



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

คุณลักษณะทางชีวเคมีและโมเลกุลของแลคแคส จากเห็ดหอมสายพันธุ์  
ทนร้อน (*Lentinula edodes*) และความสามารถในการฟอกจางสีสังเคราะห์

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

โดย ปิยนันท์ ชมนาวัง และคณะ

พฤศจิกายน 2554

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

คุณลักษณะทางชีวเคมีและโมเลกุลของแลคแคส จากเห็ดหอมสายพันธุ์  
ทนร้อน (*Lentinula edodes*) และความสามารถในการฟอกจางสีสังเคราะห์

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

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. ปิยนันท์ ชมนาวัง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน

2. สัณฑ์ พณิชยกุล

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgments)

รายงานฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยเชิงวิชาการ ประเภททุน พัฒนา ศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ประจำปีงบประมาณ 2554 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สัณฑ์ พณิชยกุล สังกัดภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ช่วยเป็นนักวิจัยพี่เลี้ยง ให้คำแนะนำ ส่งเสริม สนับสนุน และให้กำลังใจในการทำวิจัย จนกระทั่งงานวิจัยและรายงานนี้สำเร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขต กาฬสินธุ์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น และ รศ.ดร. บรรจบ ศรีภา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่กรุณาให้ความร่วมมือและ สนับสนุนในงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ นายบัณฑิต ปัญญาณี (บิดา) นางอนงค์ ปัญญาณี (มารดา) ดร.ชาญณรงค์ (สามี) และเด็กชาย ฐปนรรพ์ (ปันปัน) ชมนาวัง (บุตร) ที่เป็นกำลังใจสำคัญยิ่งใน การทำงานวิจัยและรายงานฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์

ปิยนันท์ ชมนาวัง  
พฤศจิกายน 2554

## บทคัดย่อ

**รหัสโครงการ:** MRG5180295

**ชื่อโครงการ:** คุณลักษณะทางชีวเคมีและโมเลกุลของแลคเคส จากเห็ดหอมสายพันธุ์ทนร้อน (*Lentinula edodes*) และความสามารถในการฟอกจางสีสังเคราะห์

**ชื่อนักวิจัยหลัก:** ดร.ปิยนันท์ ชมนาวัง  
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตกาฬสินธุ์  
Email: [piyananchomnawang@yahoo.com](mailto:piyananchomnawang@yahoo.com)

**ชื่อนักวิจัยพี่เลี้ยง:** รองศาสตราจารย์ ดร.สันห์ พณิชยกุล  
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น  
Email: [sanhapanichajakul@yahoo.com](mailto:sanhapanichajakul@yahoo.com)

**ระยะเวลาโครงการ:** 3 ปี (พฤษภาคม 2551-พฤษภาคม 2554)

เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแลคเคสจากเห็ดหอมสายพันธุ์ทนร้อน การพัฒนาขั้นตอนและวิธีการทำให้แลคเคสจากเห็ดหอมลูกผสมสายพันธุ์ทนร้อนให้บริสุทธิ์ จากนั้นศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีของเอนไซม์ และคุณลักษณะทางโมเลกุลของจีนที่ผลิตแลคเคส รวมทั้งทำการศึกษาความสามารถของแลคเคสบริสุทธิ์จากเห็ดหอมลูกผสมสายพันธุ์ทนร้อนในการฟอกจางสีสังเคราะห์ เห็ดหอมสายพันธุ์ KMH1 เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการนำมาผลิตแลคเคสที่ผลิตออกนอกเซลล์เนื่องจากสามารถผลิตแลคเคสได้สูงทุกอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองรวมทั้งให้ผลผลิตเอนไซม์สูง จากการศึกษาลักษณะและจลนพลศาสตร์ โดยเน้นคุณสมบัติการเร่ง และยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ รวมทั้งเสถียรภาพของเอนไซม์ที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ และที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ พบว่าแลคเคสสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 3.0-5.0 และ 30-60 °C ตามลำดับ โดยมีค่า แอคติวิตีเอนไซม์สูงสุดที่ พี เอช 5.0 และที่ 40 °C และเมื่อศึกษาผลของพี เอช ต่อความเสถียรของเอนไซม์ โดยแปรผันพี เอช 2 ถึง 11 เอนไซม์มีความเสถียรในช่วงพีเอช 3.0-6.0 ในขณะที่มีความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 5.0 เมื่อบ่มที่ 37 °C นาน 16 ชั่วโมง การศึกษาผลของไอออนโลหะและตัวยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อใช้ ABTS เป็นสับสเตรท พบว่าเอนไซม์ถูกยับยั้งด้วย 1 มิลลิโมลาร์  $\text{HgCl}_2$  (60% การยับยั้ง) ในขณะที่สารอื่นสามารถกระตุ้นแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ นอกจากนี้เอนไซม์สามารถถูกยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ด้วย 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 ปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ ประมาณ 0.719 มิลลิโมลาร์ และค่า Vmax 0.557 มิลลิโมลต่อนาที เมื่อใช้ syringadine สามารถหาค่า Michaelis constant (Km) สำหรับปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ ได้ ค่าประมาณ 1.85 มิลลิโมลาร์ และค่า Vmax 1.268 มิลลิโมลต่อนาที และเมื่อใช้ 2,6-dimethoxyphenol สามารถหาค่า Michaelis constant (Km) สำหรับปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ 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](mailto:piyananchomnawang@yahoo.com)

**Mentor:** Asso.Prof. Sanha Panichajakul, Ph.D.  
Department of Biotechnology, Faculty of Technology,  
Khon Kaen University  
Email: [sanhapanichajakul@yahoo.com](mailto: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 HgCl<sub>2</sub> (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 K<sub>m</sub> and syringaldazine had the highest V<sub>max</sub> 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 decolonization 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

## Executive Summary

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแลคเคสจากเห็ดหอมสายพันธุ์ทนร้อน การพัฒนาขั้นตอนและวิธีการทำให้แลคเคสจากเห็ดหอมลูกผสมสายพันธุ์ทนร้อนให้บริสุทธิ์ จากนั้นศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีของเอนไซม์ และคุณลักษณะทางโมเลกุลของจีนที่ผลิตแลคเคส รวมทั้งทำการศึกษาความสามารถของแลคเคสบริสุทธิ์จากเห็ดหอมลูกผสมสายพันธุ์ทนร้อนในการฟอกจางสีสังเคราะห์

การดำเนินงานของโครงการได้ศึกษารูปแบบการผลิตเอนไซม์แลคเคส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแลคเคสสูงของเห็ดหอมลูกผสมสายพันธุ์ทนร้อน เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตแลคเคสสูง และใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว พัฒนาขั้นตอนการแยก การทำให้แลคเคสบริสุทธิ์ การศึกษาลักษณะและจลนพลศาสตร์ของแลคเคสจากเห็ดหอมลูกผสมสายพันธุ์ทนร้อน โดยเน้นคุณสมบัติการเร่ง และยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ รวมทั้งเสถียรภาพของเอนไซม์ การศึกษาคุณลักษณะทางด้านโมเลกุลของจีนที่สังเคราะห์แลคเคสจากเห็ดหอมลูกผสมสายพันธุ์ทนร้อนเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เห็ดชนิดอื่นโดยใช้ข้อมูลจากธนาคารจีน และทำการศึกษาความสามารถของแลคเคสที่ทำให้บริสุทธิ์จากสายพันธุ์เห็ดหอมลูกผสมสายพันธุ์ทนร้อนในการบำบัดสีย้อมและน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมการเกษตรโดยเน้นสีสังเคราะห์ที่มีการใช้ในการย้อมผ้าและสิ่งทออื่นๆ

สำหรับผลงานวิจัยที่ได้รับ โครงการได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดหอมทนร้อนที่ผลิตแลคเคสสูง และใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวโดยติดตามรูปแบบการผลิตเอนไซม์แลคเคส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส จากนั้นได้ทำการผลิตเอนไซม์ในปริมาณมากเพื่อนำมาสู่ขั้นตอนการศึกษาขั้นตอนการแยก การทำให้แลคเคสบริสุทธิ์ จากผลการศึกษาพบว่า เห็ดหอมสายพันธุ์ KMUH1 เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการนำมาผลิตเอนไซม์แลคเคสที่ส่งออกนอกเซลล์เนื่องจากสามารถผลิตแลคเคสได้สูงทุกอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง รวมทั้งให้ผลผลิตเอนไซม์สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ จึงได้ทำการผลิตเอนไซม์ในปริมาณมากเพื่อนำมาสู่ขั้นตอนการพัฒนากระบวนการแยกและการทำเอนไซม์แลคเคสบริสุทธิ์ ซึ่งในระหว่างขั้นตอนนี้ได้ทำการศึกษาลักษณะและจลนพลศาสตร์ของแลคเคสจากเห็ดหอมลูกผสมสายพันธุ์ทนร้อน โดยเน้นคุณสมบัติการเร่ง และยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ รวมทั้งเสถียรภาพของเอนไซม์ที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ และที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ผลการทดลองพบว่าเอนไซม์แลคเคสสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 3.0-5.0 และ 30-60°C ตามลำดับ โดยมีค่าแอกติวิตีเอนไซม์สูงสุดที่ พี เอช 5.0 และที่ 40°C และเมื่อศึกษาผลของพี เอช ต่อความเสถียรของเอนไซม์ โดยแปรผันพี เอช 2 ถึง 11 เอนไซม์มีความเสถียรในช่วงพีเอช 3.0-6.0 ในขณะที่มีความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 5.0 เมื่อต้มที่ 37°C นาน 16 ชั่วโมง ในช่วง 20-50°C การศึกษาผลของไอออนโลหะและตัวยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อใช้ ABTS

เป็นสับสเตรท พบว่าเอนไซม์ถูกยับยั้งด้วย 1 มิลลิโมลาร์  $\text{HgCl}_2$  (60% การยับยั้ง) ในขณะที่สารอื่นสามารถกระตุ้นแอกติวิตีของเอนไซม์ได้ นอกจากนี้เอนไซม์สามารถถูกยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ด้วย 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 ผลการศึกษาจลนพลศาสตร์ของแลคเคส เมื่อใช้ ABTS เป็นสับสเตรท ได้ค่า Michaelis constant (Km) สำหรับปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ ประมาณ 0.719 มิลลิโมลาร์ และค่า Vmax 0.557 มิลลิโมลต่อนาที เมื่อใช้ Syringadine สามารถหาค่า Michaelis constant (Km) สำหรับปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ ได้ค่าประมาณ 1.85 มิลลิโมลาร์ และค่า Vmax 1.268 มิลลิโมลต่อนาที และเมื่อใช้ 2,6-Dimethoxyphenol สามารถหาค่า Michaelis constant (Km) สำหรับปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ ได้ค่าประมาณ 1.49 มิลลิโมลาร์ และค่า Vmax 0.623 มิลลิโมลต่อนาที

ผลการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต การใช้ anion-exchange chromatography และ gel filtration พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น 28 เท่า และได้ผลผลิตจากขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ 41% ในการตรวจสอบมวลโมเลกุลของแลคเคสโดยวิธี sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่ามีค่าประมาณ 60 กิโลดาลตัน และจากการศึกษาความสามารถของแลคเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในการฟอกจางสีสังเคราะห์ ในกลุ่ม triphenyl methane ได้แก่ บลอมฟีนอลบลู, คริสตัลไวโอเล็ต, ฟีนอลเรด และ ฟุชซิน สีสังเคราะห์ในกลุ่ม anthraquinone ได้แก่ indigo และสีสังเคราะห์ในกลุ่ม azo ได้แก่ methyl orange พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณแลคเคสความสามารถในการฟอกจางสีก็เพิ่มขึ้นตามไปด้วย และ เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่มนานขึ้น ความสามารถในการฟอกจางสีก็เพิ่มขึ้นตามไปด้วย และความสามารถในการฟอกจางสีสังเคราะห์มีค่าสูงในช่วงระยะเวลาแรกๆ ของการบ่ม ซึ่งอัตราการฟอกจางสีเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการบ่ม นอกจากนี้ สีสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่ำๆ แลคเคส สามารถฟอกจางสีสังเคราะห์ได้มาก และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสีสังเคราะห์เพิ่มขึ้น ความสามารถในการฟอกจางสีมีค่าลดลงไปตามความเข้มข้นที่มาก จากการทดลองพบว่าเอนไซม์แลคเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีศักยภาพในการนำมาฟอกจางสีสังเคราะห์ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปสู่การผลิตระดับอุตสาหกรรม รวมทั้งการนำเทคนิคการตรึงเอนไซม์มาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ และการพัฒนาถึงปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อพัฒนากระบวนการฟอกย้อมต่อไป ในผลการศึกษาวิจัยต่อไปจะทำการศึกษาคูณลักษณะทางด้านโมเลกุลของจีนที่สังเคราะห์แลคเคส จากเห็ดหอมลูกผสมสายพันธุ์ทนร้อนเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เห็ดชนิดอื่นที่ใช้ข้อมูลจากธนาคารจีน

## สารบัญ

| เรื่อง                                                      | หน้า   |
|-------------------------------------------------------------|--------|
| กิตติกรรมประกาศ                                             | ก      |
| บทคัดย่อภาษาไทย                                             | ข      |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ                                          | ง      |
| Executive Summary                                           | ฉ      |
| สารบัญ                                                      | ช      |
| สารบัญตาราง                                                 | ญ      |
| สารบัญรูป                                                   | ฎ      |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย                   | ฏ      |
| <br>บทที่ 1 บทนำ                                            | <br>1  |
| 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย                  | 1      |
| 1.2 วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัย                             | 3      |
| 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย                                   | 3      |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ                               | 4      |
| 1.5 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง                                 | 5      |
| <br>บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือและวิธีการวิจัย         | <br>12 |
| 2.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง                     | 12     |
| 2.2 วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี                      | 12     |
| 2.3 วิธีดำเนินการวิจัย                                      | 14     |
| <br>บทที่ 3 ผลการทดลอง                                      | <br>24 |
| 3.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น                                   | 24     |
| 3.2 การศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหอม            | 24     |
| 3.3 การศึกษารูปแบบการผลิตเอนไซม์ของเส้นใยเห็ดหอม            | 28     |
| 3.4 การเตรียมแหล่งของเอนไซม์ของเส้นใยเห็ดหอม                | 32     |
| 3.5 การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อแอกติวิตีของเอนไซม์แลคเคส  | 32     |
| 3.6 การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อความเสถียรของเอนไซม์แลคเคส | 33     |
| 3.7 การศึกษาการยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แลคเคส      | 36     |

## สารบัญ (ต่อ)

| เรื่อง                                                                                                        | หน้า |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| บทที่ 3 ผลการทดลอง (ต่อ)                                                                                      |      |
| 3.8 การศึกษาและพัฒนาเทคนิคการทำให้แลคเคสบริสุทธิ์                                                             | 38   |
| 3.9 การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อแอกติวิตีของเอนไซม์แลคเคส<br>ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์                        | 42   |
| 3.10 การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อความเสถียรของเอนไซม์แลคเคส<br>ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์                      | 43   |
| 3.11 การศึกษาการยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แลคเคส<br>ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์                           | 46   |
| 3.12 การศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบของความเข้มข้นสับสเตรตต่อ<br>การเร่งปฏิกิริยาของแลคเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ | 48   |
| 3.13 การศึกษาความสามารถของแลคเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์<br>ในการฟอกจางสีสังเคราะห์                           | 53   |
| 3.14 การศึกษาคุณลักษณะทางโมเลกุลของเงินที่ผลิตแลคเคส                                                          | 56   |
| บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง                                                                                        | 59   |
| เอกสารอ้างอิง                                                                                                 | 61   |
| ภาคผนวก                                                                                                       | 67   |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่                                                                        | หน้า |
|---------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1. Effects of metal ions on laccase activity                                    | 36   |
| 2. Effects of inhibitors on laccase activity                                    | 37   |
| 3. Substrate oxidizing activities of laccase                                    | 38   |
| 4. Precipitation of laccase from the supernatant by saturated ammonium sulphate | 39   |
| 5. Summary of the purification procedure for <i>Lentinula edodes</i> KMUH1      | 42   |
| 6. Effects of metal ions on laccase activity                                    | 46   |
| 7. Effects of inhibitors on laccase activity                                    | 47   |
| 8. Substrate oxidizing activities of laccase                                    | 48   |
| 9. Substrate specificity of purified laccase <i>Lentinula edodes</i> KMUH1      | 49   |
| 10. Structure, concentration and maximum absorbance wavelength of dyes          | 53   |

## สารบัญรูป

| รูปที่                                                                                                                                                    | หน้า |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1. Typical pattern of growth curve demonstration of <i>Lentinula edodes</i> mycelium long during growth in potato dextrose agar (PDA) medium at 25C       | 25   |
| 2. Typical pattern of growth curve demonstration of <i>Lentinula edodes</i> mycelium long during growth in potato dextrose agar (PDA) medium at 30C       | 26   |
| 3. Typical pattern of growth curve demonstration of <i>Lentinula edodes</i> mycelium long during growth in potato dextrose agar (PDA) medium at 32C       | 26   |
| 4. Typical pattern of growth curve demonstration of <i>Lentinula edodes</i> mycelium dry weight during growth in potato dextrose agar (PDA) medium at 25C | 27   |
| 5. Typical pattern of growth curve demonstration of <i>Lentinula edodes</i> mycelium dry weight during growth in potato dextrose agar (PDA) medium at 25C | 27   |
| 6. Typical pattern of growth curve demonstration of <i>Lentinula edodes</i> mycelium dry weight during growth in potato dextrose agar (PDA) medium at 25C | 28   |
| 7. Typical pattern of laccase of <i>Lentinula edodes</i> mycelium during growth in potato dextrose agar (PDA) medium at 25C                               | 29   |
| 8. Typical pattern of laccase of <i>Lentinula edodes</i> mycelium during growth in potato dextrose agar (PDA) medium at 30C                               | 29   |
| 9. Typical pattern of laccase of <i>Lentinula edodes</i> mycelium during growth in potato dextrose agar (PDA) medium at 32C                               | 30   |
| 10. Typical pattern of managanese peroxidase of <i>Lentinula edodes</i> mycelium during growth in potato dextrose agar (PDA) medium at 25C                | 30   |
| 11. Typical pattern of managanese peroxidase of <i>Lentinula edodes</i> mycelium during growth in potato dextrose agar (PDA) medium at 30C                | 31   |
| 12. Typical pattern of managanese peroxidase of <i>Lentinula edodes</i> mycelium during growth in potato dextrose agar (PDA) medium at 32C                | 31   |

