal cells in a stainless steel sponge [45]. Camarero et.al (2005) [6] also reported a complete indigo carmine decolorization in less than 1 h when mediators were used with laccase from *T. villosa*. In our study, no mediators were required in the treatment, which is an advantage since they can be toxic, expensive and environmentally unfriendly [46].

At the initial dye concentration of 10 mg/L, Indigo carmine was almost completely decolorized within 1 h. Apart from the optimal alkali pH, neutral (pH 7.0) and acidic conditions (pH 3.0) also showed very high efficiency in decolorization of this dye. At other tested pHs (except pH 2.0), good decolorization activity was also obtained at longer times (**Fig. 5**). This broad pH range for Indigo carmine decolorization by the crude enzymes from *L. polychrous* Lév. has many potential applications. These results might be due to the crude enzyme preparation containing more than one ligninolytic enzyme responsible for Indigo carmine decolorization, differing in terms of optimum pH for catalytic activity or in

pH stability. From the results shown in **Fig. 4a&b**, the fungus also shows MnP and MIP activities apart from laccase, suggesting that the unusual multiple pH optima might be due to different ligninolytic enzyme activities, and high overall decolorization percentages might also result from the combined action of these ligninolytic enzymes. Further studies will be required to purify and characterize these enzymes to provide better understanding and optimize the decolorization process for future applications.

In terms of decolorization of other synthetic dyes, RBBR was decolorized by about 57.6% within 1 h at pH 3.0 (**Table 1**). For Bromophenol blue and Methyl red, decolorization occurred at very low levels at pH 4.0 and 4.0-5.0, respectively, yielding only 37.0 and 38.0% after 16 h of enzymatic treatment (**Table 1**). The optimal pH for RBBR decolorization by the crude enzyme from our study was more acidic than that of *Trametes trogii* laccase (pH 5.0) [47]. In their report, the decolorization of RBBR by the copper supplemented culture filtrate of *T. trogii* almost completely decolorized of RBBR within 8 h, which they explained by the high titer of laccase produced in the Cu-induced culture (nearly 10 U/ml).

In our results, RBBR decolorization by the crude enzyme from *L. polychrous* Lév. might have been more effective if higher amounts of enzyme were used. The results showed less efficient decolorization of Bromophenol blue and Methyl red by the crude enzyme from this fungus. Effective Bromophenol blue decolorization has been reported at 85% within 7 h and 98% within 120 h using batch conditions with a high titer of *T. hirsute* laccase [48]. *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360 can decolorize 100% Methyl red (100 mg/L) within 1 h in de-ionized water at 30 °C and the degradation occurred over a broad pH range (3-12) and temperature range (5-50 °C) [49]. Decolorization of these two dyes by the *L. polychrous* Lév. might be better if appropriate redox mediators were used. Due to differences in the core structure of those four synthetic dyes tested, the ability of the enzymes to catalyze the oxidation of each dye is related to the structure of the dye [50]. The indigoid dye, Indigo carmine, showed much more promise over the others. Decolorization with the aid of redox mediators as well as the large scale application of the enzyme secreted by the fungus is also being studied in our laboratory.

Table 1: Decolorization percentages of four structurally different synthetic dyes by the crude enzymes from *Lentinus polychrous* Lév. at its pH optimum

Dye	pH optimum	Decolorization (%)
Indigo carmine ^a	9.0	86.0 ± 0.32
RBBR ^a	3.0	57.6 ± 0.22
Bromophenol blue ^b	4.0	36.7 ± 0.30
Methyl red ^b	4.0-5.0	38.0 ± 0.29

^a after 1 h and ^b after 16 h enzymatic treatment at 32 °C. The final dye concentration was 20 mg/L. The crude enzyme in each reaction was 0.2 U/mL reaction mixture

4. CONCLUSION

The white-rot fungus *Lentinus polychrous* Lév., grown on solid-state fermentation of rice husk and rice bran (1:2 by wt) as a sole carbon source, produced high amounts of laccase activity at 1,425 U/L or 15.6 U/mg protein or 10.0 U/g substrate after 17 days in culture. Other ligninolytic enzymes activities such as MnP and MIP were also found in different proportions relative to laccase activity, with activity (U/mL) ratio of laccase:MnP:MIP being 1.9:1.4:1. The high enzyme levels produced together with the very low cost of the substrate suggest that SSF- *L. polychrous* Lév. has potential for industrial purposes. This crude enzyme was very effective in the *in vitro* decolorization of Indigo Carmine dye at pH 9.0, achieving complete decolorization within 2 h at 32 °C. These results show the biotechnological potential of ligninolytic enzymes from *L. polychrous* Lév. in the

textile dyeing industry, especially in the decolorization of Indigo Carmine.

