

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5180295

ชื่อโครงการ: คุณลักษณะทางชีวเคมีและโมเลกุลของแลคเคส จากเห็ดหอม
สายพันธุ์ทนร้อน (*Lentinula edodes*) และความสามารถในการฟอกจาง
สีสังเคราะห์

ชื่อนักวิจัยหลัก: ดร.ปิยนันท์ ชมนาวัง
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตกาฬสินธุ์
Email: piyananchomnawang@yahoo.com

ชื่อนักวิจัยพี่เลี้ยง: รองศาสตราจารย์ ดร.สันห์ พณิชยกุล
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Email: sanhapanichajakul@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ: 3 ปี (พฤษภาคม 2551-พฤษภาคม 2554)

เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแลคเคสจากเห็ดหอมสายพันธุ์ทนร้อน การพัฒนา
ขั้นตอนและวิธีการทำให้แลคเคสจากเห็ดหอมลูกผสมสายพันธุ์ทนร้อนให้บริสุทธิ์ จากนั้นศึกษา
คุณลักษณะทางชีวเคมีของเอนไซม์ และคุณลักษณะทางโมเลกุลของจีนที่ผลิตแลคเคส รวมทั้ง
ทำการศึกษาความสามารถของแลคเคสบริสุทธิ์จากเห็ดหอมลูกผสมสายพันธุ์ทนร้อนในการฟอก
จางสีสังเคราะห์ เห็ดหอมสายพันธุ์ KMH1 เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการนำมาผลิตแลคเคสที่
ผลิตออกนอกเซลล์เนื่องจากสามารถผลิตแลคเคสได้สูงทุกอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองรวมทั้งให้ผล
ผลิตเอนไซม์สูง จากการศึกษาลักษณะและจลนพลศาสตร์ โดยเน้นคุณสมบัติการเร่ง และยับยั้ง
ปฏิกิริยาของเอนไซม์ รวมทั้งเสถียรภาพของเอนไซม์ที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ และที่ผ่านการ
ทำให้บริสุทธิ์ พบว่าแลคเคสสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 3.0-5.0
และ 30-60 °C ตามลำดับ โดยมีค่า แอคติวิตีเอนไซม์สูงสุดที่ พี เอช 5.0 และที่ 40 °C และเมื่อ
ศึกษาผลของพี เอช ต่อความเสถียรของเอนไซม์ โดยแปรผันพี เอช 2 ถึง 11 เอนไซม์มีความ
เสถียรในช่วงพีเอช 3.0-6.0 ในขณะที่มีความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์
พีเอช 5.0 เมื่อบ่มที่ 37 °C นาน 16 ชั่วโมง การศึกษาผลของไอออนโลหะและตัวยับยั้งกิจกรรม
ของเอนไซม์เมื่อใช้ ABTS เป็นสับสเตรท พบว่าเอนไซม์ถูกยับยั้งด้วย 1 มิลลิโมลาร์ HgCl_2 (60%
การยับยั้ง) ในขณะที่สารอื่นสามารถกระตุ้นแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ นอกจากนี้เอนไซม์สามารถ
ถูกยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ด้วย 0.05 มิลลิโมลาร์โซเดียม เอไซด์ และ 0.1 มิลลิโมลาร์ซิสเตอีน
การศึกษาสับสเตรทที่จำเพาะต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์พบว่า ABTS และ syringaldazine,
2,6-dimethoxyphenol เป็นสับสเตรทที่เหมาะสมสำหรับแลคเคสในขณะที่ pyrogallol และ guaiacol