## สารบัญรูป (ต่อ)

| รูปที่                                                                                                                                                                             | หน้า |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 13. Effects of pH on enzyme activity of <i>Lentinula edodes</i> .<br>The enzyme reaction was performed at 37C for 10 min                                                           | 34   |
| 14. Effects of temperature on enzyme activity of <i>Lentinula edodes</i> . The enzyme reaction was performed in 0.1M acetate buffer pH 5.0 for 10 min                              | 34   |
| 15. Effects of pH on enzyme stability of <i>Lentinula edodes</i> . The enzyme reaction was measured after incubating at various pH at 37C for 16 hrs                               | 35   |
| 16. Effects of temperature on enzyme stability. Activity remaining was measured after incubating in 0.1M acetate buffer pH 5 at various temperature for 16 hrs                     | 35   |
| 17. Elution profile from DEAE Sephadex A-50 column                                                                                                                                 | 40   |
| 18. Elution profile from Sephadex G-100 column                                                                                                                                     | 41   |
| 19. Effects of pH on enzyme activity of crude and purified laccase of <i>Lentinula edodes</i> . The enzyme reaction was performed at 37C for 10 min                                | 44   |
| 20. Effects of temperature on enzyme activity. The enzyme reaction was performed at 37C for 10 min                                                                                 | 44   |
| 21. Effects of pH on enzyme stability of crude and purified laccase of <i>Lentinula edodes</i> . The enzyme reaction was measured after incubating at various pH at 37C for 10 min | 45   |
| 22. Effects of temperature on crude and purified enzyme stability. Activity remaining was measured after incubating in 0.1M acetate buffer pH 5 at various temperature for 30 min  | 45   |
| 23. Correlation between ABTS concentration versus velocity of laccase activity                                                                                                     | 50   |
| 24. Lineweaver-Burk plot of inverse velocity laccase activity and inverse ABTS concentration                                                                                       | 50   |

## สารบัญรูป (ต่อ)

| รูปที่                                                                                                      | หน้า |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 25. Correlation between Syringaldazine concentrations versus velocity of laccase activity                   | 51   |
| 26. Lineweaver-Burk plot of inverse velocity laccase activity and inverse Syringaldazine concentration      | 51   |
| 27. Correlation between 2,6-dimethoxyphenol concentration versus velocity of laccase activity               | 52   |
| 28. Lineweaver-Burk plot of inverse velocity laccase activity and inverse 2,6-dimethoxyphenol concentration | 52   |
| 29. Optimization of enzyme concentration for dye decolorization by purified laccase                         | 54   |
| 30. Temporal effect of dye decolorization by purified laccase                                               | 55   |
| 31. Effect of dye concentration on decolorization ability of purified laccase                               | 56   |

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

|                  |   |                                                            |
|------------------|---|------------------------------------------------------------|
| ABTS             | = | 2,2]-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)    |
| MnP              | = | Manganese peroxidase                                       |
| NaN <sub>3</sub> | = | Sodium azide                                               |
| K <sub>m</sub>   | = | Michaelis constant                                         |
| V <sub>max</sub> | = | Maximum velocity                                           |
| TCA              | = | Trichloroacetic acid                                       |
| SDS-PAGE         | = | Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis |
| PCR              | = | Polymerase chain reaction                                  |
| DNA              | = | Deoxyribo nucleic acid                                     |
| RNA              | = | Ribonucleic acid                                           |
| DEAE             | = | Diethylaminorthyl                                          |
| TEMED            | = | N,N,N,N-tetramethylethyleneamine                           |
| R <sub>m</sub>   | = | Relative mobility                                          |
| LB               | = | Luria broth                                                |
| IPTG             | = | Isopropyl thio-B-D-galactopyranoside                       |
| X-gal            | = | 5 Bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside                 |

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมซึ่งมีวัสดุจากการเกษตรเป็นจำนวนมาก วัสดุบางส่วนมีการพัฒนาไปใช้ให้เป็นประโยชน์เช่นการเปลี่ยนเป็นเชื้อเพลิง บางชนิดอาจมีประโยชน์โดยการนำเทคโนโลยีชีวภาพแปรเปลี่ยนได้สิ่งที่น่าสนใจมาเป็นอาหารได้ “เห็ด” เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายลิกโน-เซลลูโลสซึ่งเป็นสารประกอบหลักในวัสดุจากการเกษตรให้เป็นแหล่งอาหารและพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต และมีกลไกภายในของเห็ดประกอบกับปัจจัยภายนอกที่จะทำให้เส้นใยเห็ดเปลี่ยนเป็นดอกเห็ดได้ แต่จำเป็นต้องมีความรู้เพื่อควบคุมกระบวนการต่าง ๆ ให้เป็นไปตามความต้องการ [ดีพร้อม ไซยวงศ์เกียรติ, 2525]

เห็ดหอมหรือที่ชาวญี่ปุ่นเรียกว่า shiitake mushroom มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Lentinula edodes* เป็นเห็ดซึ่งเป็นที่นิยมของผู้บริโภค เพราะเป็นเห็ดที่มีรสชาติดี มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และมีสรรพคุณทางยาป้องกันโรค เช่น สารสกัดจากดอกและสปอร์ของเห็ดหอมมีคุณสมบัติเป็น antiviral agents โดยสามารถยับยั้งการเจริญและการติดเชื้อ influenza สารประเภทโพลีแซคคาไรด์บางชนิดที่สกัดได้จากเห็ดหอมยังมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง สามารถลดการสะสมของโคเลสเตอรอลในเลือด และที่สำคัญคือมีสาร lentinan ซึ่งมีคุณสมบัติต่อต้านเนื้องอกมะเร็ง และเอดส์ โดยกระตุ้นให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันต้านทาน [Chihara และคณะ, 1969; Fujii และคณะ, 1978]

ประเทศไทยเริ่มมีการเพาะเห็ดหอมในเชิงพาณิชย์และอุตสาหกรรมแบบท่อนไม้ในภาคเหนือ ไม้ที่นิยมใช้ได้แก่กลุ่มไม้ก่อ แต่เนื่องจากไม้ก่อเป็นไม้สงวนของประเทศมีความสำคัญต่อการอนุรักษ์ต้นน้ำ และขึ้นได้เฉพาะในบางพื้นที่ ผลผลิตของไม้เหล่านี้นี้มีจำกัด ทำให้เป็นอุปสรรคในการใช้เป็นวัสดุเพาะเห็ดหอม จึงเริ่มมีการพัฒนาเทคนิคการเพาะเห็ดหอมในถุงพลาสติกโดยใช้วัสดุจากการเกษตร ข้อมูลเกี่ยวกับอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเห็ดหอมได้รับการศึกษาและวิจัยกันมาอย่างต่อเนื่อง งานวิจัยส่วนใหญ่เป็นการศึกษาถึงวิธีการและสภาพแวดล้อมที่ใช้เพาะเลี้ยง โดยสายพันธุ์เห็ดหอมที่นำมาเพาะเป็นสายพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ ยังไม่มีการผลิตเห็ดหอมจากสายพันธุ์ที่ค้นพบในธรรมชาติของไทย การเพาะเห็ดหอมจะประสบความสำเร็จหรือไม่นั้น นอกจากจะขึ้นอยู่กับอาหารที่เหมาะสมแล้ว ยังขึ้นกับชนิดของสายพันธุ์ที่ใช้ในแต่ละสภาพแวดล้อมอีกด้วย การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีลักษณะดีและเหมาะสมกับสิ่งแวดล้อมเช่น อุณหภูมิของการเพาะเลี้ยง ผลผลิต ลักษณะดอก ตลอดจนสารประกอบที่มีอยู่ในดอก เหล่านี้ล้วนเป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึงทั้งสิ้น เห็ดหอมสายพันธุ์ต่างๆที่ใช้ผลิตดอกอยู่ในประเทศไทย ปัจจุบันเป็นสายพันธุ์นำเข้าจากต่างประเทศทั้งสิ้น โดยมีสายพันธุ์ซึ่งกรมวิชาการเกษตรใช้ส่งเสริมและเผยแพร่ให้มีการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิตดอก 5 สายพันธุ์

ตลอดจนสายพันธุ์อื่นๆที่นำเข้าจาก จีน ไต้หวัน และญี่ปุ่นบ้าง เห็ดหอมที่ใช้เพาะเลี้ยงในประเทศไทยไทยล้วนแล้วแต่ได้มาจากประเทศแถบหนาวทั้งสิ้นจึงสามารถเพาะและเกิดดอกได้ดีเฉพาะพื้นที่ที่มีอากาศเย็น ดังนั้น การเพาะเห็ดหอมให้ได้ผลผลิตสูงจึงถูกจำกัดให้กระทำกันได้แต่เฉพาะในเขตอากาศหนาวเย็นของประเทศ เช่น เชียงใหม่ เชียงราย เลย เพชรบูรณ์ เป็นต้น และจะทำให้ในบางช่วงของฤดูกาลเท่านั้น สำหรับสภาพแวดล้อมโดยเฉลี่ยของประเทศไทย โดยเฉพาะพื้นที่ราบสูง เช่นภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จะมีภูมิอากาศร้อน จึงจำเป็นต้องมีสายพันธุ์ที่ค่อนข้างทนร้อนเหมาะสมกับสภาพแวดล้อมของท้องถิ่นที่ให้ผลผลิตดอกและมีคุณภาพสูง[พิมพ์กานต์ อร่ามพงษ์พันธ์ และอุทัย จันผกา, 2526; พิมพ์กานต์ อร่ามพงษ์พันธ์ และคณะ, 2529; สุทธพรณ ตรีรัตน์ และอรุณี จันทรสนิท, 2528; Myra, 1984]

Panyamee [2005] ได้พัฒนาเห็ดหอมสายพันธุ์ทนร้อนโดยการผสมพันธุ์สปอร์เดี่ยวเพื่อให้ได้ลูกผสมที่เจริญได้ในอุณหภูมิสูงรวมทั้งมีประสิทธิภาพเชิงชีวภาพในการผลิตสูงและมีกลิ่นหอม นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ในการวิเคราะห์ จำแนกสายพันธุ์เห็ดหอมลูกผสมที่ได้ และจากการศึกษาพบว่า การเจริญ ผลผลิตดอกมีความสัมพันธ์กับรูปแบบและผลผลิตของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการใช้แหล่งคาร์บอนและพลังงานคือเอนไซม์ย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในสับสเตรทที่เลี้ยงในการเพาะเลี้ยงและเปิดดอก แลคเคส และแมงกานีส เพอร์ออกซิเดส เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนินร่วมกับเอนไซม์อื่นๆพบใน Basidiomycetes ที่ย่อยสลายไม้ได้ และมีรายงานเกี่ยวกับความสำคัญของแลคเคสต่อการเจริญเติบโตและการเกิดดอกของเห็ดหอม แลคเคส (EC 1.10.3.2) เป็นเอนไซม์ที่เป็น multi-copper oxidase ที่สามารถเร่งปฏิกิริยา one-electron oxidation ของสับสเตรทหลายชนิด มีความจำเพาะต่อสับสเตรทค่อนข้างกว้างรวมทั้ง polyphenol, methoxy-substituted monophenols, aromatic amines, benzenethiols, polymethoxybenzenes และสารประกอบอื่นๆที่สามารถถูกออกซิไดส์ได้ง่าย แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส (EC 1.11.1.13) เป็นหนึ่งใน oxidative enzymes ที่พบได้ใน white-rot fungi ที่ย่อยสลายไม้ เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยา oxidation-reduction ที่ออกซิไดซ์  $Mn^{2+}$  เป็น  $Mn^{3+}$  โดยใช้  $H_2O_2$  เป็นตัวให้อิเลคตรอน มีความสามารถในการออกซิไดซ์ทั้ง phenolic และ non-phenolic residues ของลิกนิน [D'Annibale และคณะ, 1996; Schlosser และคณะ, 1997; Soden, 2002; Zheng และคณะ, 2006]

ประเทศไทยจัดได้ว่าเป็นประเทศที่มีความสามารถในการผลิตสินค้าประเภทสิ่งทอที่มีชื่อเสียงมากประเทศหนึ่ง ซึ่งการที่จะผลิตสินค้าสิ่งทอจำเป็นต้องผ่านกระบวนการต่างๆ ได้แก่ การผลิตเส้นใย การปั่น การทอ การถักผ้า และการฟอกย้อม ในแต่ละขั้นตอนการผลิตจะก่อให้เกิดน้ำเสียในปริมาณและลักษณะที่แตกต่างกัน แต่น้ำเสียส่วนใหญ่เกิดขึ้นในขั้นตอนเตรียมสิ่งทอ ย้อมและขั้นตอนการฟอกย้อมเป็นหลัก เนื่องจากในกระบวนการฟอกย้อมจะมีสีย้อมเพียงส่วนหนึ่งที่สามารถติดอยู่กับเส้นด้าย และสีย้อมอีกส่วนหนึ่งจะไหลปนออกมากับน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกย้อม ดังนั้นน้ำเสียจึงมีสีย้อมปะปนมาด้วย สีย้อมที่ใช้กันทั่วไปเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้าง

ซับซ้อนยากแก่การกำจัด ทำให้น้ำทิ้งที่ออกจากระบบการผลิตมีสีที่นารังเกียจต่อผู้พบเห็น นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดปัญหามลพิษ และสารพิษที่สามารถทำให้เกิดผลเสียต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำทั้งทางตรงและทางอ้อมอีกด้วย เนื่องจากสีย้อมส่วนใหญ่เป็นสารเคมีที่มีไฮโดรคาร์บอน พวกอะลิฟาติก และ อะโรมาติกเป็นส่วนประกอบ ซึ่งเป็นสารประกอบที่ย่อยสลายได้ยาก [สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย, 2544; Pranswad และ Prayumpohm, 1986; Luangdilok และ Panswad, 2000]

ดังนั้น จึงเป็นที่น่าสนใจในการนำเส้นใยเห็ดหรือเอนไซม์ที่เห็ดผลิตได้มาใช้ในการบำบัดสีย้อมเพื่อลดความเป็นพิษที่จะเกิดจากการใช้สารเคมีมากำจัดสีย้อม แม้ว่าเห็ดหอมสามารถผลิตได้ทั้งแลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกไซด์ แต่มีรายงานว่าเห็ดหอมผลิตแลคเคสปริมาณมาก และแลคเคสจากเห็ดหอมสายพันธุ์ที่พัฒนาขึ้นก็มีความสามารถในการผลิตแลคเคสสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ [Panyamee, 2005] รวมทั้งการใช้เอนไซม์แลคเคสจากเห็ดหอมยังมีข้อได้เปรียบอย่างอื่นนั่นคือเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับสเตรทกว้างซึ่งหมายถึงเราสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการกำจัดสิ่งที่เป็นพิษได้มากมายหลายชนิด และยังมีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมอีกด้วย [Mata และ Savoie, 1998; Hatvani และคณะ, 2003] นอกจากนี้หลังจากที่เก็บเกี่ยวผลผลิตดอกเห็ดแล้ว ก้อนเห็ดที่เหลือสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์ได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะทำการเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์แลคเคสให้สูงขึ้น และทำการแยกและทำแลคเคสให้บริสุทธิ์ จากนั้นศึกษาลักษณะบางประการของแลคเคส ลักษณะทางชีวเคมี รวมทั้งทำการศึกษาคูณลักษณะทางโมเลกุลของจีนที่สังเคราะห์เอนไซม์แลคเคส และนำเอนไซม์แลคเคสที่บริสุทธิ์นั้นมาใช้ในการบำบัดสีย้อมและน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมต่อไป

## 1.2 วัตถุประสงค์หลักของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแลคเคสจากเห็ดหอมลูกผสมสายพันธุ์ที่นร้อน
- 1.2.2 พัฒนาขั้นตอนและวิธีทำให้แลคเคสจากเห็ดหอมลูกผสมสายพันธุ์ที่นร้อนให้บริสุทธิ์
- 1.2.3 เพื่อศึกษาคูณลักษณะทางชีวเคมีของเอนไซม์ และคูณลักษณะทางโมเลกุลของจีนที่ผลิตแลคเคส
- 1.2.4 เพื่อศึกษาความสามารถของแลคเคสบริสุทธิ์จากเห็ดหอมลูกผสมสายพันธุ์ที่นร้อนในการฟอกจางสีย้อม

## 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ มุ่งศึกษากระบวนการเพิ่มผลผลิตของแลคเคสของเห็ดหอมสายพันธุ์ที่นร้อน ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผู้วิจัยได้ผสมพันธุ์และคัดเลือกเพื่อให้ได้ผลผลิตดอกสูง นอกจากนี้ยังสามารถเพาะเลี้ยงได้ในอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิปกติเฉลี่ย (25 – 34 องศาเซลเซียส) ซึ่งเหมาะสมกับการใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์ หลังจากนั้นมีการเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์แลคเคสโดยอาศัย

พารามิเตอร์ต่างๆที่เป็นคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ เช่น สารเหนี่ยวนำ (inducers) ที่มีความจำเพาะต่อการผลิตเอนไซม์ องค์ประกอบของสับสเตรทที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ และนำเอนไซม์ไปทำให้บริสุทธิ์เพื่อศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ รวมไปถึงการศึกษาระดับโมเลกุลของจิ้นสังเคราะห์เอนไซม์แลคเคสเพื่อความเข้าใจและใช้ประโยชน์ในการนำไปพอกจางสีน้ำตาลจากอุตสาหกรรมฟอกย้อม ตลอดจนนำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมชนิดอื่น เช่นจากอุตสาหกรรม

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

### 1.4.1 ด้านพื้นฐาน

1.4.1.1 สามารถเข้าใจถึงเทคนิค ความรู้และวิธีการในการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมที่เหมาะสมกับการใช้ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและชีววิทยาระดับโมเลกุลของเห็ดหอม

1.4.1.2 สามารถเข้าใจถึงธรรมชาติและรูปแบบการสังเคราะห์เอนไซม์แลคเคสรวมถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ ปลดปล่อยเอนไซม์ของเส้นใยเห็ดหอม

1.4.1.3 สามารถเข้าใจเทคนิคการแยกและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

1.4.1.4 ได้สายพันธุ์เห็ดหอมทนร้อนที่เหมาะสมกับการนำมาเป็นแหล่งของเอนไซม์แลคเคส

### 1.4.2 ด้านประยุกต์

1.4.2.1 ข้อมูลและความรู้ที่ได้สามารถนำมาใช้ประยุกต์ในการบำบัดพอกจางสีย้อม สิ่งทอและกระดาษ

1.4.2.2 สามารถนำเทคโนโลยีเอนไซม์ไปลดความเป็นพิษของน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมโดยเฉพาะอุตสาหกรรมจากการเกษตร

1.4.2.3 สามารถนำมลดความเป็นพิษของสารพิษจากโรงงานอุตสาหกรรมโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพได้

1.4.2.4 ผลการทดลองที่ได้จะใช้เป็นแม่แบบในการพัฒนาเทคนิคการตรึงเอนไซม์และนำไปสู่การออกแบบถึงปฏิกรณ์ชีวภาพในการกำจัดสีย้อมในน้ำที่มีมลพิษทางด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมในระดับขยายส่วนต่อไป นับเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญในการเริ่มต้นกระบวนการผลิตทางเทคโนโลยีชีวภาพโดยอาศัยเทคโนโลยีเอนไซม์ที่มีความสำคัญยิ่ง

1.4.2.5 ผลงานวิจัยที่ได้จะมีคุณค่าทางวิชาการสามารถตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและนานาชาติได้อย่างน้อย 1-2 บทความ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในวารสารเกี่ยวกับเห็ดรา เทคโนโลยีเอนไซม์และเทคโนโลยีชีวภาพ อาทิเช่น Mycology, Mycological Research, Enzyme and Microbial Technology, Applied Microbiology and Biotechnology, Applied Biochemistry and Biotechnology หรือวารสารที่เทียบเท่าอื่นๆ เหล่านี้เป็นต้น