Acknowledgements

This work was supported by the Mahasarakham University Science Faculty, (Fiscal year 2007) and in part by the Thailand Research Fund-Commission of Higher Education (TRF-CHE) under Rakrudee Sarnthima grant no. MRG5080224. We would like to thank the Rujira mushroom farm for providing the mushroom samples. The authors also would like to thank C. Thetsrimuang, P. Suwannawong for laboratory help and PERCH-CIC, Department of Chemistry, Faculty of Science at Mahasarakham University.

REFERENCES

- [1] Solomon, E. I., U. M. Sundaram, and T. E. Machonkin (1996) Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96: 2563-2605.
- [2] Majcherczyk, A., C. Johannes, and A. Hüttermann (1999) Oxidation of aromatic alcohols by laccase from *Trametes versicolor* mediated by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 267-276.
- [3] Camarero, S., D. Ibarra, A. T. Martínez, J. Romero, A. Gutiérrez, and J. C. DelRío (2007) Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme Microb. Technol.* 40: 1264-1271.
- [4] Gutierrez, A., J. Rencoret, D. Ibarra, S. Molina, S. Camarero, J. Romero, J.C. DelRío, and A.T. Martinez (2007) Removal of Lipophilic Extractives from Paper Pulp by Laccase and Lignin-Derived Phenols as Natural Mediators. *Environ. Sci. Technol.* 41(11): 4124-4129.
- [5] Dodor, D. E., H. M. Hwang, and S. I. N. Ekunwe (2004) Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. *Enzym Microb Tech.* 35: 210-217.
- [6] Camarero, S., D. Ibarra, M. J. Martínez, and A. T. Martínez (2005) Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolourization of different types of recalcitrant dyes. *Appl Environ Microbiol.* 71(4): 1775-1784.
- [7] Wu, Y., Y. Teng, Z. Li, X. Liao, and Y. Luo (2008) Potential role of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) oxidation by fungal laccase in the remediation of an aged contaminated soil. *Soil Biol Biochem.* 40(3): 789-796.
- [8] Ncanana, S., and S. Burton (2007) Oxidation of 8-hydroxyquinoline catalyzed by laccase from *Trametes pubescens* yields an antioxidant aromatic polymer. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 44: 66-71.
- [9] Santhiago, M., and I. C. Vieira (2007) L-Cysteine determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on laccase from *Aspergillus oryzae*. *Sensor Actuator B Chem.* 128(1): 279-285.
- [10] Wang, J., H. X. Wang, and T. B. Ng (2007) A peptide with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the medicinal mushroom *Russula paludosa*. *Peptides.* 28(3): 560-565.
- [11] Moldes, D., M. Lorenzo, and M. A. Sanroman (2004) Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. *Biotechnol. Lett.* 26: 327-330.
- [12] Pandey, A., P. Selvakumar, C. R. Soccol, and P. Nigam (1999) Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci.* 77(1): 149-162.
- [13] Couto, S. R., and M. A. Sanromán (2005) Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochem. Eng. J.* 22: 211-219.
- [14] Meza, J. C., A. Lomascolo, L. Casalot, J.-C. Sigoillot, and R. Auria (2005) Laccase production