ให้ค่าแอกติวิตีเอนไซม์ต่ำมาก นอกจากนี้แลคเคสไม่สามารถออกซิไดส์ veratryl alcohol และ tyrosine ได้ ซึ่งอาจจะต้องมีการใช้สาร mediator ช่วยในการเร่งปฏิกิริยา ผลการศึกษา จลนพลศาสตร์ของแลคเคส เมื่อใช้ ABTS เป็นสับสเตรท ได้ค่า Michaelis constant (Km) สำหรับ ปฏิกิริยาการออกซิไดส์ ประมาณ 0.719 มิลลิโมลาร์ และค่า Vmax 0.557 มิลลิโมลต่อนาที เมื่อใช้ syringadine สามารถหาค่า Michaelis constant (Km) สำหรับปฏิกิริยาการออกซิไดส์ ได้ ค่าประมาณ 1.85 มิลลิโมลาร์ และค่า Vmax 1.268 มิลลิโมลต่อนาที และเมื่อใช้ 2,6-dimethoxyphenol สามารถหาค่า Michaelis constant (Km) สำหรับปฏิกิริยาการออกซิไดส์ ได้ ค่าประมาณ 1.49 มิลลิโมลาร์ และค่า Vmax 0.623 มิลลิโมลต่อนาที การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต การใช้ anion-exchange chromatography และ gel filtration พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 28 เท่า และได้ผลผลิตจากขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ 41% ในการตรวจสอบมวลโมเลกุลของแลคเคสโดยวิธี sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่ามีค่าประมาณ 60 กิโลดาลตัน และจากการศึกษาความสามารถของแลคเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในการฟอกจางสีสังเคราะห์ในกลุ่ม triphenyl methane ได้แก่ บลอมฟีนอลบลู, คริสตัลไวโอเล็ต, ฟีนอลเรด และ ฟุชิซิน สีสังเคราะห์ ในกลุ่ม anthraquinone ได้แก่ indigo และสีสังเคราะห์ในกลุ่ม azo ได้แก่ methyl orange พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณแลคเคสความสามารถในการฟอกจางสีก็เพิ่มขึ้นตามไปด้วย และ เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่มนานขึ้น ความสามารถในการฟอกจางสีก็เพิ่มขึ้นตามไปด้วย และ ความสามารถในการฟอกจางสีสังเคราะห์มีค่าสูงในช่วงระยะเวลาแรกๆของการบ่ม ซึ่งอัตราการฟอกจางสีเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการบ่ม นอกจากนี้ สีสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่ำๆ แลคเคส สามารถฟอกจางสีสังเคราะห์ได้มาก และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสีสังเคราะห์เพิ่มขึ้น ความสามารถในการฟอกจางสีมีค่าลดลงไปตามความเข้มข้นที่มาก

คำหลัก: ลักษณะทางชีวเคมีและโมเลกุล แลคเคส เห็ดหอม การฟอกจางสีสังเคราะห์

Abstract

Project Code: MRG5180295

Project Title: Biochemical and molecular characterization of laccase from thermo-tolerance shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) and their ability to decolorized synthetic dyes

Main researcher: Piyanan Chomnawang, Ph.D.
Division of Biotechnology, Faculty of Agro-industrial Technology,
Rajamangala University of Technology Isan, Kalasin Campus
Email: piyananchomnawang@yahoo.com

Mentor: Asso.Prof. Sanha Panichajakul, Ph.D.
Department of Biotechnology, Faculty of Technology,
Khon Kaen University
Email: sanhapanichajakul@yahoo.com

Project Peroid: 3 years (May 2008-May 2011)

The objective of the present study was to determine the optimal conditions for laccase production by thermo-tolerance shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) hybrid in submerged culture, isolation, purification and characterization of laccase, and the utilization of the purified enzyme for decolorization of dyes. Laccase was isolated from the culture filtrate of *Lentinula edodes* strain KMUH1. Crude and purified laccase has optimum pH 3.0-5.0 and 30-60 °C as the optimum temperature. The pH stability of laccase was stable at pH 5.0 and the thermal stability was determined by incubating the enzyme at pH 5.0 37 °C for 16 hours. The effects of metal ions and inhibitors on laccase activity were tested by using ABTS as the substrate. The enzyme was strongly inhibited by 1 mM HgCl₂ (60%) and was completely inhibited by 0.05 mM sodium azide and 0.1 mM L-cysteine. Substrate specificity was determined at the optimum pH for each substrate. ABTS, syringaldazine and 2,6-dimethoxyphenol were oxidized by laccase. Pyrogallol and guaiacol had the lowest activity enzyme. Veratryl alcohol and tyrosine were not oxidized. ABTS had the lowest Km and syringaldazine had the highest Vmax values. Homogeneous preparation of laccase from the culture filtrate of this fungus has been achieved using ammonium sulphate precipitation, anion exchange chromatography on DEAE and gel filtration chromatography on Sephadex G-100. The method gave 28 purification fold with

41% recovery of the enzyme activity. The laccase was concentrated and partially purified by ammonium sulphate precipitation, ultramembrane filtration, ion-exchange chromatography and gel filtration and its molecular weight determined by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was about 60,000 Dalton. The optimum pH for the decolorization of dyes was 5.0- the same as the optimum pH for oxidation of ABTS. Laccase was effective in the decolorization of chemically different dyes-triphenyl methane (bromophenol blue, crystal violet, phenol red and fucisine), anthraquinone (indigo) and azo dyes (methyl orange), without any mediators. Laccase decolorized dyes depending on laccase concentration, incubation time and dyes concentration.

คำหลัก: Biochemical and molecular characterization, Laccase, Shiitake mushroom, Decolorized synthetic dyes