## 1.5 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

ตามปกติเห็ดมีความต้องการธาตุอาหารจากอินทรีย์วัตถุโดยผ่านกระบวนการที่ค่อนข้างซับซ้อน จากการศึกษา พบว่า เห็ดมีความต้องการอาหารหลายชนิด และแหล่งอาหารคาร์บอนเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญที่สุดชนิดหนึ่ง ซึ่งเห็ดใช้ในการเจริญเติบโต โดยเฉพาะเกี่ยวกับการสร้างเซลล์ที่เป็นโครงสร้างของเห็ดและเป็นแหล่งให้พลังงานแก่เห็ด แหล่งอาหารประเภทคาร์บอนได้แก่ น้ำตาลต่างๆ เช่น กลูโคส ไซโลส อะราบินอสและฟรุคโตส ซึ่งจัดเป็นอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่มีมวลโมเลกุลขนาดเล็ก แต่วัสดุที่ใช้เพาะเห็ดมีสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน จึงจำเป็นต้องอาศัยเอนไซม์ในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตที่มีขนาดใหญ่เหล่านี้ให้มีขนาดเล็กลง ซึ่งเห็ดจะสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโต เอนไซม์เหล่านี้ได้แก่ เซลลูเลส เช่นคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส เบต้า-กลูโคซิเดส, เฮมิเซลลูเลส เช่น ไซลาเนส เบต้า-ไซโลซิเดส และ ลิกนินโกลติกเอนไซม์ เช่น แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ลิกนินเปอร์ออกซิเดส เป็นต้น [Adsawasoonnet และคณะ, 1991; Panichajakul และคณะ, 1991]

Perez และคณะ [1990] พบว่าแมงกานีสเหนี่ยวนำการสังเคราะห์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสแต่ยับยั้งการสังเคราะห์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส และการย่อยสลายลิกนินเกิดได้ที่ระดับแมงกานีสต่ำๆซึ่งสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณลิกนินเปอร์ออกซิเดสเท่านั้น Schlosses และคณะ [1997] พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *Trametes vericlor* ในฟางข้าวสาลีและไม้ปืสามารถเหนี่ยวนำให้ผลิตแลคเคสสูงกว่าเมื่อเลี้ยงด้วยกลูโคส และพบแอคติวิตีของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสต่ำตลอดช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยง Heinzkill และคณะ [1998] ได้ศึกษาคุณสมบัติบางประการของแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสในเชื้อราสกุล *Coprinaceae* พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 42-46 กิโลดาลตัน ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมคือ 4-5 มีค่า isoelectric point ที่ 3.9-4.1 เห็ดหอมเป็นแหล่งของ แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสที่ตีมาก โดยมีการผลิตมากเมื่อเพาะเลี้ยงในไม้ในการเพาะเห็ดในอุตสาหกรรม และเมื่อทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ พบว่ามีลักษณะเป็นหน่วยย่อยเดี่ยว มีเหล็กเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล [Grabski et al., 1998]

การเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งไม่ว่าในจานเพาะเชื้อหรือในอาหารก้อนขี้เลื่อย มีงานวิจัยที่ได้ศึกษาเพื่อจะได้ข้อมูลที่ใกล้เคียงกับความเป็นจริงตามธรรมชาติ เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาพปกติ มีหลายงานวิจัยด้วยกันที่ได้ศึกษาเรื่องของเอนไซม์ เช่น Motson และคณะ [1991] พบว่าการย่อยสลายลิกนินของเห็ดนางรมสีทอง เห็ดนางฟ้า และเห็ดหอมเกิดในระยะเวลาการเจริญทุกติภูมิในช่วงการเจริญคงที่ Okeke และคณะ [1993] ศึกษาพบว่าแอคติวิตีของแลคเคสจะเพิ่มขึ้นเมื่อทำการกระตุ้นเส้นใยเห็ดหอมด้วยความเย็น มีผลเหนี่ยวนำให้เกิดดอก และยังพบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ไม่สัมพันธ์กับปริมาณโปรตีน หรือการเจริญของเส้นใยในอาหารขี้เลื่อยไม้ไผ่ Mata และ Savoie [1998] ศึกษาแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ในเห็ดหอม 6 สายพันธุ์ระหว่างการเพาะเลี้ยงในฟางข้าว พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของแลคเคสในช่วงแรกของการเจริญซึ่งมีความสัมพันธ์กับการย่อยสลายลิกนิน สายพันธุ์ที่มีการเจริญอย่างรวดเร็วจะมีการผลิตเอนไซม์สูง Zhao และ Kwan [1999] ศึกษาพบว่าสาร guaiacol, tannic acid, 2,4-xylydine และ veratryl alcohol ไม่มีผลเหนี่ยวนำแลคเคสในเห็ดหอม และพบว่าส่วนของหมวกดอกที่โตเต็มที่จะมีแอคติวิตีของแลคเคสสูงสุด โดยเสนอว่าแลคเคสน่าจะเกี่ยวข้องกับรูปร่างและโครงสร้างของดอก แอคติวิตี

ของแลคเคสจะมีค่าสูงสุดในระยะการเจริญของเส้นใยเห็ดหอม หรือเมื่อถูกกระตุ้นด้วยความเย็น และลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเริ่มต้นระยะเกิดดอก ในช่วงเวลาที่แอคติวิตีของแลคเคสระดับลงจะ พบแอคติวิตีของเซลลูเลสเพิ่มสูงขึ้น [Ohga et al., 2001]

การทดลองของ Makkar และคณะ [2001] แสดงให้เห็นว่ามีเอนไซม์อย่างน้อย 4 ชนิด ได้แก่ แลคเคส เพอร์ออกซิเดส แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส และเบต้า-กลูโคซิเดส เมื่อเพาะเลี้ยง เห็ดหอมในขี้เลื่อยบดที่มีรำข้าวผสม การผลิตแลคเคสและแมงกานีส เพอร์ออกซิเดสโดยเห็ดหอม เมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้ผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตเบียร์ พบว่าสามารถเพิ่มแอคติวิตีของ เอนไซม์ได้สูงขึ้นเมื่อผสมกับขี้เถ้าและเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งและในอาหารเหลว [Hatvani และ Mecs, 2001] การศึกษาเอนไซม์ย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสของเห็ดหอม 3 สายพันธุ์ระหว่างการ เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเปลือกยูคาลิปตัส พบว่าเห็ดหอมมีการสร้างเอนไซม์ แลคเคส แมงกานีสเพอร์ออกซิเดส เซลลูเลส และไซลาเนส แต่ไม่พบว่ามีลิกนินเพอร์ออกซิเดส [Cavallazzi และคณะ, 2004] การทดลองของ Zeng และคณะ [2006] ได้ศึกษาแอคติวิตีของแลคเคสจากเชื้อรา จากดิน *Penicillium simplicissimum* ในการย่อยสลายลิกนิน ในระหว่างการเพาะเลี้ยงในอาหาร แข็งที่มีฟางข้าวเป็นองค์ประกอบ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเสริมแหล่งคาร์บอนจะช่วย เพิ่มแอคติวิตีของแลคเคส โดยพบว่า ABTS (2,2'-azino-bis(3 ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) เป็นตัวเหนี่ยวนำการสังเคราะห์เอนไซม์ในขณะที่ xyldine ไม่มีผลแต่อย่างใด นอกจากนี้ยัง มีการศึกษาถึงปัจจัยของอาหารเพาะเลี้ยงที่มีผลต่อการสังเคราะห์แลคเคสที่ได้จากเห็ดหัวลิง (*Grifola frondosa*) [Xing และคณะ, 2006] และการศึกษาการเพิ่มผลผลิตแลคเคสโดยใช้อาหารที่ ปรับปรุงขึ้นสำหรับเห็ดหลินจือ (*Ganoderma* sp.) [Teerapatsakul และคณะ, 2007]

มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดหอมในอาหารเหลวซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในแง่ของการ ย่นระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง สามารถควบคุมการผลิต ได้ดี และมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องเช่น การศึกษาองค์ประกอบและแอคติวิตีของสารออกฤทธิ์ทางด้าน อิมมูโนวิทยาจากเส้นใยเห็ดหอมเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวในพลาสติก [Hasegawa และคณะ, 2005] และในถึงปฏิกรณ์ชีวภาพในห้องปฏิบัติการ [Lobanok และคณะ, 2003] การศึกษาหา ความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างทางโมเลกุลของแหล่งไนโตรเจนกับ เลคตินที่ผลิตจากเห็ดหอม เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวพบว่าสามารถติดตามความสัมพันธ์ได้ดีและสะดวก [Tsvileva และ คณะ, 2004] นอกจากเห็ดหอมแล้วยังมีการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวในเห็ดหลินจือ จากการทดลองของ Avtonomova และคณะ [2006] โดยทดลองหาอาหารที่เหมาะสมเพื่อ เพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหลินจือ นอกจากนี้แล้วเทคนิคการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวยังมีการใช้เพื่อ ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสด้วย ซึ่งแลคเคสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายลิกนินร่วมกับเอนไซม์ อื่นๆเช่น ลิกนินเนส และเพอร์ออกซิเดส พบใน basidiomycetes ที่ย่อยสลายไม้ได้ มีรายงาน เกี่ยวกับความสำคัญของ แลคเคสต่อการเจริญเติบโตและออกดอกในเห็ด เช่น Leatham [1986] ที่ ใช้เห็ดหอมสายพันธุ์ที่เกิดดอกได้ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว จะมีการสังเคราะห์แลคเคสภายในเซลล์ สูงสุดพร้อมกับการเจริญอย่างรวดเร็วของตุ่มดอก แมงกานีสเพอร์ออกซิเดสเป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่ พบได้ใน white rot fungi ที่ย่อยสลายไม้ การทดลองของ Baldrian และ Gabriel [2002] ผลการ ทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อมีโลหะหนักในสภาพแวดล้อมจะมีผลต่อการควบคุมแอคติวิตีของ เอนไซม์ และการกระตุ้นและทำให้แลคเคสจากเห็ดนางรมมีความเสถียรด้วยทองแดง ดูเหมือนว่า

จะมีประโยชน์ในด้านการประยุกต์ใช้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพในแง่ของการตรึงเอนไซม์และการนำมาใช้งาน

นอกจากเห็ดนางรมแล้วยังมีการทดลองในเห็ดฟางโดยการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์แลคเคสด้วยทองแดงเช่นกัน [Chen และคณะ, 2003] และมีการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีและโมเลกุลของแลคเคส จากเห็ดฟางด้วย [Chen และคณะ, 2004] จากการทดลองของ Buswell และคณะ [1996] ทำการเพาะเลี้ยงเห็ดในอาหารเหลวที่แปรผันแหล่งของคาร์บอน พบว่า เห็ดหอมจะเจริญได้ดีในสับสเตรทที่มีลิกนินสูงเช่น ไม้หรือขี้เลื่อย จะมีการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส และแลคเคส ซึ่งแตกต่างจากเห็ดฟางจะเจริญได้ดีในอาหารที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลสมากกว่า ลิกนิน มีรายงานการวิจัยของ Palmieri และคณะ [2000] กล่าวถึงทองแดงที่มีผลต่อการเหนี่ยวนำไอโซเอนไซม์ของแลคเคสในเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (basal medium) และมีการศึกษาจลนพลศาสตร์ของแลคเคสบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเห็ดนางรม [Tinoco และคณะ, 2001] นอกจากนี้ยังมีการติดตามความแตกต่างของการแสดงออกของยีนควบคุมแลคเคสในเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajor-caju*) [Soden และ Dobson, 2001] และยังมีการทดลองของ Soden และคณะ [2002] ได้ทำการโคลนยีนที่ควบคุมไอโซไซม์แลคเคส ในเห็ดนางฟ้า และให้แสดงออกในเซลล์เจ้าบ้าน *Pichia pastoris* Renato และคณะ [2005] ได้คัดเลือกสารเหนี่ยวนำการผลิตแลคเคสจากเห็ดหอมเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการผลิตแลคเคสคือ 2.6 มิลลิโมลาร์กับ 250 ไมโครโมลาร์ทองแดงจะมีการผลิตแลคเคสได้สูงที่สุด นอกจากนี้แอมโมเนียมทาร์เตรทก็เพิ่มแอกติวิตีของแลคเคสด้วย และในการทดลองยังพบว่าทุกการทดลองมีแลคเคสไอโซไซม์ 1 ชนิด แสดงว่าการเติมสารประกอบอื่นๆไม่มีการเหนี่ยวนำการสร้างไอโซไซม์ชนิดใหม่ๆขึ้น และจากการทดลองของ Collins และ Dobson [1997] ที่ติดตามผลกระทบของความเข้มข้นของแอมโมเนียมทาร์เตรท 5 ระดับใน *Trametes versicolor* และไม่เพียงแต่เพิ่มแอกติวิตีของแลคเคสเท่านั้นแต่ยังมีการเพิ่มระดับของ *lcc* mRNA ซึ่งข้อมูลแสดงให้เห็นว่า ใน *T. versicolor* การแสดงออกของยีนถูกควบคุมระดับด้วยแหล่งของไนโตรเจน

นอกจากการศึกษาทางด้านแอกติวิตีของแลคเคสในอาหารเพาะเลี้ยงชนิดแข็งและอาหารเหลว มีนักวิจัยหลายท่านที่ทำการศึกษาด้านลักษณะทางโมเลกุลของแลคเคส เช่นจากการศึกษาของ Tetsch และคณะ [2006] ทำการศึกษาลักษณะทางโมเลกุลและคุณลักษณะบางประการของแลคเคสที่อยู่ภายในและที่ถูกปลดปล่อยออกมาภายนอกโดย *Hortaea acidophila* ซึ่งเป็นเชื้อราที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่พีเอชต่ำกว่า 6 และผลิตแลคเคสได้ เมื่อใช้ 2,6-dimethoxyphenol เป็นสับสเตรทและมีการศึกษาลำดับยีนแลคเคสด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ในการทดลองของ Makela และคณะ [2006] ที่ได้ศึกษาการแสดงออกและคุณสมบัติทางด้านโมเลกุลของแลคเคสจาก *Phlebia radiata* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีไม้เป็นองค์ประกอบ และมีการศึกษาถึงแลคเคสจากเชื้อราส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ มีลักษณะเป็นไกลโคโปรตีน โพลีเปปไทด์สายเดี่ยว และมีน้ำหนักโมเลกุลจาก 60 ถึง 80 กิโลดาลตัน [Thurston, 1994; Baldrian, 2006] ส่วนใหญ่ white rot fungi จะมีการแสดงออกของไอโซไซม์แลคเคสหลายตัว เช่นในกลุ่ม *Trametes* และ *Pleurotus* [Giardina และคณะ, 1995; Yaver และ Golightly, 1996; Yaver และคณะ, 1996] ในจีโนมของ saprophytic

basidiomycetes *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*) ประกอบด้วยจีนที่ควบคุมการสังเคราะห์แลคเคสถึง 17 non-alle [Kilara และคณะ, 2006] เนื่องจากแลคเคสมีความจำเพาะต่อสับสเตรทกว้างจึงได้รับความสนใจสำหรับการนำมาประยุกต์ใช้ในการฟอกสีกระดาษ การลดความเป็นพิษ และการกำจัดสารพิษ รวมทั้งการผลิตสารเคมีใหม่ๆ [Hatakka, 2001; Mayer และ Staples, 2002] อย่างไรก็ตามการแสดงออกของแลคเคสต่อสับสเตรทที่เป็นลิกโนเซลลูโลสมีบางรายงานเท่านั้น เช่นในเห็ดกระดุม (*Agaricus bisporus*) [Smith และคณะ, 1998] และเห็ดหอม [Ohga และ Royse, 2001] และจากการศึกษาของ Hilden และคณะ [2006] พบว่ามีการแสดงออกของจีนที่ควบคุมเมกานีสเปอร์ออกซิเดส และลิกนินเปอร์ออกซิเดสใน *P. radiata* และมีเพียง 1 แลคเคสไอโซไซม์ที่ถูกแยกและโคลนด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว แต่ก็แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มแลคเคสในอาหารแข็งที่มีฟางข้าว [Vares และคณะ, 1995]

Garcia และคณะ [2007] ได้ทำการแยกแลคเคสจาก *Pycnoporus sanguineus* และทำให้บริสุทธิ์ด้วย phenyl-Sepharose column พบว่าแลคเคสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 54 เท่า ผลผลิต 8.37% โดยใช้ syringaldazine เป็นสับสเตรท แลคเคสที่ทำให้บริสุทธิ์มีขนาดประมาณ 69 และ 68 กิโลดาลตันเมื่อใช้ SDS-PAGE gel และ gel filtration ตามลำดับ มีค่า Km สำหรับ ABTS, syringaldazine และ guaiacol มีค่า 58, 8.3 และ 370 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ มีค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมเมื่อใช้ syringaldazine เป็นสับสเตรทเท่ากับ 4.2 และ 50 องศาเซลเซียสตามลำดับ นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีความเสถียรต่ออุณหภูมิอีกด้วยเมื่อเก็บรักษาที่ 50 องศาเซลเซียสที่ 24 และ 48 ชั่วโมงยังคงมีแอกติวิตีเหลือถึง 93 และ 76% ตามลำดับ นอกจากนี้แลคเคสยังสามารถถูกยับยั้งด้วย L-cystein, beta-mercaptoethanol, NaN<sub>3</sub>, NaF และ HgCl<sub>2</sub>

มีงานวิจัยที่มีการศึกษาการแยกและทำแลคเคสที่ถูกปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ให้บริสุทธิ์ จาก *Pycnoporus coccineus* [Pointing และคณะ, 2000] *Pycnoporus cinnabarinus* [Eggert และคณะ, 1996] *Chalaraparoadoxa* CH32 [Robels และคณะ, 2002] *Trametes gallica* [Dong และ Zhang, 2004] แต่ก็ยังมีข้อมูลไม่มากนักเกี่ยวกับการทำให้บริสุทธิ์และคุณลักษณะของแลคเคสจากเห็ดหอม โดยมีการทำแลคเคสให้บริสุทธิ์ของเห็ดหอมจากการศึกษาของ Thurston [1994] การศึกษาพบที่มีความแตกต่างกันของน้ำหนักลมเลกุลของแลคเคสที่แยกได้จากเห็ดหอม เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kofujita และคณะ [1991] แยกแลคเคสจากเห็ดหอม K-3139 พบว่ามีค่า 65 กิโลดาลตันโดยวิธี SDS-PAGE ส่วนเห็ดหอม SC-495 มีค่า 37 กิโลดาลตัน โดยวิธี SDS-PAGE และ 74 กิโลดาลตันโดยวิธี gel filtration [D'Annibale และคณะ, 1996] Makkar และคณะ [2001] แยกแลคเคสจากเห็ดหอม TMI800 และรายงานว่ายู่ภายใน 660 กิโลดาลตันเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสอื่นๆ และยังมีการศึกษาของนักวิจัยบางกลุ่มที่แยกแลคเคสจากเห็ดหอมแต่มีคุณลักษณะของเอนไซม์ที่ต่างกัน อาจพออนุมานได้ว่าเกิดจากสภาวะในการเพาะเลี้ยงก่อนทำการสกัดแยก โดยพบว่าเห็ดหอมที่เจริญในอาหารแข็งสับสเตรทลิกโนเซลลูโลสกับอาหารเหลวมีลักษณะที่แตกต่างกัน [Zhao และ Kwan, 1999]