- by *Pycnoporus cinnabarinus* grown on sugar-cane bagasse: influence of ethanol vapours as inducer. *Process Biochem.* 40: 3365-3371.
- [15] Niladevi, K. N., R. K. Sukumaran, and P. Prema (2007) Utilization of rice straw for laccase production by *Streptomyces psammoticus* in solid state fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 34: 665-674.
- [16] Silva, E. M., A. Machuca, and A. M. F. Milagres (2005) Evaluating the growth and enzyme production from *Lentinula edodes* strains. *Process Biochem.* 40: 161-164.
- [17] Wang, S.-L., Y.-H. Yen, I.-L. Shih, A. C. Chang, W.-T. Chang, W.-C. Wu, and Y.-D. Chai (2003) Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. *Enzyme Microb. Technol.* 33: 917-925.
- [18] Singhania, R. R., A. K. Patel, C. R. Soccol and A. Pandey (2009) Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem Eng J.* 44(1): 13-18.
- [19] Wesenberg, D., I. Kyriakides and S. N. Agathos (2003) White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol Adv.* 22(1-2): 161-187.
- [20] Gregori, A., M. S`vagelj, B. Pahor, M. Berovic, and F. Pohleven (2008) The use of spent brewery grains for *Pleurotus ostreatus* cultivation and enzyme production. *New Biotechnology.* 25(2-3): 157-161.
- [21] Shrivastava, R., V. Christian, and B. R. M. Vyas (2005) Enzymatic decolorization of sulfonphthalein dyes. *Enzyme Microb Technol.* 36: 333-337.
- [22] Singh, D., and S. Chen (2008) The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 81(3): 399-417.
- [23] Asses, N., L. Ayed, H. Bouallagui, I. Ben Rejeb, M. Gargouri, and M. Hamdi (2009) Use of *Geotrichum candidum* for olive mill wastewater treatment in submerged and static culture. *Bioresource Technol.* 100(7): 2182-2188.
- [24] National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, National Science and Technology Development Agency (2001) Thai mushrooms and other fungi. p198. (In Thai)
- [25] Klinhom, W. and U. Klinhom (2005) Fifty seven Medicinal Mushrooms of Northeastern, Thailand. Bangkok: Thai holistic health foundation. p136-137. (In Thai).
- [26] Klinhom, U., W. Klinhom and W. Kanchanamayoon (2003) Mushrooms and Traditional Knowledge in Northeastern Thailand. Proceedings: The 2nd International Conference on Medicinal Mushroom and the International Conference on Biodiversity and Bioactive Compounds, 17-19 July 2003, PEACH, Pattaya, Thailand.
- [27] Pukahuta, C., P. Suwanarit, E. Shinagawa, H. Hoshida and Y. Nishizawa (2004) Combination of laccase, xylanase and cellulase in lignocellulose degradation by white rot fungi, *Lentinus polychrous* Lév. and *L. squarrosulus* Mont. *Kasetsart J. (Nat.Sci.)* 38: 65 –73.
- [28] Khammuang S., and R. Sarnthima (2007) Laccase from spent mushroom compost of *Lentinus polychrous* Lev. and its potential for remazol brilliant blue R decolorization. *Biotechnology.* 6(3): 408-413.
- [29] Shin, K. S., and Y. J. Lee (2000) Purification and Characterization of a New Member of the Laccase Family from the White-Rot Basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Arch Biochem Biophys.* 384: 109-115.
- [30] Leonowicz, A., and K. Grzywnowicz (1981) Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. *Enzyme Microbiol. Technol.* 3: 55-58.
- [31] Collins, P. J., M. J. J. Kotterman, J. A. Field, and A. D. W. Dobson (1996) Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol.* 62: 4563-4567.
- [32] Archibald, F. S. (1992) A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye Azure B. *Appl Environ Microbiol.* 58(9): 3110-3116.
- [33] Ngo, T. T., and H. M. Lenhoff (1980) A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions. *Anal. Biochem.* 105: 389-397.
- [34] Sarnthima, R., and S. Khammuang (2008) Evaluation of dyes decolorization by the crude enzyme from *Pleurotus sajor-caju* grown on