จากการที่ผลิตภัณฑ์ผ้าไหมของภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้รับความนิยมทั้งในและต่างประเทศจึงมีเกษตรกรจำนวนมากที่ประกอบอาชีพปลูกหม่อนเลี้ยงไหม และทอผ้าไหมในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยจากจำนวนเกษตรกรที่ปลูกหม่อนเลี้ยงไหมทั่วประเทศรวมประมาณ 400,000 ครอบครัว กว่า 90%อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีการปลูกหม่อนเลี้ยงไหมกันมาก

จากเส้นไหมที่ผลิตได้ประมาณ 50% เกษตรกรจะนำไปทอเป็นผืนผ้าด้วยตนเองส่วนที่เหลือจะขายต่อให้พ่อค้าคนกลางเพื่อส่งต่อไปโรงงานทอผ้าไหมอีกทอดหนึ่ง มากกว่า 95%ของการย้อมสีผ้าไหมเป็นการย้อมด้วยสีสังเคราะห์ซึ่งแม้จะมีข้อดีมากมายแต่ก็เสี่ยงต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม จากแผนผังที่ 1 แสดงกรรมวิธีการฟอกย้อมเส้นไหมของครัวเรือนและจุดปล่อยน้ำทิ้ง

### ขั้นตอนการฟอกย้อม

ต่างฟอกขาวไหม  
เส้นไหม

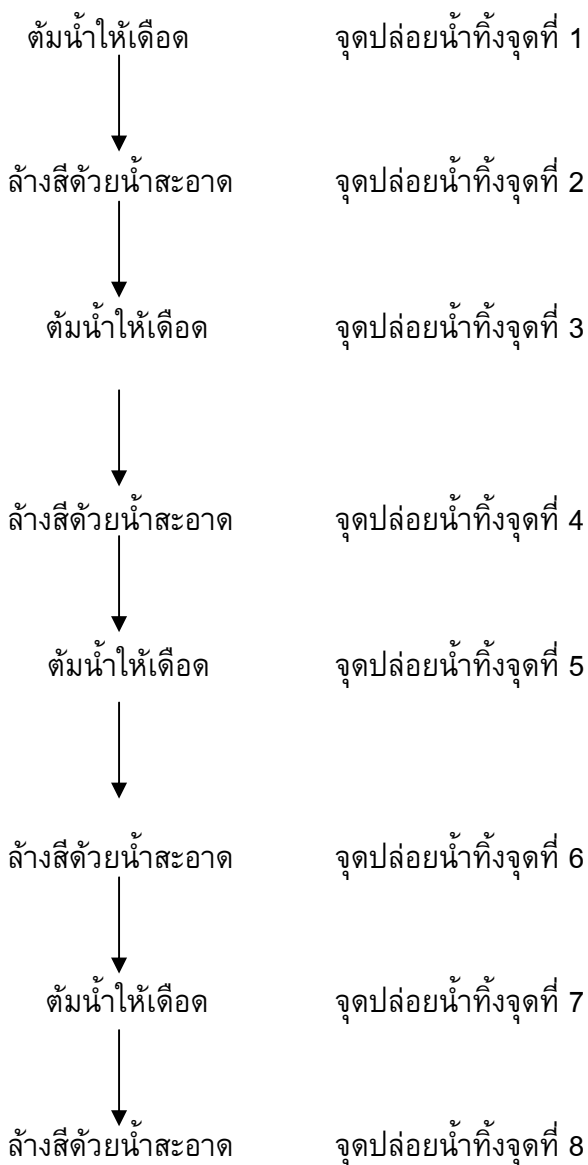
### ขั้นตอนการย้อม

สีที่ต้องการย้อม  
เส้นไหม  
เคมีผงมัน

### ขั้นตอนการทำมัดหมี่

สารกัดสี (ผงเหมีน)  
เส้นไหมที่มัดลายแล้ว  
ให้เปลี่ยนเป็นสีขาว

สีเคมีที่ต้องการ  
เส้นไหมที่มัดลาย



**แผนผังที่ 1** แสดงกรรมวิธีการฟอกย้อมเส้นไหมและจุดปล่อยน้ำทิ้ง

หมายเหตุ จุดปล่อยน้ำทิ้งจุดที่ 1, 3, 5 และ 7 จะมีความเข้มข้นของสีเคมีที่ใช้ในการย้อมไหมมาก  
จุดปล่อยน้ำทิ้งจุดที่ 2, 4, 6 และ 8 จะมีความเข้มข้นของสีเคมีที่ใช้ในการย้อมไหมน้อย

ในกระบวนการฟอกย้อมเส้นไหมของครีวเรือนก่อให้เกิดปัญหาของสีย้อมในน้ำทิ้ง ทำให้ น้ำมีสีเป็นที่น่ารังเกียจ จึงจำเป็นต้องมีการกำจัดสีออกจากน้ำทิ้ง เพราะสีเหล่านี้ทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้ สารอินทรีย์ทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำลดลง บางชนิดเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต ทำให้น้ำเสียมีค่าพีเอชสูงขึ้น อุณหภูมิของน้ำเสียจะสูงขึ้น สีทำให้ปริมาณแสงส่องผ่านลดลงส่งผลให้พืชน้ำไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้ (สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย, 2544) นอกจากการฟอกย้อมเส้นไหมในระดับครัวเรือนแล้ว อุตสาหกรรมฟอกย้อมเป็นอุตสาหกรรมขั้นกลางในอุตสาหกรรมสิ่งทอ ซึ่งเป็นขั้นตอนเปลี่ยนวัสดุสิ่งทอในรูปที่ยังเป็นเส้นด้ายหรือผ้าดิบให้เป็นวัสดุสำเร็จที่สามารถนำไปผลิตต่อไปได้หรือจำหน่ายแก่ผู้บริโภค กระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมฟอกย้อมส่วนใหญ่เป็นกระบวนการที่ใช้สารเคมีและสีย้อม ซึ่งมักอาศัยน้ำเป็นตัวกลางเกือบทุกขั้นตอนจึงเป็นอุตสาหกรรมที่ต้องใช้น้ำปริมาณมากในกระบวนการผลิตจึง ก่อให้เกิดน้ำเสียจากโรงงานฟอกย้อมเป็นจำนวนมาก จึงจำเป็นต้องมีการบำบัดน้ำทิ้งเหล่านี้ก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะเพื่อป้องกันมลพิษน้ำและสิ่งแวดล้อม [ธงชัย พรรณสวัสดิ์, 2527; Chinwetkitvanich และคณะ, 2000; Iamsamer และคณะ, 2001]

การกำจัดสีย้อมมีหลายวิธีทั้งทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ จึงมีการพยายามหาวิธีการใหม่ๆ มาใช้ประโยชน์ในการกำจัดสีย้อม จากการที่เห็ดทั้งหลายที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน (แลคเคส แมงกานีสเปอร์ออกซิเดสและลิกนินเปอร์ออกซิเดส) ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายสารประกอบฟีนอลได้จึงมีงานวิจัยที่พยายามนำเอนไซม์เหล่านี้มาใช้ในการกำจัดสีย้อม Robinson และคณะ [2001] แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้เอนไซม์ย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสจาก white rot fungi พวก *Bjerkandera adusta*, *Phlebia tremellosa*, *Pleurotus ostreatus* และ *Coriolus versicolor* ในการย่อยสลายสีย้อมสังเคราะห์ได้ และในการศึกษาพบว่าแม้ว่าความเข้มข้นของไนโตรเจนที่สูงจะเพิ่มแอกติวิตีของเอนไซม์ แต่ก็พบมีการเพิ่มความ สามารถในการย่อยสลายเพียงเล็กน้อย จากการทดลองของ Hatvani และ Mecs [2002] ได้ทดลองเพาะเลี้ยงเห็ดหอมในอาหารแข็งที่มีสีย้อม Poly R-478, Remazol Brilliant Blue R และ Orange II เป็นองค์ประกอบ พบว่าเส้นใยเห็ดหอมสามารถลดสีย้อมทั้ง 3 ชนิดได้ และในการทดลองต่อมา Hatvani และ Mecs [2003] ศึกษาพารามิเตอร์ต่างๆ ที่มีผลต่อการทนต่อโลหะหนักเพื่อประโยชน์ในการนำเอนไซม์จากเส้นใยเห็ดหอมไปใช้ประโยชน์ได้หลายทาง นอกจากนี้แล้ว ยังมีเห็ดนางฟ้าที่พบว่ามีประสิทธิภาพนำเอาเอนไซม์แลคเคสมาใช้ในขั้นตอนการลดสีย้อมประเภทสีอะโซย้อมเส้นใยประเภทไนลอน อะครีลิกและโพลีเอสเตอร์ [Marugesan และคณะ, 2006]

เนื่องจากมีสีย้อมกว่า 100,000 ชนิดที่ขายตามท้องตลาด สีย้อมเหล่านี้ถูกออกแบบให้ทนต่อแสง น้ำ และสารเคมี ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะกำจัดสีย้อมจากน้ำทิ้ง [Nigam และคณะ, 2000; Robinson และคณะ, 2001] วิธีดั้งเดิมในการกำจัดสีย้อมนั้นค่อนข้างด้อยประสิทธิภาพ มีราคาแพง ยุ่งยากในการปฏิบัติและของเหลือทิ้งจากการบำบัดจะต้องทำการกำจัดต่อไปมีปริมาณมาก ดังนั้น เพื่อเพิ่มศักยภาพในการกำจัดสีย้อมจึงมีความสนใจที่จะนำเอนไซม์ที่ได้จากการแยก ทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณลักษณะบางประการจากการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมในอาหารเหลว รวมทั้งคุณลักษณะทางโมเลกุลด้านจิ้นที่สังเคราะห์แลคเคส มาทดลองใช้ในการกำจัดสีย้อมผ้า ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสีย้อมเอซิก เมทิลคอมเพล็กซ์ ไตรเร็กซ์ ดิสเพอร์ส รีเอกทีฟ อะโซอิก แร็ด มอร์แดนท์ หรือโครม และสีเบสิค ในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่ออนาคตหากมีความเป็นไปได้จากการทดลอง

ต่อไปอาจนำไปสู่ระดับการบำบัดในอุตสาหกรรมน้ำเสียจากสีฟอกย้อมอื่นๆได้รวมทั้งน้ำเสียที่มีสีจากกระบวนการผลิตเช่น จากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาล เป็นต้น นอกจากนี้ถ้าผลการวิจัยมีความเป็นไปได้จะนำไปสู่การผลิตระดับอุตสาหกรรม รวมทั้งการนำเทคนิคการตรึงเอนไซม์มาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ รวมทั้งการพัฒนาถึงปฏิกิริยชีวภาพเพื่อพัฒนากระบวนการฟอกย้อมต่อไป

## บทที่ 2

### วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือและวิธีการวิจัย

#### 2.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

##### 2.1.1 สายพันธุ์เห็ดหอมที่ใช้ในการทดลอง

เห็ดหอมมีทั้งหมด 7 สายพันธุ์ (KMU2 และ KMU4 ได้จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; KMU11 ได้จากกรมวิชาการเกษตร; KMUH1-KMUH2-KMUH3-KMUH4 เห็ดหอมลูกผสมทนร้อน จากวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาเอก ดร.ปิยนันท์ ชมนาวัง) ที่เก็บรักษาไว้โดยการทำเป็น stock culture บนอาหารแข็งมันฝรั่งเด็กซ์โทรส

##### 2.1.2 แบคทีเรีย *Escherichia coli*

แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  ใช้สำหรับเป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ในการโคลนยีนซึ่งบนโครโมโซมจะมีตำแหน่ง lacZ $\Delta$ M13 เป็นดีเอ็นเอโมเลกุลเครื่องหมาย (DNA molecular marker) สำหรับใช้ในการคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการสอดแทรกอยู่ โดยอาศัยลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางฟีโนไทป์ของโคโลนีระหว่างสีฟ้าและสีขาว ที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสาร X-gal ซึ่งเรียกการคัดเลือกแบบนี้ว่า Blue/White selection

#### 2.2 วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี

##### 2.2.1 วัสดุ และอุปกรณ์

1. กระดาษกรอง Whatman No.1 (Whatman International, England)
2. กระดาษกรอง HA 0.45  $\mu$ m (Millipore Corporation, USA)
3. ถังไดอะไลซิส Cellulose dialysis tubing 12.5 mm (diameter)
4. Vivaspin 20, 30 kDa MWCO PES (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden)
5. Duran bottom size 2L ต่อ joint 1 ข้าง และต่อ joint 2 ข้าง
6. Column size 2.5x50 cm with stop cock
7. Column size 1.5x90 cm with stop cock
8. ดีเอ็นเอพาหะ (DNA vector)

ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ในการทดลองคือ pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector (Promega, USA) ใช้สำหรับโคลนชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR โดย pGEM<sup>®</sup>-T Easy vector จะมีปลาย 3'terminal thymidine (T) ซึ่งมีความจำเพาะกับปลาย 3'terminal adenine (A) ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่สร้าง

ขึ้นโดยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase และใช้เป็นพาหะสำหรับการโคลนยีนและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายภายในเซลล์เจ้าบ้าน (*E. coli*) ซึ่งมียีนที่ให้ลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (Ampicillin) และยังมีส่วนของยีน  $\beta$ -galactosidase (*lacZ*) อยู่บนโมเลกุลของดีเอ็นเอพาหะด้วย

9. ดีเอ็นเอโมเลกุลเครื่องหมายมาตรฐาน (Standard DNA molecular weight marker)

$\lambda$ HindIII DNA marker, GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder และ GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (fermentas, USA) ใช้เป็นดีเอ็นเอโมเลกุลเครื่องหมายมาตรฐานที่ทราบขนาด ใช้สำหรับตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ซึ่งประกอบด้วยชั้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆกัน

#### 10. เอนไซม์

เอนไซม์สำหรับใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและการโคลนยีน เช่น *Taq* DNA polymerase, Ribonuclease A, Proteinase K และ T4 DNA ligase (Fermentas, USA)

11. วัสดุอื่นๆ เช่น ยางรัด แผ่นป้าย ปากกาเคมีเขียนชื่อและวันที่ทำการทดลอง และพาราฟิล์ม

### 2.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. สับสเตรทสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของแลคเคส ได้แก่ ABTS (3-ethylbenzthazoline-6-sulfonic acid) และ 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehydeazine (Syringaldazine) (Sigma Chemical Co., U.S.A.; Fluka, Switzerland), 2,6-Dimethoxyphenol และ Guaiacol (Fluka, Switzerland)

2. อาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง Potato dextrose agar, Potato dextrose broth และ LB (Luria betani) (Sigma Chemical Co., U.S.A.; Fluka, Switzerland)

3. สารที่ใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ DEAE-Sephadex A-50 และ Sephadex G-100 (Pharmacia biotech, Sweden), Ammonium sulfate (Fluka, Switzerland)

4. สารที่ใช้ทดสอบผลของไอออนโลหะ ได้แก่ EDTA, Sodium azide, Mercury sulfate, Copper chloride และ Manganese chloride (Fluka, Switzerland)

5. สีย้อมที่ใช้ในการทดลอง Bromophenol blue, Crystal violet, Phenol red, Fucisin, Indigo carmine, Methyl orange (Fluka, Switzerland)

6. สารที่ใช้ในการแยกและวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของแลคเคส Protein marker, Acrylamide solution (biorad), Ammonium persulphate, Sodium dodecyl sulphate, Tris-base, TEMED, Glyceral, 2-Mercaptoethanol, Glycine, Coomassie brilliant blue R-250, methanol, acetic acid, TCA (Fluka, Switzerland)

### 2.2.3 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น pH 211 Microprocessor pH meter (HANNA Instruments)
2. เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก
3. เครื่องผสมสาร (Vortex Scientifica, VECP)
4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง UV18000 spectrophotometer (Shimadzu, Japan)
5. หม้อนิ่งความดันไอน้ำ HV-85 (Hirayama, Japan)
6. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ Incubator psycrotherm (New Brunswick, U.S.A.)
7. ตู้ปลอดเชื้อ (Bosstech Scientific Instrument)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง Microfuge m22r (Bechman Coulter, U.S.A.)
9. ปิเปตอติโนมิติ Piperman P10, P20, P100, P200, P1000 ZGilson Medical Electronics, U.S.A., France)
10. อุปกรณ์อิเล็กโตรโฟรีซิส (The Emperoe Penguin™ Electrophoresis System)
11. เครื่อง Thermal cycler (Icycler Thermal Cycler, Bio-RAD, USA)
11. เครื่องถ่ายภาพสารพันธุกรรม GENIUS

## 2.3 วิธีดำเนินการวิจัย

### 2.3.1 การเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมในอาหารเหลว

เตรียมเชื้อเห็ดหอมตั้งต้น โดยนำเส้นใยเห็ดหอมจากเชื้อที่เก็บรักษาไว้โดยการทำให้เป็น stock culture ด้วยการนำเส้นใยมาเลี้ยงบนอาหารแข็งมันฝรั่งเด็กซ์โทรสในจานเลี้ยงเชื้อบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงนาน ประมาณ 2 สัปดาห์ จากนั้นใช้ที่เจาะจุกคอร์ก (cork borer) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะวงบริเวณที่มีเส้นใยปกคลุมห่างจากขอบจานเพาะเลี้ยง ประมาณ 1 เซนติเมตร นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งมันฝรั่งเด็กซ์โทรส บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการต่อเชื้อ (subculture) 3 ครั้ง เพื่อให้ได้เส้นใยที่มีความคงตัวและสามารถนำมาใช้ในการทดลองได้โดยทำการเจาะวง นำมาลอยบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในสภาพนิ่ง (static culture) บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2000 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน การเพาะเลี้ยงเส้นใยต้องทำในสภาพปลอดเชื้อ

### 2.3.2 การวัดการเจริญของเส้นใยเห็ดหอม

ทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวในสภาพนิ่ง เก็บเส้นใยเพื่อหาน้ำหนักแห้ง ทุกๆ 10 วัน โดยการกรองด้วย Buchner funnel ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1

ล้างเส้นใยให้สะอาดปราศจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง นำไปอบแห้งในตู้อบควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำหนักแห้งคงที่ ชั่งหาน้ำหนักแห้งของเส้นใยให้หมด

### 2.3.3 วิธีการเตรียมแหล่งของเอนไซม์

ทำการทดลองเหมือนข้อ 2.3.2 ที่หลังจากเก็บเส้นใยที่เลี้ยงบนอาหารเหลวแล้ว สารละลายที่เหลือนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์เพื่อเป็นการกำจัดสิ่งแปลกปลอม ที่ 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลายส่วนใส (crude culture supernatant) ที่ได้คือสารละลายเอนไซม์ นำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

### 2.3.4 วิธีการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์แลคเคส

ใช้ ABTS เป็นสับสเตรท เริ่มปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ 100 ไมโครลิตร บ่มกับ 0.02M ABTS ใน 0.2 โมลาร์อะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.2 ในปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 436 นาโนเมตร

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาออกซิไดซ์ 1 ไมโครโมลของ ABTS ต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

### 2.3.5 การหาปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

ผสมตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรกับสารละลายคอปเปอร์ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เติมสารละลายฟีนอลรีเอเจนต์ความเข้มข้น 1 นอร์มอล 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ปรับศูนย์โดยใช้น้ำกลั่น แทนตัวอย่าง ทำการทดสอบเช่นเดียวกัน อ่านค่าความเข้มข้นโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน BSA (Bovine Serum Albumin)

การเตรียมสารละลายสำหรับวัดปริมาณโปรตีน

สารละลาย ก: ละลาย 2 กรัมของโซเดียมคาร์บอเนต ด้วยสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 100 มิลลิลิตร

สารละลาย ข: ละลาย 1 กรัมของคอปเปอร์ซัลเฟตด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย ค: ละลาย 1 กรัมของโปแตสเซียมทาร์เตรตด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ก่อนใช้ผสมสารละลาย ก 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย ข 1 มิลลิลิตร และสารละลาย ค 1 มิลลิลิตร สารละลายผสมที่ได้ เรียกว่าสารละลายคอปเปอร์

### 2.3.6 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเกลือ

ดัดแปลงจากวิธีของ Fukushima and Kirk (1995) โดยหลังจากเก็บเกี่ยวสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมแล้ว นำสารละลายไปแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาละลายแล้วปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัด long-chain polysaccharides จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาทำการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate เพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการออก เนื่องจากโปรตีนแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่แตกต่างกันไป ดังนั้นสามารถทำการตกตะกอนที่มีลักษณะต่างกันด้วย ammonium sulfate อิ่มตัวจากนั้นติดตามปริมาณโปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์

สารละลาย ammonium sulfate อิ่มตัวใน 5 มิลลิลิตรของสารละลาย ปั่นเหวี่ยง จากนั้นเพิ่มความเข้มข้นของ ammonium sulfate โดยเพิ่มทีละ 5% จาก 30% ถึง 95% ปริมาณของกิจกรรมของแลคเคสในสารละลายนั้นติดตามด้วยการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์โดยใช้ ABTS เป็นสับสเตรท ปริมาตรของ ammonium sulfate อิ่มตัวได้จากตารางปริมาณเกลือ ammonium sulfate อิ่มตัว (มิลลิลิตร) ที่เติมลงไปในการละลายโปรตีน 1 ลิตร จาก Scopes (1988) หลังจากตกตะกอน สารละลายที่มีแลคเคสนำมาปั่นเหวี่ยงและทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย ultra membrane filtration MW cut off 30 KDa

นำสารละลายเอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว และทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย ultramembrane filtration MW cut off 30 KDa มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย DEAE-Sephadex A-50 column

### 2.3.7 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยใช้โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange chromatography)

#### ก. วิธีเตรียม DEAE-Sephadex A-50

ชั่ง DEAE-Sephadex A-50 10 กรัม แช่ในสารละลาย 0.05 โมลาร์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5 ปริมาตร 1 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เจลพองตัวเต็มที่ แล้วนำเจลที่พองตัวไปใส่ภาภาศออกโดยใช้ water bath sonicator

#### ข. วิธีเตรียม DEAE-Sephadex A-50 column

ใช้ คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 เซนติเมตร ยาว 50 เซนติเมตร ปิดปลายล่างที่ต่อกับสายยางด้วย screw clip เติมสารละลาย 0.05 โมลาร์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5 ลงในคอลัมน์ ที่ก้นคอลัมน์มีแผ่นใยปิดเพื่อป้องกันการหลุดของเม็ดเจล คลาย screw clip ให้บัฟเฟอร์ผ่านลงมาโดยตลอด ขณะเดียวกันก็เติม DEAE-Sephadex A-50 gel slurry ลงคอลัมน์ เพื่อให้เม็ดเจลวางตัวในคอลัมน์อย่างสม่ำเสมอ จนได้ความสูงของระดับเจลที่อยู่ในคอลัมน์ 45 เซนติเมตร หรือเท่ากับปริมาตรเจลที่อยู่ในคอลัมน์ (bed volume) 220 มิลลิลิตร ปรับระดับบัฟเฟอร์ให้อยู่เหนือผิวหน้าเจลประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วปิดหน้าเจลด้วยกระดาษกรอง ผ่านบัฟเฟอร์ลงในคอลัมน์อยู่ตลอด เพื่อชะล้างเจลในคอลัมน์ จากนั้นปรับอัตราการไหล

(flow rate) ของสารละลายที่ออกมาเป็น 50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ทั้งไว้ค้างคืนเพื่อให้เม็ดเจลจัดเรียงตัวกันอย่างสม่ำเสมอตลอดคอลัมน์ และเมื่อระดับเจลคงที่ให้ขีดเครื่องหมายไว้ให้เห็นชัดเจน

### ค. วิธีทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดย DEAE-Sephadex A-50 column

ปล่อยให้บัฟเฟอร์ในคอลัมน์ลดระดับลงมาถึงหน้าเจล แล้วจึงนำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นโดยวิธี Ultra-membrane filtration ค่อยๆใส่ลงบนหน้าเจลในคอลัมน์ จนกระทั่งสารละลายเอนไซม์ผ่านผิวหน้าเจลจนหมด แล้วจึงนำสารละลาย 0.05 โมลาร์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5 ปริมาตร 250 มิลลิลิตรเติมลงไปคอลัมน์เพื่อชะล้างสารที่ไม่จับกับเจลออกไป จากนั้นตามด้วย linear gradient ของ 1 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ ในสารละลาย 0.05 โมลาร์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5 ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ซึ่งในขณะที่ผ่านสารละลายเอนไซม์ลงบนผิวหน้าเจลก็เริ่มทำการเก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ หรือแฟรคชันไว้ในหลอดทดลอง ปริมาตรหลอดละ 10 มิลลิลิตร นำเอาสารละลายแต่ละแฟรคชันไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยใช้ 0.05 โมลาร์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5 เป็น blank จนกระทั่งไม่ให้ค่าการดูดกลืนแสง ในขณะเดียวกันก็หาแอกติวิตีของแลคเคส เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรและแอกติวิตีของแลคเคส (U/ml) กับจำนวนแฟรคชัน หรือปริมาตรของสารละลายที่ถูกชะออกมา หลังจากนั้นรวมแฟรคชันที่มีแอกติวิตีของแลคเคสมาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย ultra membrane filtration ทำการวัดปริมาตรทั้งหมด หาปริมาณโปรตีน หาแอกติวิตีแลคเคส และคำนวณหา total protein, total activity, specific activity, purification fold และ % yield

ส่วนเจลที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ หลังจากผ่านการชะด้วย linear gradient ของ 1 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ในสารละลาย 0.05 โมลาร์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5 จนหมดแล้วนั้น ได้ทำการล้างเจลในคอลัมน์สำหรับไว้ใช้ในการทดลองครั้งต่อไป โดยชะล้างสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ยังคงค้างอยู่ในคอลัมน์ด้วย 0.05 โมลาร์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5 ปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นผ่านสารละลาย 0.2% โซเดียมเอไซด์ใน 0.05 โมลาร์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงไปชะล้างเจลในคอลัมน์เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆในคอลัมน์ได้ และก่อนที่จะนำคอลัมน์นี้ไปใช้ในการทดลองครั้งต่อไปต้องชะล้างสารโซเดียมเอไซด์ออกจากคอลัมน์ก่อนด้วยสารละลาย 0.05 โมลาร์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5 ปริมาตร 1 ลิตร

## 2.3.8 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีเจลฟิเลตรชัน (Gel filtration)

### ก. วิธีเตรียมเจล

ชั่ง sephadex G-100 (fine grade) 20 กรัม แช่ใน 0.1 โมลาร์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5 ปริมาตร 350 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำเจลที่พองตัวเต็มที่แล้วมาใส่อ่างสอออกโดยใช้ water bath sonicator

### ข. การเตรียม Sephadex G-100 column

ยัดคอลัมน์ขนาด 1.5 x 90 เซนติเมตร ในแนวตั้ง ปิดปลายล่างที่ต่อกับสายยางด้วย screw clip เติมน้ำบัฟเฟอร์ลงในคอลัมน์มีแผ่นใยปิดกั้นคอลัมน์ เพื่อป้องกันการหลุดร่วของเม็ดเจล จากนั้นคลาย screw clip เพื่อปล่อยน้ำบัฟเฟอร์ให้ไหลผ่านลงมาอย่างอิสระ ในขณะเดียวกันก็เติม sephadex G-100 slurry ลงไปอย่างช้าๆ จนได้ความสูงของเจลในคอลัมน์ประมาณ 85 เซนติเมตร วางกระดาษกรองขนาดเท่ากับเส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์ลงบนผิวหน้าเจล แล้วผ่านน้ำบัฟเฟอร์ลงไปประมาณ 450 มิลลิลิตร เพื่อล้างคอลัมน์

#### ค. วิธีทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดย Sephadex G-100 column

ล้างคอลัมน์ด้วยน้ำบัฟเฟอร์ประมาณ 450 มิลลิลิตร จากนั้นผ่านสารละลายเอนไซม์ลงไปคอลัมน์ แล้วชะตามด้วย 0.1 โมลาร์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5 ด้วยอัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บแฟรคชันละ 10 มิลลิลิตร นำเอาสารละลายแต่ละแฟรคชันไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยใช้ 0.1 โมลาร์ อะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5 เป็น blank จนกระทั่งไม่ให้ค่าการดูดกลืนแสง ในขณะเดียวกันก็หาแอกติวิตีของแลคเคส เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตรและแอกติวิตีของแลคเคส (U/ml) กับจำนวนแฟรคชัน หรือปริมาตรของสารละลายที่ถูกชะออกมา หลังจากนั้นรวมแฟรคชันที่มีแอกติวิตีของแลคเคสมาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย ultra membrane filtration ทำการวัดปริมาตรทั้งหมด หาปริมาณโปรตีน หาแอกติวิตีแลคเคส และคำนวณหา total protein, total activity, specific activity, purification fold และ % yield

### 2.3.9 การแยกและวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วย polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)

#### วิธีเตรียมสาร

##### ก. Acrylamide solution (30% acrylamide, 0.8% Bis)

ประกอบด้วย 30% w/v acrylamide และ 0.8% w/v bis-acrylamide เตรียมโดยชั่ง acrylamide 30 กรัม และ bis-acrylamide 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

##### ข. 20% Sodium dodecyl sulphate (SDS)

ละลาย SDS 100 กรัม ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

##### ค. 4X Stacking gel buffer: 0.5M Tris-HCl buffer pH 6.8, 0.4% SDS

ชั่ง Tris (hydroxymethyl aminomethane) 30.275 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร เติมน้ำ 10 มิลลิลิตรของ 20% SDS ปรับพีเอช เป็น 6.8 ด้วย 6 M HCl และเติม TEMED 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

##### ง. 4X Separating gel buffer: 1.5M Tris-HCl buffer pH 8.8, 0.4% SDS

ชั่ง Tris (hydroxymethyl aminomethane) 90.825 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร เติม 10 มิลลิลิตรของ 20% SDS ปรับพี เอช เป็น 8.8 ด้วย 6 M HCl และปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

จ. 1% Ammonium persulfate

ชั่ง ammonium persulfate 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)

ฉ. 2X sample solubilizing medium

ประกอบด้วย 10 มิลลิลิตร 20% glycerol, 5 มิลลิลิตรของ 10% 2-mercaptoethanol, 10 มิลลิลิตรของ 20% SDS, 12.5 มิลลิลิตรของ 0.5M Tris-HCl pH 6.8 และ 12.5 น้ำกลั่น เติม bromphenol blue 0.001%

ช. 10X Running buffer

ชั่ง Tris (hydroxymethyl aminomethane) 30.0 กรัม และ glycine 144 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับพี เอช เป็น 8.5 ด้วย 1 M NaOH และปรับปริมาตรจนครบ 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ซ. 1X Running buffer

ตวง 10X Running buffer 100 มิลลิลิตร เติม 5 มิลลิลิตร ของ 20% SDS และปรับปริมาตรจนครบ 1000 มิลลิลิตร

ณ. Staining solution

ชั่ง coomassie brilliant blue R250 2 กรัม ละลายในเมทานอล 500 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติกเข้มข้น 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร กรองและบรรจุภาชนะให้มิดชิด เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ด. Destaining solution

เมทานอล 50 มิลลิลิตร ผสมกับกรดอะซิติกเข้มข้น 70 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

ก. Fixation solution

ละลาย TCA 60 กรัมในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร

วิธีเตรียมเจล

ก. Separating gel (10% acryl amide) ในปริมาตร 20 มิลลิลิตรประกอบด้วย

-acrylamide solution 6.7 ml

-4X separating gel buffer 5.0 ml

-distillated water 7.8 ml

-1% ammonium persulfate 0.5 ml

ก่อน load เติม TEMED 15 ไมโครลิตร

ข. Stacking gel (4% acryl amide) ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| -acrylamide solution    | 1.3 ml  |
| -4X stacking gel buffer | 2.5 ml  |
| -distillated water      | 5.95 ml |
| -1% ammonium persulfate | 0.25 ml |

ก่อน load เติม TEMED 5 ไมโครลิตร

### วิธีทดลอง

1. เช็ดชุดเครื่อง electrophoresis ด้วย ethanol แล้วประกอบชุดเครื่องมือ
2. ปิเปตสารละลายวัน ลงเป็นทางยาวตามขอบล่างของแผ่นกระจกที่ติดกับ chamber ล่าง ปล่อยให้วันแข็งตัวประมาณ 5 นาที
3. ผสมสารละลายของ separating gel ตามข้อ ก. เทลงในชุดเครื่องมือตรงช่องว่างระหว่างกระจกด้าน chamber บนจนมีความสูงจากขอบล่างประมาณ 10 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นลงไปบนหน้าเจลเพื่อให้หน้าเจลเรียบ ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาโพลีเมอไรเซชันประมาณ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จนได้เจลที่แข็งตัวสมบูรณ์ แล้วจึงเทน้ำออกจากหน้าเจล และใช้กระดาษทิชชูซับน้ำออกให้หมด
4. ผสมสารละลายของ stacking gel ตามข้อ ข แล้วใช้ปิเปตดูดไปใส่ในช่องว่างระหว่างกระจกต่อจากส่วน separating gel และเสียบแผ่นหีตามทันที เพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับหยุดสารตัวอย่าง ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที
5. เติม electrophoresis buffer ลงใน chamber บนและล่างให้เต็ม และค่อยๆดึงแผ่นหีออก
6. เติมสารละลายเอนไซม์เข้มข้น และ/หรือ สารละลายโปรตีนมาตรฐานลงไปในแต่ละช่องๆละ 10 ไมโครลิตร ต่อหัวไฟฟ้าลบและบวกจาก power supply เข้ากับหัวไฟฟ้าของ chamber บนและล่าง ผ่านกระแสไฟฟ้าจากขั้วลบไปยังขั้วบวกโดยใช้กระแสไฟฟ้า 110 โวลท์ จนกระทั่งเห็นแถบสีน้ำเงินของ bromophenol blue เคลื่อนที่ลงไปจนถึงปลายด้านล่างของ separating gel ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง หยุดผ่านกระแสไฟฟ้า และถอดชุดเครื่องมือและแผ่นเจลออก ล้างด้วยน้ำกลั่นและแช่ลงในสารละลาย 30% w/v trichloroacetic acid (TCA) เป็นเวลา 30 นาที เพื่อที่จะทำให้โปรตีนยึดติดกับแผ่นเจล จากนั้นย้อมสีด้วย staining solution ประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วล้างสีย้อมด้วย destaining solution โดยเปลี่ยนวันละ 2 ครั้ง จนมองเห็นแผ่นเจลใส วัดระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่เทียบกับความยาวเจลที่ bromophenol blue เคลื่อนที่ไปได้ คำนวณค่า Relative mobility (Rm)

### 2.3.10 การศึกษาลักษณะเฉพาะของแลคเคสที่แยกบริสุทธิ์

นำสารละลายแลคเคสที่แยกได้จากการทำโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ และเจลฟิลเตรชัน มาทำการศึกษาลักษณะเฉพาะต่างๆ ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง ได้แก่

- การศึกษาผลกระทบของพี เอชและอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยา
- การศึกษาความเสถียรต่อพีเอช และอุณหภูมิ
- ผลกระทบของไออนโลหะที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์
- ผลกระทบของตัวยับยั้งต่อแอกติวิตีเอนไซม์
- การศึกษาความจำเพาะของสับสเตรท
- การศึกษาความเข้มข้นของสับสเตรทต่อการเร่งปฏิกิริยา
- การศึกษาปริมาณเอนไซม์ในการฟอกจางสีสังเคราะห์
- การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการฟอกจางสีสังเคราะห์
- การศึกษาความเข้มข้นของสีสังเคราะห์ต่อความสามารถในการฟอกจางสี

สังเคราะห์

### 2.3.11 การศึกษาคุณลักษณะทางโมเลกุลของจีนที่ผลิตแลคเคส

การสกัดแยกอาร์เอ็นเอจากเห็ดหอม

-นำเส้นใยของเห็ดหอมที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมันฝรั่งเด็กซ์โทรสที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ไปแยกสกัดอาร์เอ็นเอ โดยใช้ชุดแยกสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบคุณภาพ ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose ที่มี ethidium bromide 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1X TAE (Tris acetate EDTA) แล้วนำไปตรวจสอบพร้อมบันทึกภาพด้วยเครื่อง gel document

การเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของยีนควบคุมการสังเคราะห์แลคเคสในเห็ดหอม

ออกแบบไพรเมอร์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนควบคุมการสังเคราะห์แลคเคสในเห็ดหอมและเห็ดชนิดอื่นๆ ที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) หลังจากนั้นใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) บริเวณ 5' และ 3' ของยีนดังกล่าวมาทำการออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์จำเพาะเพื่อใช้ในการขั้นตอนของการเพิ่มขยายชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค RT-PCR ด้วยการใช้อาร์เอ็นเอที่สกัดได้เป็นอาร์เอ็นเอแม่แบบ (RNA template) ในการทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RT-PCR ร่วมกับไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ดังกล่าว โดยใช้ชุด RT-PCR สำเร็จรูป RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)

ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยา (reaction mixture) ในปริมาตรรวมประกอบด้วย อาร์เอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครกรัม, 10X Reaction Buffer with  $MgCl_2$  5 ไมโครลิตร, dNTPs (dATP/dGTP/dCTP/dTTP) ชนิดละ 0.2 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ที่ใช้ชนิดละ 0.5 ไมโครโมลาร์

RevertAid™ Reverse Transcriptase 0.5 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวมเป็น 50 ไมโครลิตร นำส่วนผสมที่ได้ไปทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิและระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา RT-PCR ดังนี้

ขั้นตอนการทำ Reverse Transcription ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นตอน initial PCR activation step ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จำนวนรอบของการทำปฏิกิริยาคือ 35 รอบ