- sorghum seed media. *Pakistan J Biol Sci.* 11(1): 62-67.
- [35] Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analyt. Biochem.* 72: 248-254.
- [36] Rossi, I. H., A. C. Monteiro, J. O. Machado, and J. C. Barbosa (2003) Supplementation of sugarcane bagasse with rice bran and sugarcane molasses for shiitake (*Lentinula edodes*) spawn production. *Braz. J. Microbiol.* 34(1): 61-65.
- [37] Tong, P., Y. Hong, Y. Xiao, M. Zhang, X. Tu, and T. Cui (2007) High production of laccase by a new basidiomycete, *Trametes* sp. *Biotechnol Lett.* 29: 295-301.
- [38] Winquist, E., U. Moilanen, A. Mettälä, M. Leisola, and A. Hatakka (2008) Production of lignin modifying enzymes on industrial waste material by solid-state cultivation of fungi. *Biochem Eng J.* 42(2): 128-132.
- [39] Akavia, E., A. Beharav, S. P. Wasser and E. Nevo (2009) Disposal of agro-industrial by-products by organic cultivation of the culinary and medicinal mushroom *Hypsizygus marmoreus*. *Waste Management.* 29(5): 1622-1627.
- [40] Elisashvili, V., M. Penninckx, E. Kachlishvili, N. Tsiklauri, E. Metreveli, T. Kharziani, and G. Kvesitadze (2008) *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresource Technology.* 99(3): 457-462.
- [41] Baldrian, P., and L. Gabriel (2003) Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in the presence of cadmium. *FEMS Microbiol. Lett.* 220: 235-240.
- [42] Reddy, G. V., P. R. Babu, P. Komaraiah, K. R. R. M. Roy, and I. L. Kothari (2003) Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochem.* 38: 1457-1462.
- [43] Singh, G., N. Capalash, R. Goel, and P. Sharma (2007) A pH-stable laccase from alkali-tolerant γ -proteobacterium JB: Purification, characterization and indigo carmine degradation. *Enzyme Microb Tech.* 41(6-7): 794-799.
- [44] Basto, C., C. J. Silva, G. Gübitz, and A. Cavaco-Paulo (2007) Stability and decolourization ability of *Trametes villosa* laccase in liquid ultrasonic fields. *Ultrason Sonochem.* 14(3): 355-362.
- [45] Couto, S. R., M. A. Sanromán, D. Hofer, and G. M. Gübitz (2004) Stainless steel sponge: A novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes. *Bioresource Technol.* 95: 67-72.
- [46] Johannes C., and A. Majcherczyk (2000) Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase-mediator systems, *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 524–528.
- [47] Mechichi, T., N. Mhiri, and S. Sayadi (2006) Remazol Brilliant Blue R decolourization by the laccase from *Trametes troglia*. *Chemosphere.* 64(6): 998-1005.
- [48] Couto, S. R., E. Rosales, and M. A. Sanroman (2006) Decolourization of synthetic dyes by *Trametes hirsuta* in expanded-bed reactors. *Chemosphere.* 62(9): 1558-1563.
- [49] Jadhav, S. U., S. D. Kalme, and S. P. Govindwar (2008) Biodegradation of Methyl red by *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360. *Int Biodeter Biodegr.* 62(2): 135-142.
- [50] Nyanhongo, G. S., J. Gomes, G. M. Gübitz, R. Zvauya, J. Read, and W. Steiner (2002) Decolorization of textile dyes by laccase from a newly isolated strain of *Trametes modesta*, *Water Res* 36: 1449–1456.

ข. การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

1. 8th Thailand research fund annual conference, Thailand October 16-18, 2008

เพชรบุรี



นำเสนอแบบโปสเตอร์ โดยนางสาวรักฤดี สารธิมา หัวหน้าโครงการวิจัย

2. การนำเสนอผลงานโครงการของนิสิตชั้นปีที่ 4 และวิทยานิพนธ์นิสิตระดับ

บัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 8 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

18 กุมภาพันธ์ 2552



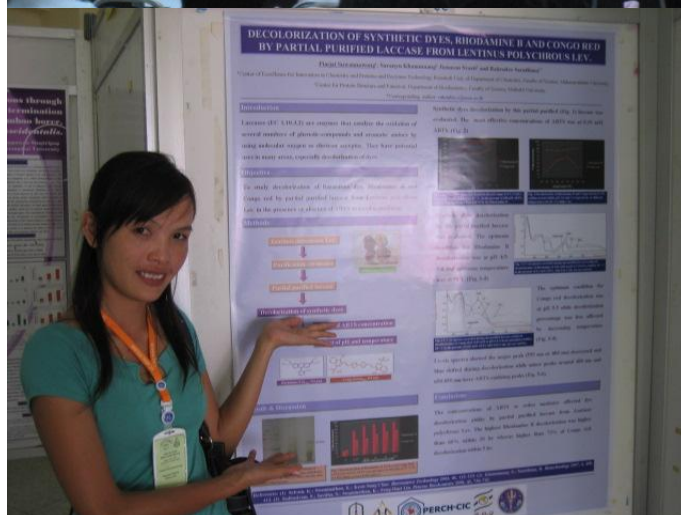
นำเสนอแบบปากเปล่า โดยนางสาวพิมพ์ใจ สุวรรณวงศ์ นิสิตระดับปริญญาโท สาขาเคมี

3. 6th PERCH-CIC Conference, May 3-6, 2009 ชลบุรี Thailand



นำเสนอแบบโปสเตอร์ โดยนางสาวพิมพ์ใจ สุวรรณวงศ์ นิสิตระดับปริญญาโท สาขาเคมี

4. 2nd BMB Symposium May 7-8, 2009 ขอนแก่น Thailand



นำเสนอแบบโปสเตอร์ โดยนางสาวพิมพ์ใจ สุวรรณวงศ์ นิสิตระดับปริญญาโท สาขาเคมี