ขั้นตอนสุดท้าย elongation step ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose ที่มี ethidium bromide 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1X TAE (Tris acetate EDTA) ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำไปตรวจสอบพร้อมบันทึกภาพด้วยเครื่อง gel document จากนั้นทำการแยกสกัดและทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์เตรียม 1% agarose ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1X TAE ที่ไม่มี ethidium bromide จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปทำการแยกขนาดด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis เพื่อแยกแถบดีเอ็นเอ นำเจลที่ได้ไปย้อมด้วยสารละลายที่มี ethidium bromide 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นตัดชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการ ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต แล้วนำไปแยกสกัดชิ้นดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสกัดแยกดีเอ็นเอสำเร็จรูป

### **การโคลนชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli***

#### **1. การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายกับดีเอ็นเอพาหะ**

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปเชื่อมต่อเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ โดยใช้อัตราส่วนระหว่างดีเอ็นเอพาหะกับชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย 1 ต่อ 3 โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ T4 DNA ligase ป่มสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ปริมาตรของสารละลายในการทำปฏิกิริยาใช้ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตชุดสำเร็จรูป

#### **2. การเตรียมเซลล์เจ้าบ้านสำหรับใช้ในการส่งถ่ายยีน**

เพาะเลี้ยงเซลล์ *E. coli* โดยใช้โคโลนีเดี่ยวจากจานอาหารวุ้น LB นำมาเลี้ยงในอาหาร TransformAid™ C-Medium ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปป่มในตู้ป่มแบบควบคุมอุณหภูมิ เขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นป่มสารละลายเซลล์ในปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร C-Medium ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปป่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำเซลล์ที่ได้ไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

### 3. การนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

เตรียม TransformAid™ T-solution โดยเปิด T-solution (A) และ T-solution (B) ในปริมาณที่เท่ากัน (โดยนำสารละลายแต่ละชนิดปริมาตร 500 ไมโครลิตร สำหรับการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน 2 ครั้ง) จากนั้นนำ TransformAid™ T-solution ไปแช่ในอ่างน้ำแข็งและเปิดเซลล์แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ลงในหลอดเซนติฟิวจ์ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง และละลายตะกอนเซลล์ใน TransformAid™ T-solution ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่มต่อในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำเซลล์มาปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วย TransformAid™ T-solution 120 ไมโครลิตร และนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เตรียมดีเอ็นเอสำหรับการนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (นำเอาสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เชื่อมต่อเรียบร้อยแล้วมา 1-5 ไมโครลิตร) เปิดสารละลายดีเอ็นเอใส่ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ และนำไปบ่มต่อในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที เติมน้ำที่ละลายตะกอนไว้แล้วในหลอดที่มีดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร และนำไปกระจายลงบนอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเกิดโคโลนีของแบคทีเรียในอาหารเพาะเลี้ยง

### 4. การเลือกเฟ้นเซลล์เจ้าบ้านที่มียีนที่ต้องการ

โดยใช้ลักษณะทางฟีโนไทป์ของเซลล์เจ้าบ้านที่เปลี่ยนไปภายหลังจากได้รับพลาสมิดลูกผสม ในที่นี้ใช้พลาสมิด pGEM®-T Easy vector เป็นดีเอ็นเอพาหะ ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในจานอาหารวุ้น LB agar ที่มียาแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม มี X-gal ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (จากความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม) และ IPTG ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (จาก 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม) บนผิวหน้าอาหารวุ้น นำไปบ่ม 16 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาวไปเพาะเลี้ยงและแยกสกัด พลาสมิดดีเอ็นเอในระดับขยายขนาดเพื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

### 5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากพลาสมิดของโคลนที่คัดเลือกได้

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี dideoxy chain termination โดยทำการส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ ณ ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยใช้เครื่อง MegaBACE 1000 automated DNA sequence (Pharmacia Biotech, USA) จากนั้นนำผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้ไปทำการเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *lac* ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ในฐานข้อมูล NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) ทั้งนี้เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของยีนที่วิเคราะห์ได้ ก่อนที่จะนำชิ้นยีนนี้ไปใช้เป็นดีเอ็นเอตรวจติดตามการสังเคราะห์ยีนแลคเคสในสิ่งมีชีวิตอื่นๆต่อไป

## บทที่ 3

### ผลการทดลอง

#### 3.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (inoculum)

สายพันธุ์เห็ดหอมที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด 7 สายพันธุ์ (KMU2 และ KMU4 ได้จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; KMU11 ได้จากกรมวิชาการเกษตร; KMUH1-KMUH2-KMUH3-KMUH4 เห็ดหอมลูกผสมทนร้อนจากวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาเอก ดร.ปิยนันท์ ชมนาวัง) เตรียมเชื้อตั้งต้น โดยนำเส้นใยเห็ดหอมจากเชื้อที่เก็บรักษาไว้โดยการทำให้เป็น stock culture ด้วยการนำเส้นใยมาเลี้ยงบนอาหารแข็งมันฝรั่งเด็กซ์โทรสในจานเลี้ยงเชื้อบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงนาน ประมาณ 2 สัปดาห์ จากนั้นใช้ที่เจาะจุกคอร์ก (cork borer) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะวงบริเวณที่มีเส้นใยปกคลุมห่างจากขอบจานเพาะเลี้ยงประมาณ 1 เซนติเมตร นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งมันฝรั่งเด็กซ์โทรส บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการต่อเชื้อ (subculture) 3 ครั้ง เพื่อให้ได้เส้นใยที่มีความคงตัวและสามารถนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

ผลการทดลองพบว่าเห็ดหอมทุกสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้เต็มจานเพาะเชื้อในระยะเวลา 1 เดือนไม่แตกต่างกันมากนัก นอกจากนี้ในระยะแรกของการทำวิจัยเกิดปัญหาและอุปสรรคคือ เห็ดหอมสายพันธุ์ลูกผสมทนร้อนที่ใช้ในงานวิจัยถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเป็นระยะเวลานาน 3 ปี เมื่อนำมาใช้ในการทดลองต้องผ่านการต่อเชื้อหลายครั้งเพื่อเพิ่มความคงตัวของเส้นใยที่จะใช้ในการทดลอง

#### 3.2 การศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดหอม

##### 3.2.1 รูปแบบการเจริญบนอาหารแข็งมันฝรั่งเด็กซ์โทรส (PDA)

ทำการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติบางประการของเห็ดหอมสายพันธุ์ทนร้อน 4 สายพันธุ์ กับสายพันธุ์พ่อแม่ โดยศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบการเจริญในอาหารแข็งมันฝรั่งเด็กซ์โทรสที่ 25, 30 และ 32 องศาเซลเซียส ในช่วงอายุ 5-30 วัน เพื่อให้ทราบถึงการเจริญในแต่ละช่วงอายุ ทำการศึกษาโดยการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเส้นใยเห็ดหอมทั้งสายพันธุ์ทนร้อนและสายพันธุ์พ่อแม่

ผลการทดลองพบว่าเส้นใยเห็ดหอมทุกสายพันธุ์มีรูปแบบการเจริญแบบทวีคูณ (logarithmic growth) โดยมีช่วง log phase อยู่ในช่วงอายุ 10-20 วัน และจะเริ่มเข้าสู่ stationary phase ที่อายุ 25-30 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าสายพันธุ์พ่อแม่ เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงขึ้นมีค่าการเจริญลดลงค่อนข้างมากเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ลูกผสมที่แม้มีค่าการเจริญลดลงแต่ก็ลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้นทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งทั้ง 4 สายพันธุ์ของเห็ดหอมลูกผสมมีค่าการเจริญสูงและ

ใกล้เคียงกัน และเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยงเร็ว ในขณะที่สายพันธุ์พ่อ-แม่มีค่าการเจริญต่ำกว่า (รูปที่ 1, 2 และ 3)

### 3.2.2 รูปแบบการเจริญบนอาหารเหลวมันฝรั่งเด็กซ์โทรส (PDB)

ทำการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติบางประการของเห็ดหอมสายพันธุ์ทร้อน 4 สายพันธุ์ กับสายพันธุ์พ่อ-แม่ โดยศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบการเจริญของเส้นใยเห็ดหอมเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวมันฝรั่งเด็กซ์โทรสที่สภาวะนิ่ง ในช่วงอายุ 10-60 วัน ที่ 25, 30 และ 32 องศาเซลเซียส เพื่อให้ทราบถึงการเจริญในแต่ละช่วงอายุ ทำการศึกษาโดยการชั่งน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดหอม ทั้งสายพันธุ์ทร้อนและสายพันธุ์พ่อ-แม่

ผลการทดลองพบว่าเส้นใยเห็ดหอมทุกสายพันธุ์มีรูปแบบการเจริญแบบทวิคูณ (logarithmic growth) โดยมีช่วง log phase อยู่ในช่วงอายุ 20-40 วัน และจะเริ่มเข้าสู่ stationary phase ที่อายุ 40-60 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าสายพันธุ์พ่อ-แม่ เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงขึ้นมีค่าการเจริญลดลงค่อนข้างมากเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ลูกผสมที่แม่มีค่าการเจริญลดลงแต่ก็ลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้นทั้ง 4 สายพันธุ์ และพบว่าสายพันธุ์เห็ดหอมทร้อนทั้ง 4 สายพันธุ์ให้ค่าการเจริญสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ทุกอุณหภูมิที่ทำการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4, 5 และ 6)

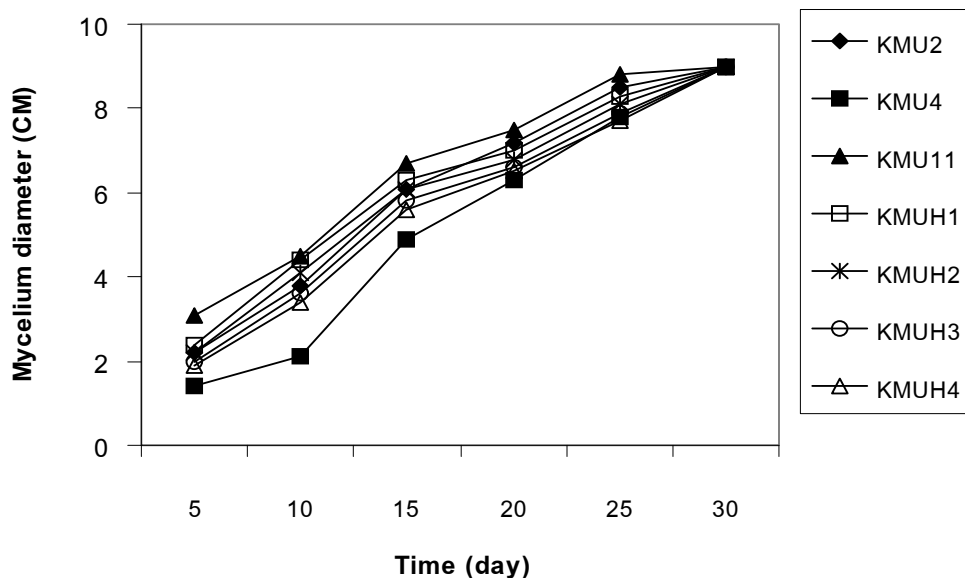
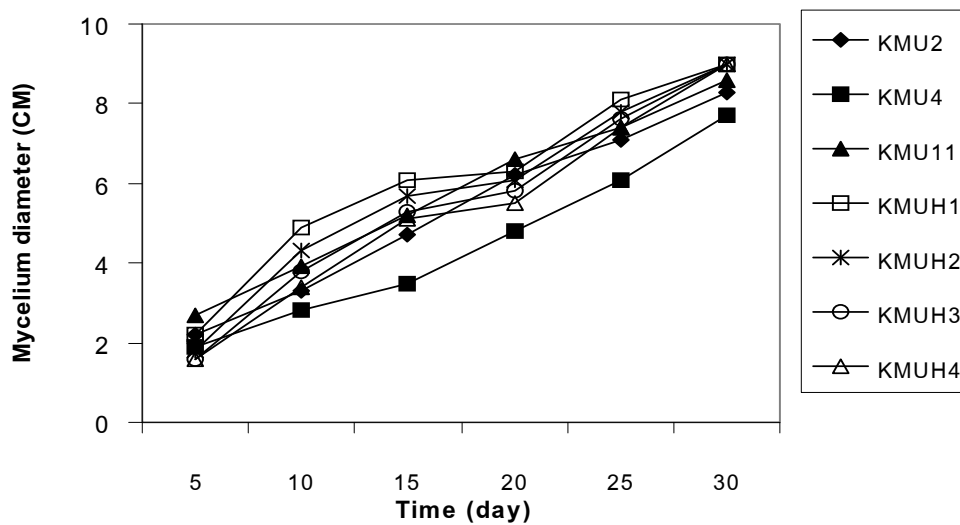
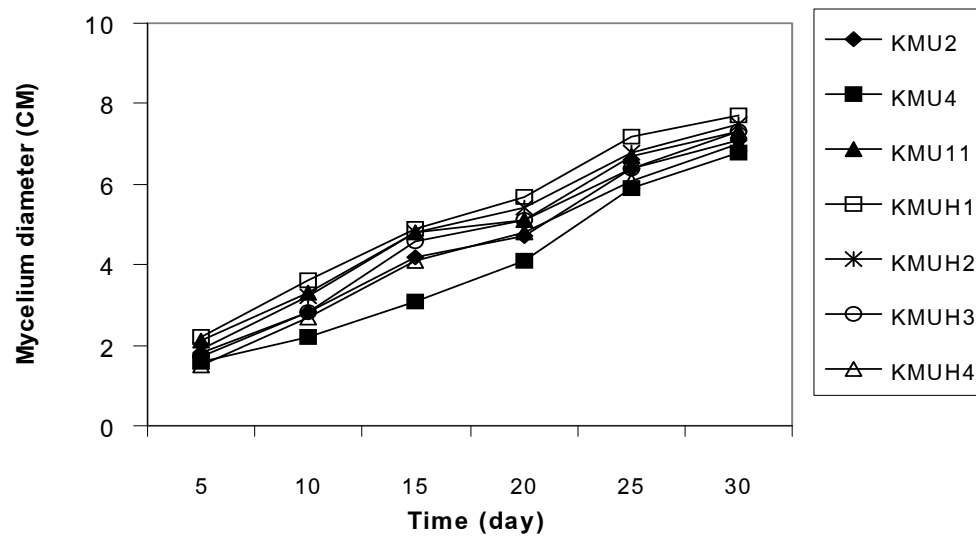


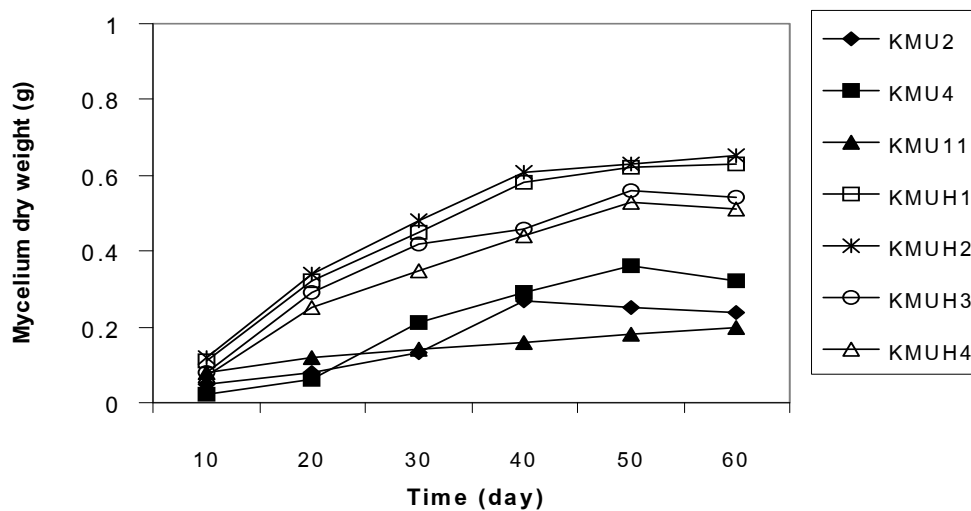
Fig 1. Typical pattern of growth curve demonstration of *Lentinula edodes* mycelium long during growth in potato dextrose agar (PDA) medium at 25C



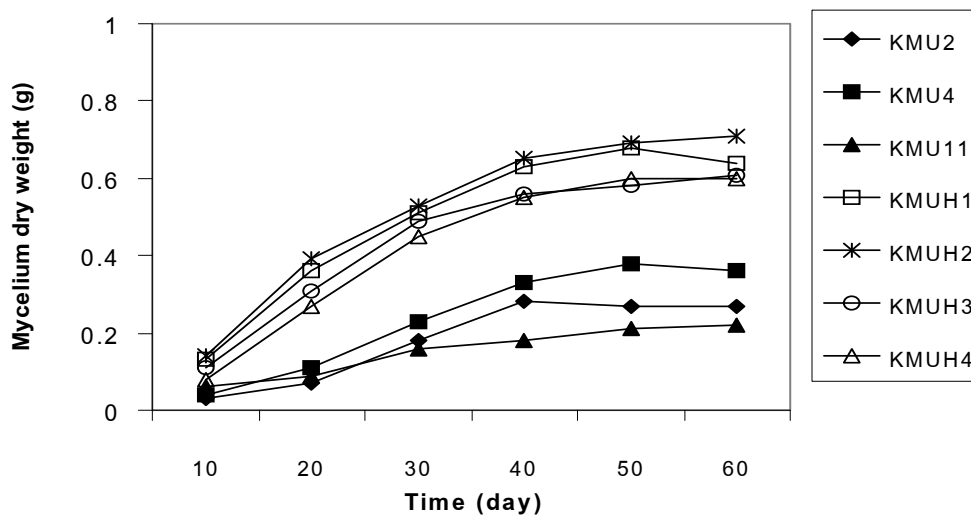
**Fig 2. Typical pattern of growth curve demonstration of *Lentinula edodes* mycelium long during growth in potato dextrose agar (PDA) medium at 30C**



**Fig 3. Typical pattern of growth curve demonstration of *Lentinula edodes* mycelium long during growth in potato dextrose agar (PDA) medium at 32C**



**Fig 4. Typical pattern of growth curve demonstration of *Lentinula edodes* mycelium dry weight during growth in potato dextrose (PDB) medium at 25C**



**Fig 5. Typical pattern of growth curve demonstration of *Lentinula edodes* mycelium dry weight during growth in potato dextrose (PDB) medium at 30C**

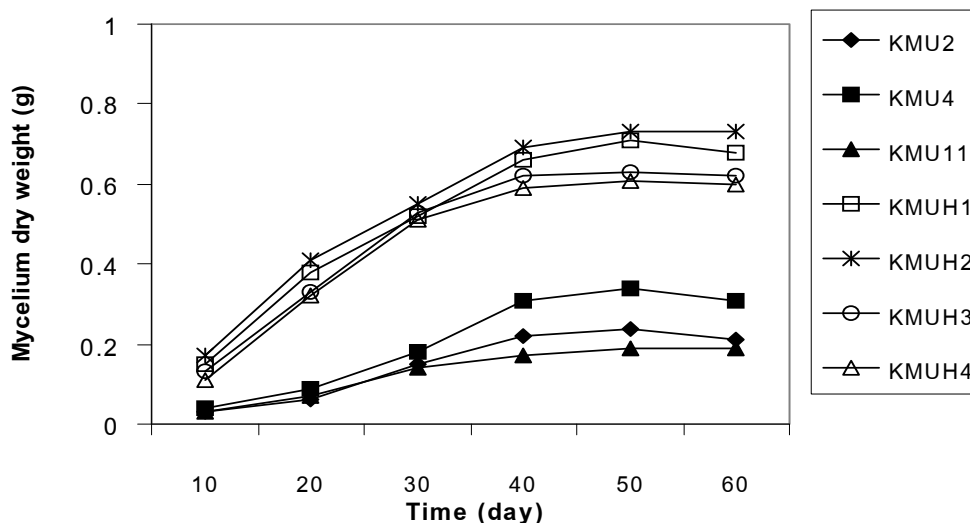


Fig 6. Typical pattern of growth curve demonstration of *Lentinula edodes* mycelium dry weight during growth in potato dextrose (PDB) medium at 32C

### 3.3 การศึกษารูปแบบการผลิตเอนไซม์ของเส้นใยเห็ดหอม

#### 3.3.1 รูปแบบผลิตเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส

ทำการศึกษเปรียบเทียบคุณสมบัติบางประการของเห็ดหอมสายพันธุ์หนร้อน 4 สายพันธุ์ กับสายพันธุ์พ่อ-แม่ โดยศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบการผลิตเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสของเส้นใยเห็ดหอมเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวมันฝรั่งเด็กซ์โทรสที่สภาวะนิ่งในช่วงอายุ 10-60 วัน ที่ 25, 30 และ 32 องศาเซลเซียส เพื่อให้ทราบถึงรูปแบบการผลิตเอนไซม์ในแต่ละช่วงอายุ ทำการศึกษาโดยการวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์ แลคเคส และแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ทั้งสายพันธุ์หนร้อนและสายพันธุ์พ่อ-แม่

ผลการทดลองที่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 7-12 พบว่าเส้นใยเห็ดหอมทุกสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้ในระหว่างการเจริญของเส้นใย และพบว่า เอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ของเห็ดหอมสายพันธุ์ลูกผสมมีค่าแอกติวิตีของเอนไซม์สูงสุดสูงกว่าสายพันธุ์พ่อ-แม่ทุกอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง โดยพบว่าสายพันธุ์ KMUH1 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตแลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้สูงทุกอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง

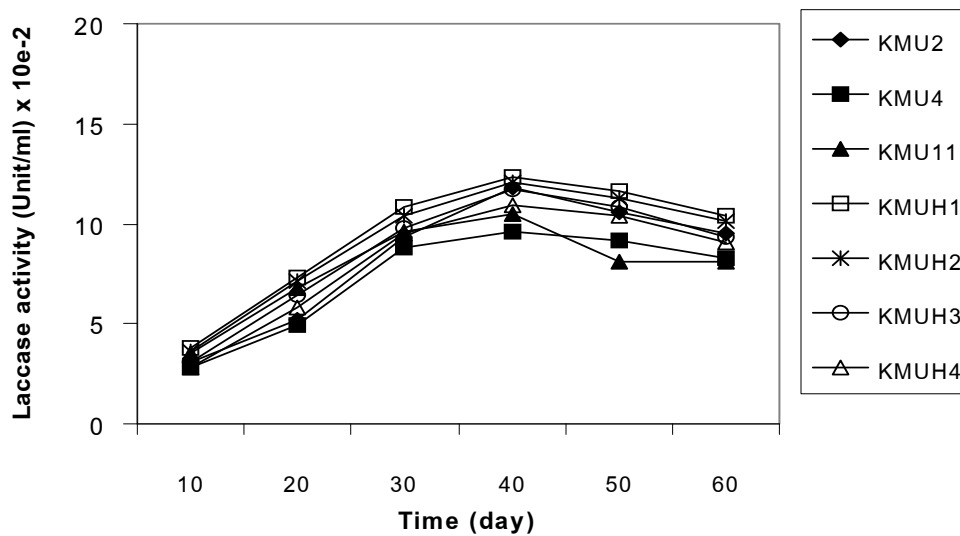


Fig 7. Typical pattern of laccase of *Lentinula edodes* during growth in potato dextrose (PDB) medium at 25C

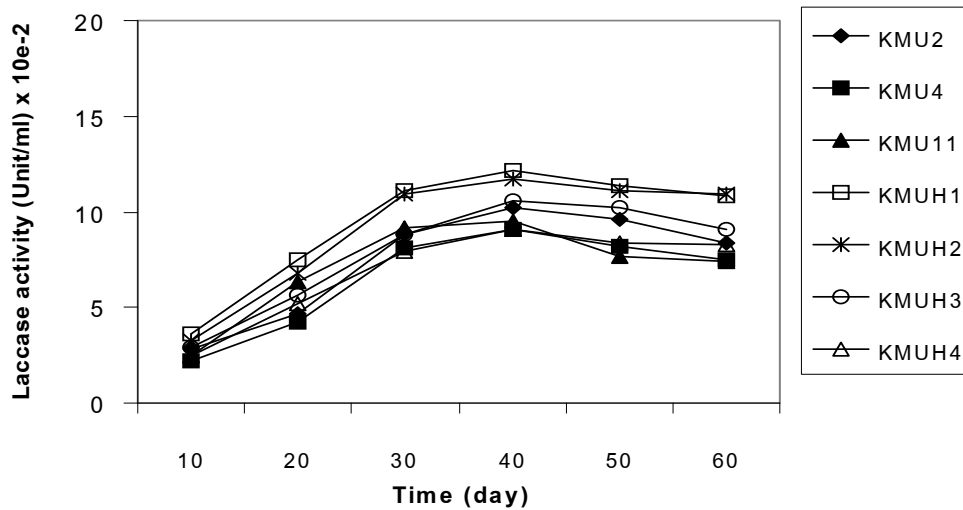


Fig 8. Typical pattern of laccase of *Lentinula edodes* during growth in potato dextrose (PDB) medium at 30C

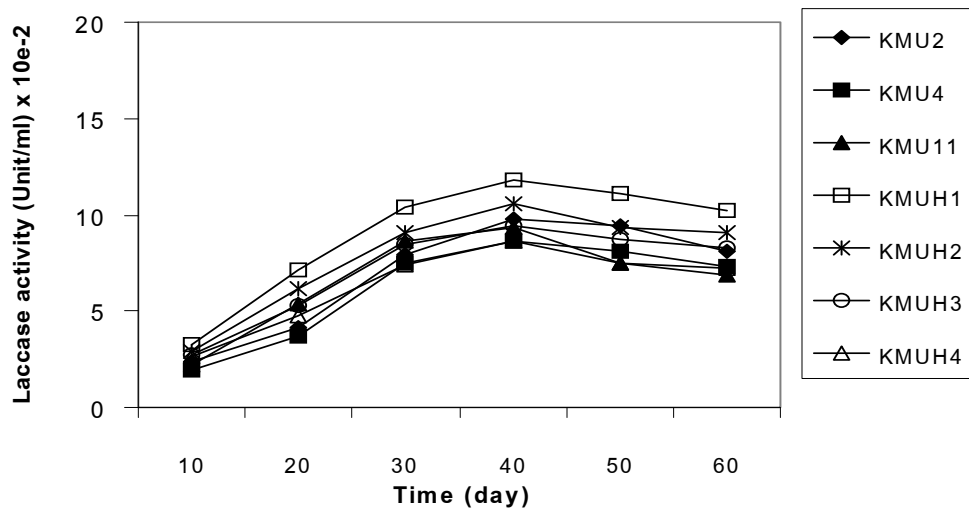


Fig 9. Typical pattern of laccase of *Lentinula edodes* during growth in potato dextrose (PDB) medium at 32C

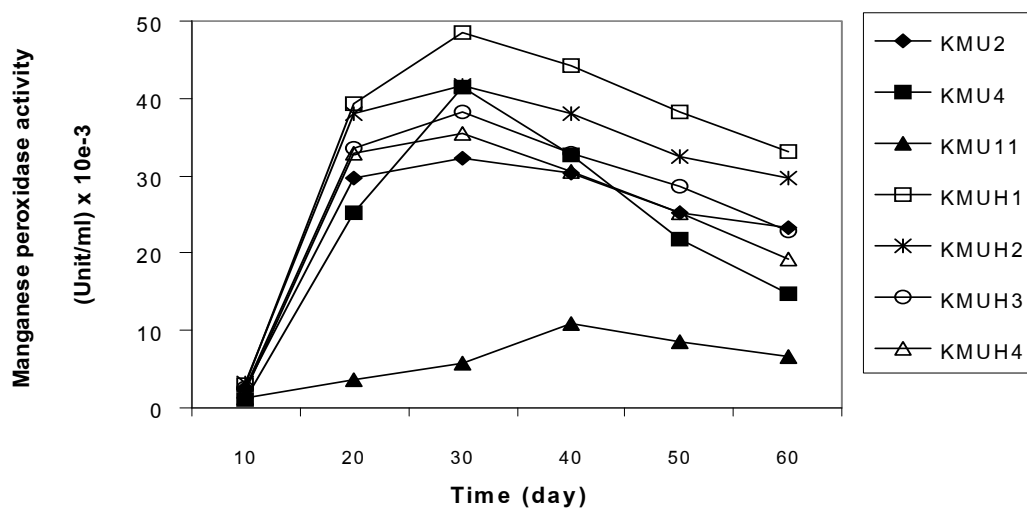
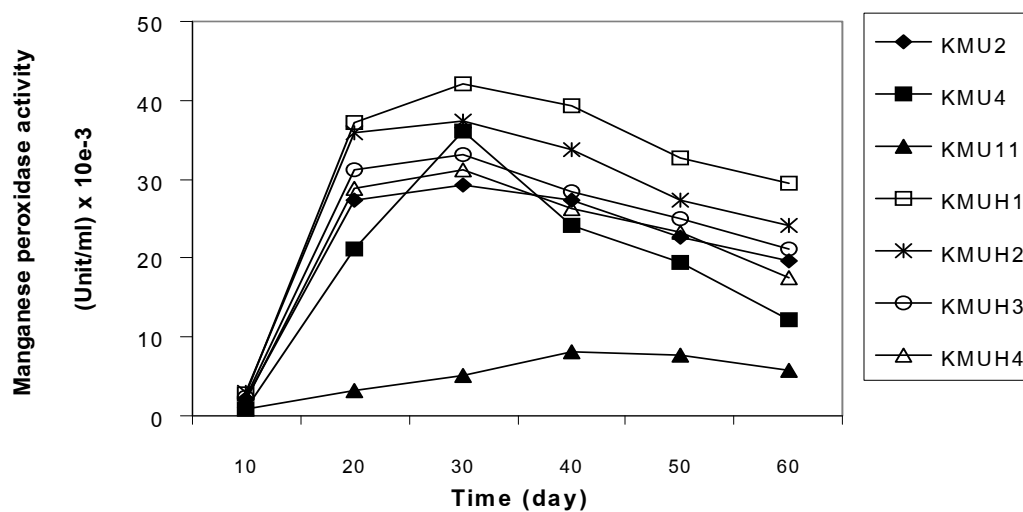
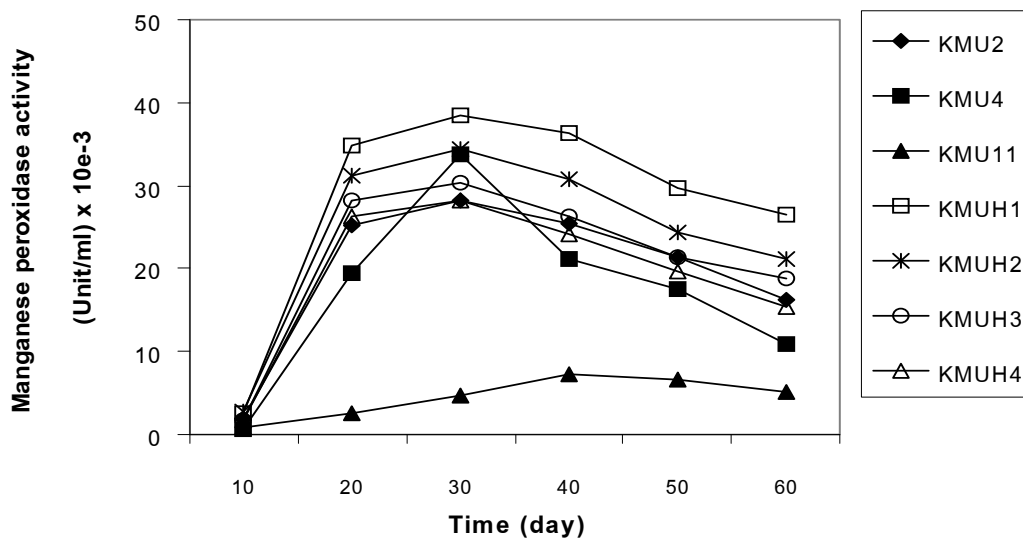


Fig 10. Typical pattern of manganese peroxidase of *Lentinula edodes* during growth in potato dextrose (PDB) medium at 25C



**Fig 11. Typical pattern of manganese peroxidase of *Lentinula edodes* during growth in potato dextrose (PDB) medium at 30C**



**Fig 12. Typical pattern of manganese peroxidase of *Lentinula edodes* during growth in potato dextrose (PDB) medium at 32C**

### 3.4. การเตรียมแหล่งของเอนไซม์ของเส้นใยเห็ดหอม

วิธีการเตรียมแหล่งของเอนไซม์เพื่อใช้ในการทำให้เอนไซม์แลคเคสจากเห็ดหอมสายพันธุ์ลูกผสมบริสุทธิ์ โดยนำเส้นใยที่ผ่านการต่อเชื้อ 3 ครั้งซึ่งต่อไปได้เก็บรักษาไว้เป็นหัวเชื้อตั้งต้น (inoculum) จากนั้นใช้ที่เจาะจุกคอร์ก (cork borer) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะวงบริเวณที่มีเส้นใยปกคลุมห่างจากขอบจานเพาะเลี้ยงประมาณ 1 เซนติเมตร นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเหลวมันฝรั่งเด็กซ์โทรส บ่มที่สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แลคเคส หลังจากเก็บเส้นใยที่เลี้ยงบนอาหารเหลวแล้วสารละลายที่เหลือนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์เพื่อเป็นการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่ 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นสารละลายส่วนใส (crude culture supernatant) ที่ได้เก็บไว้เพื่อนำไปสู่การทดลองการพัฒนาขั้นตอนวิธีการการแยกและการทำให้เอนไซม์แลคเคสจากเห็ดหอมลูกผสมที่คัดเลือกได้บริสุทธิ์

ผลการทดลองการเตรียมแหล่งของเอนไซม์แลคเคสโดยคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ค่าการผลิตเอนไซม์แลคเคสสูง ซึ่งจากการทดลองพบว่าสายพันธุ์ KMUH1 เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการนำมาผลิตเอนไซม์แลคเคสเนื่องจากสามารถผลิตแลคเคสได้สูงทุกอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง

### 3.5. การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อแอกติวิตีของเอนไซม์แลคเคส

#### 3.5.1 การศึกษาผลกระทบของพีเอชต่อการเร่งปฏิกิริยา

ศึกษาผลกระทบของพีเอชต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แลคเคสที่ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ของ *Lentinula edodes* KMUH1 โดยใช้เอนไซม์บ่มกับสับสเตรท ABTS ที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการแปรผันพีเอช ของปฏิกิริยาด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชในช่วง 2-11 โดยใช้สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (พีเอช 2 ถึง 6) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (พีเอช 7 ถึง 11) ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 10 นาที

ผลการทดลอง (รูปที่ 13) พบว่าเมื่อใช้ช่วงพีเอชของปฏิกิริยาระหว่าง 3-6 แลคเคสจะมีอัตราการเร่งปฏิกิริยาสูงสุด (พีเอชที่เหมาะสม) ที่ช่วงพีเอชประมาณ 3-5 หลังจากนั้นความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาจะลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อพีเอชสูงกว่า 7 พบว่าเอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้

#### 3.5.2 การศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยา

ทำการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยาของแลคเคส ที่ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ของ *Lentinula edodes* KMUH1 โดยใช้เอนไซม์บ่มกับสับสเตรท ABTS ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิ 20-80 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 10 นาที

ผลการทดลอง (รูปที่ 14) พบว่าเมื่อติดตามปฏิกิริยาในช่วงของอุณหภูมิระหว่าง 20-80 องศาเซลเซียส แลคเคส มีอัตราการเร่งปฏิกิริยาสูงสุด (อุณหภูมิที่เหมาะสม) ที่อุณหภูมิประมาณ 30-60 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นอัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว และพบว่าที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เกือบไม่พบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เลย

### 3.6. การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อความเสถียรของเอนไซม์แลคเคส

#### 3.6.1 ผลการศึกษาความเสถียรต่อพีเอชของแลคเคส

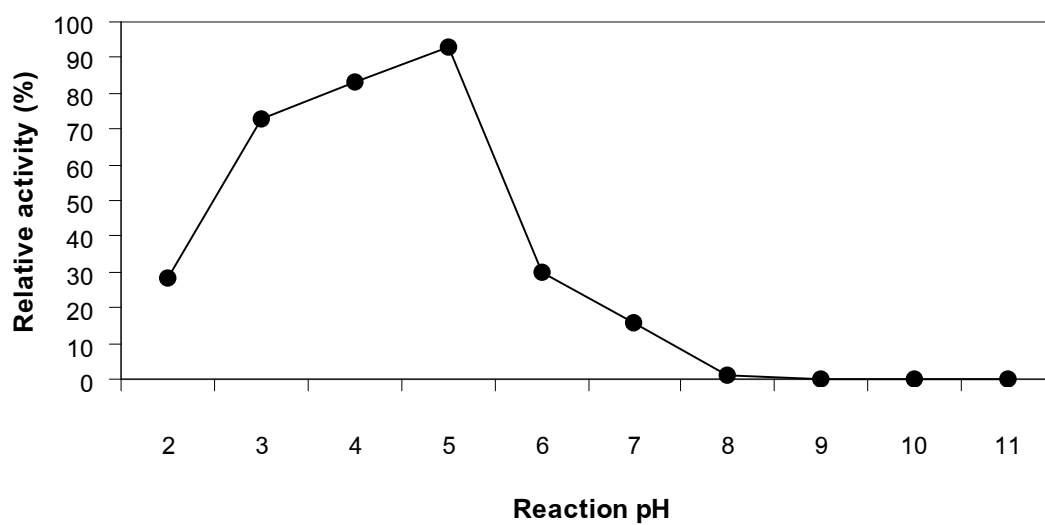
ศึกษาความเสถียรของแลคเคสที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ของ *Lentinula edodes* KMH1 โดยทำการบ่มเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชในช่วง 2-11 โดยใช้สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (พีเอช 2 ถึง 6) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (พีเอช 7 ถึง 11) ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 16 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวัดแอกติวิตีของแลคเคสโดยใช้ ABTS เป็นสับสเตรท

ผลการทดลอง (รูปที่ 15) พบว่าความเสถียรของแลคเคสสูงสุดที่พีเอช ระหว่าง 3-6 ส่วนพีเอชในช่วงค่าสูงกว่านี้เอนไซม์จะเสถียรภาพไปอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามในช่วงพีเอชที่ต่ำกว่า 3 แลคเคสจะเริ่มเสถียรภาพไปได้ช้ากว่า

#### 3.6.2 ผลการศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิของแลคเคส

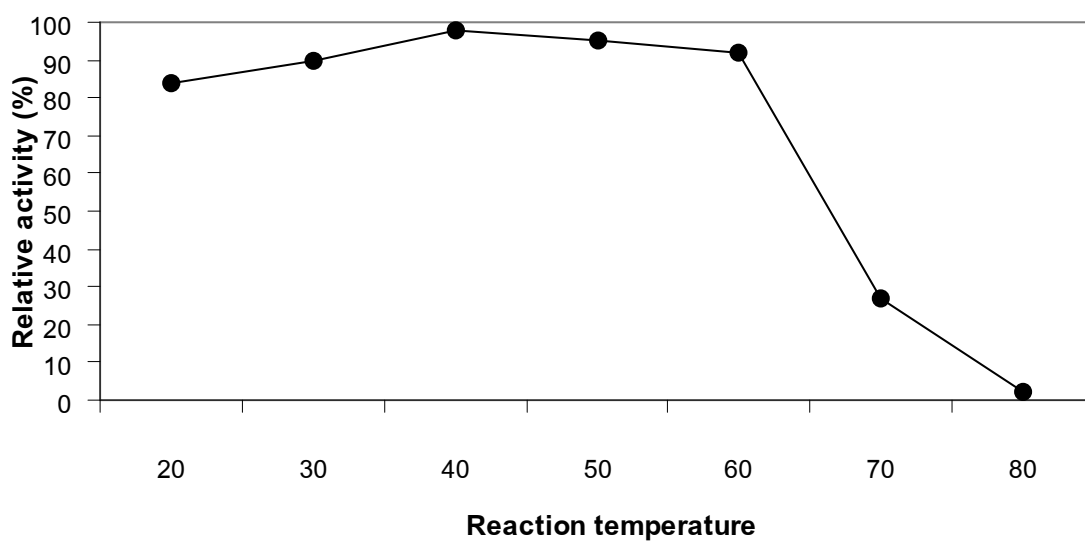
บ่มแลคเคสที่ปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ของ *Lentinula edodes* KMH1 ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 เป็นเวลานาน 60 นาที ที่อุณหภูมิ 20-80 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 10 นาทีมาวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ โดยใช้สับสเตรท ABTS

ผลการทดลอง (รูปที่ 16) พบว่าเอนไซม์แลคเคสมีความเสถียรสูงในช่วงอุณหภูมิ 20-40 โดยที่อุณหภูมิระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส แลคเคส ไม่มีการสูญเสียแอกติวิตีของเอนไซม์เลยเมื่อเก็บไว้ที่สภาวะดังกล่าวนาน 60 นาที

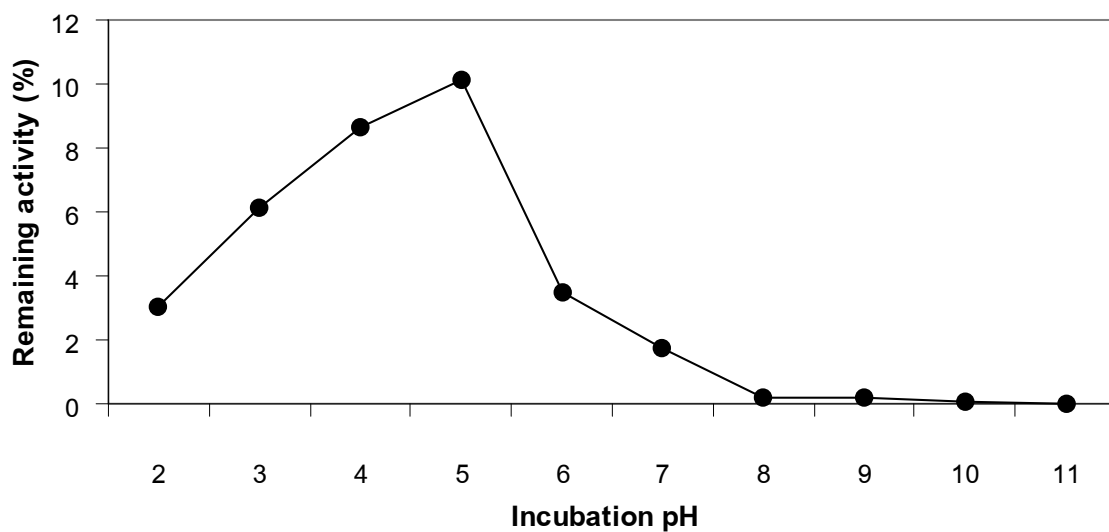


**Fig 13. Effects of pH on enzyme activity of *Lentinula edodes*.**

**The enzyme reaction was performed at 37C for 10 min.**

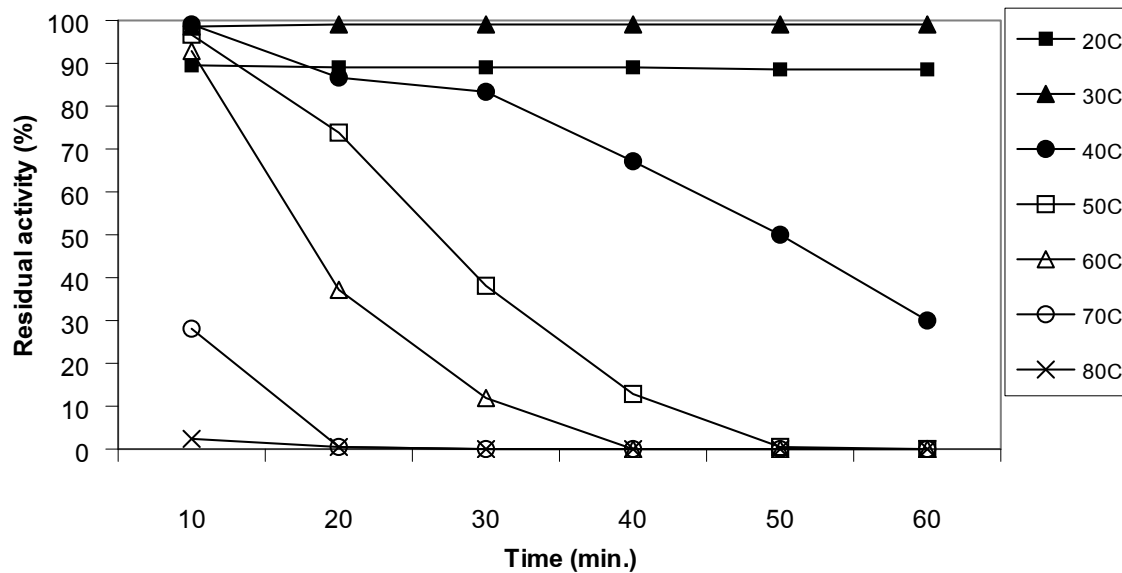


**Fig 14. Effects of temperature on enzyme activity. The enzyme reaction was performed in 0.1M acetate buffer pH 5.0 for 10 min.**



**Fig 15. Effects of pH on enzyme stability of *Lentinula edodes*.**

The enzyme activity was measured after incubating at various pH at 37°C for 16 hrs.



**Fig 16. Effects of temperature on enzyme stability. Activity remaining was measured after incubating in 0.1M acetate buffer pH 5 at various temperature for 60 min.**

### 3.7 การศึกษาการยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แลคเคส

#### 3.7.1 ผลกระทบของไอออนโลหะต่อแอคติวิตีของแลคเคส

ศึกษาผลกระทบของไอออนโลหะต่อแอคติวิตีของแลคเคสที่ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ของ *Lentinula edodes* KMUH1 โดยใช้ ABTS เป็นสับสเตรท ทำการบ่มเอนไซม์ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5 ที่มีโลหะความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

ผลการทดลอง (ตารางที่ 1) พบว่า สารประกอบอนินทรีย์ของโลหะ  $\text{HgCl}_2$  สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของแลคเคส 60% ส่วนสารอื่นๆมีการยับยั้งเล็กน้อย นอกจากนี้บางชนิดสามารถกระตุ้นแอคติวิตีของเอนไซม์ได้

**Table 1** Effects of metal ions on laccase activity

| Metal ion salt  | Concentration (mM) | Relative activity (%) |
|-----------------|--------------------|-----------------------|
| None            | -                  | 100                   |
| $\text{BaCl}_2$ | 1                  | 102                   |
| $\text{CaCl}_2$ | 1                  | 91                    |
| $\text{CoCl}_2$ | 1                  | 95                    |
| $\text{HgCl}_2$ | 1                  | 40                    |
| KCl             | 1                  | 101                   |
| $\text{MnCl}_2$ | 1                  | 94                    |
| NaCl            | 1                  | 96                    |
| $\text{SrCl}_2$ | 1                  | 100                   |
| $\text{ZnCl}_2$ | 1                  | 99                    |
| $\text{CuCl}_2$ | 1                  | 175                   |

#### 3.7.2 ผลกระทบของตัวยับยั้งต่อแอคติวิตีของแลคเคส

ศึกษาผลกระทบของตัวยับยั้งต่อแอคติวิตีของแลคเคสที่ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ของ *Lentinula edodes* KMUH1 โดยใช้ ABTS เป็นสับสเตรท ทำการบ่มเอนไซม์ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5 ที่มีตัวยับยั้งที่ความเข้มข้นต่างๆ

ผลการทดลอง (ตารางที่ 2) พบว่า แลคเคสสามารถถูกยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ด้วยโซเดียมไฮไดรด์ ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ และซีสเตอีนความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์

**Table 2** Effects of inhibitors on laccase activity

| Inhibitors       | Concentration (mM) | Relative activity (%) |
|------------------|--------------------|-----------------------|
| None             | -                  | 100                   |
| NaN <sub>3</sub> | 0.01               | 16                    |
|                  | 0.02               | 5                     |
|                  | 0.05               | 0                     |
|                  | 0.1                | 0                     |
|                  | 1                  | 0                     |
| EDTA             | 0.1                | 109                   |
|                  | 1                  | 107                   |
|                  | 3                  | 104                   |
|                  | 5                  | 102                   |
| Cystein          | 0.01               | 74                    |
|                  | 0.02               | 47                    |
|                  | 0.05               | 4                     |
|                  | 0.1                | 0                     |
|                  | 1                  | 0                     |

### 3.7.3 การศึกษาความจำเพาะของสับสเตรตต่อแอคทีวิตีแลคเคส

การศึกษาความจำเพาะของสับสเตรตต่อแอคทีวิตีของแลคเคส โดยปมเอนไซม์กับสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พี เอช 5 วัดแอคทีวิตีกับสับสเตรตต่างๆที่ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ที่ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 นาที อัตราการออกซิไดส์สับสเตรตวัดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสมของแต่ละสับสเตรต

ผลการทดลอง (ตารางที่ 3) พบว่า syringaldazine ให้ค่าแอคทีวิตีของแลคเคสสูงที่สุดรองลงมาก็คือ ABTS และ 2,6-demethoxyphenol ในขณะที่ pyrogallol และ guaiacol มีค่าแอคทีวิตีไม่สูง นอกจากนี้แลคเคสไม่สามารถออกซิไดส์ veratryl alcohol และ tyrosine ได้

**Table 3** Substrate oxidizing activities of laccase

| Substrate           | Absorbance (nm) | Relative activity (%) |
|---------------------|-----------------|-----------------------|
| ABTS                | 436             | 100                   |
| Syringaldazine      | 526             | 141                   |
| 2,6-Dimethoxyphenol | 468             | 85                    |
| Guaiacol            | 436             | 3                     |
| Pyrogallol          | 450             | 28                    |
| Veratryl alcohol    | 310             | 0                     |
| Tyrosine            | 280             | 0                     |

### 3.8 การศึกษาและพัฒนาเทคนิคการทำให้แลคเคสบริสุทธิ์

ในขั้นตอนการทำแลคเคสบริสุทธิ์ จำเป็นต้องใช้เอนไซม์เริ่มต้นปริมาณมาก ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมันฝรั่งเด็กซ์โทรส แล้วทำการเก็บตัวอย่างเอนไซม์ที่ระยะของการผลิตเอนไซม์สูงสุด โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บเฉพาะส่วนใสสำหรับเป็นเอนไซม์เริ่มต้นเพื่อทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป โดยเริ่มต้นจากเอนไซม์ที่มีค่าแอกติวิตีจำเพาะ 1.816 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

#### 3.8.1 ผลการศึกษาการตกตะกอนแลคเคสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ทำการตกตะกอนแลคเคสด้วยการหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว โดยการละลายใน 5 มิลลิลิตรของสารละลายเอนไซม์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เพิ่มปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตทุกๆ 10% จาก 30% ถึง 90% อิ่มตัว วิเคราะห์แอกติวิตีของแลคเคสโดยใช้ ABTS เป็นสับสเตรท ปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ต้องการ (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรสารละลาย) ได้จากระดับความอิ่มตัว

ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4 พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวเพิ่มขึ้นปริมาณแลคเคสมีค่าลดลง จนกระทั่งที่ความเข้มข้น ตั้งแต่ 70% ขึ้นไป สามารถตกตะกอนแลคเคสจากสารละลายเอนไซม์ ซึ่งจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ความเข้มข้น 80% สามารถตกตะกอนแลคเคสได้เกือบสมบูรณ์

**Table 4** Precipitation of laccase from the supernatant by saturated ammonium sulphate

| Ammonium sulphate<br>saturation (%) | Laccase activity<br>(U/ml) | Remaining laccase activity<br>(%) |
|-------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| 0                                   | 0.3996                     | 100                               |
| 10                                  | 0.3654                     | 95                                |
| 20                                  | 0.3461                     | 90                                |
| 30                                  | 0.3308                     | 86                                |
| 40                                  | 0.3115                     | 81                                |
| 50                                  | 0.2577                     | 67                                |
| 60                                  | 0.1115                     | 29                                |
| 70                                  | 0.0192                     | 5                                 |
| 80                                  | 0.0077                     | 2                                 |
| 90                                  | 0.0038                     | 1                                 |

### 3.8.2 ผลการทำแลคเคสให้เข้มข้นขึ้นด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว

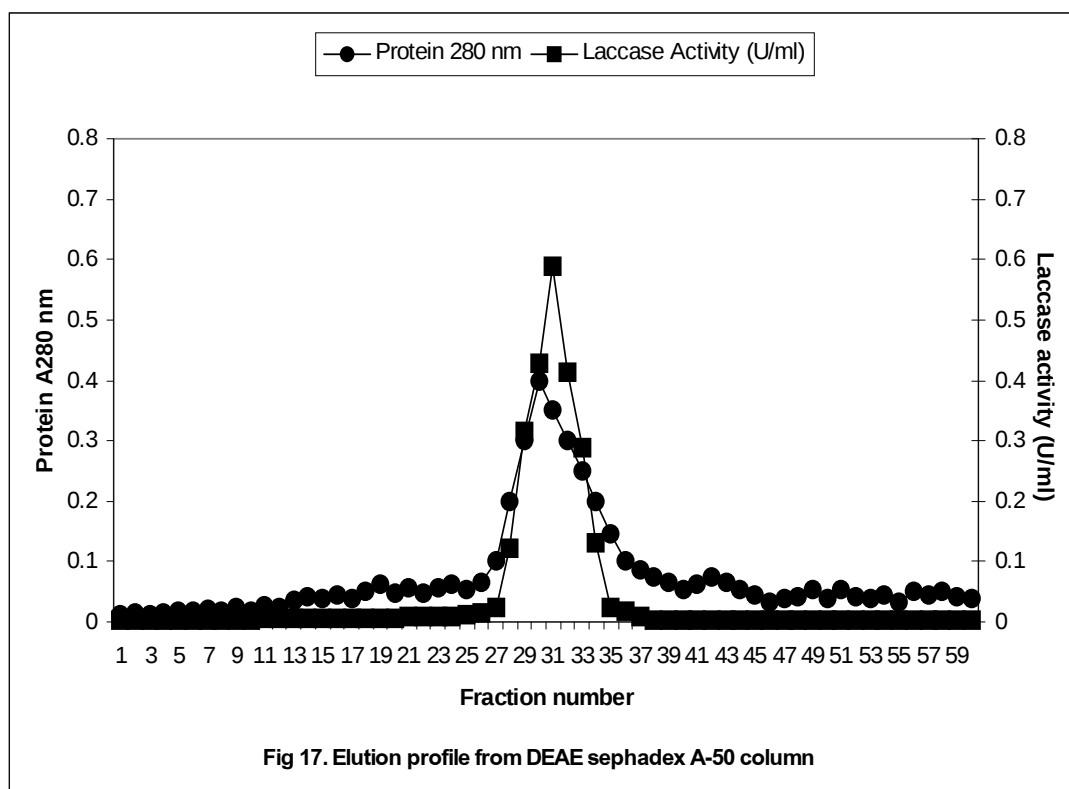
นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมไว้ 400 มิลลิลิตร มาตกตะกอนแลคเคสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้ระดับความเข้มข้นอิ่มตัวที่ 80% ทั้งไว้นาน 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแล้วเก็บตะกอนเอนไซม์ที่ได้นำมาละลายกลับในสารละลาย 0.1 โมลาร์อะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5 ปริมาตร 60 มิลลิลิตร จากนั้นไปทำการกำจัดสิ่งเจือปนที่อาจจะตกค้างอยู่ในสารละลายด้วยการนำไปทำ ultrafiltration ที่มี molecular weight cut off 30 KDa สารละลายที่ได้หลังจากนั้นนำไปวัดปริมาตร วัดแอกติวิตีของแลคเคสและปริมาณโปรตีน

ผลการทดลองพบว่า เมื่อนำสารละลายแลคเคส ปริมาตร 400 มิลลิลิตร เมื่อผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ระดับความเข้มข้น 80% ได้สารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 60 มิลลิลิตรและเมื่อนำไปทำให้เข้มข้นด้วย ultramembrane filtration ได้สารละลาย ปริมาตร 30 มิลลิลิตร มีแอกติวิตีเอนไซม์ 4.389 หน่วยต่อมิลลิลิตร และปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.154 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มเป็น 15.92 เท่า และได้ค่าแอกติวิตีจำเพาะ 28.50 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

### 3.8.3 ผลการทำแลคเคสบริสุทธิ์โดย DEAE-Sephadex A-50 column

นำสารละลายเอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว และทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย ultramembrane filtration MW cut off 30 KDa ได้สารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตรที่มีโปรตีน 0.154 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผ่านการทำให้เข้มข้นด้วยมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย DEAE-Sephadex A-50 column (ขนาด 2.5 x 50 เซนติเมตร) ที่ equilibrate ด้วย 0.1 โมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5 จากนั้นทำการชะเอนไซม์ด้วยการทำ linear gradient ของ 1M NaCl ใน 0.05 โมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5 เก็บ fraction ละ 10 มิลลิลิตร นำไปวัดปริมาณโปรตีนที่ 280 นาโนเมตร และวัดแอกติวิตีของแลคเคส

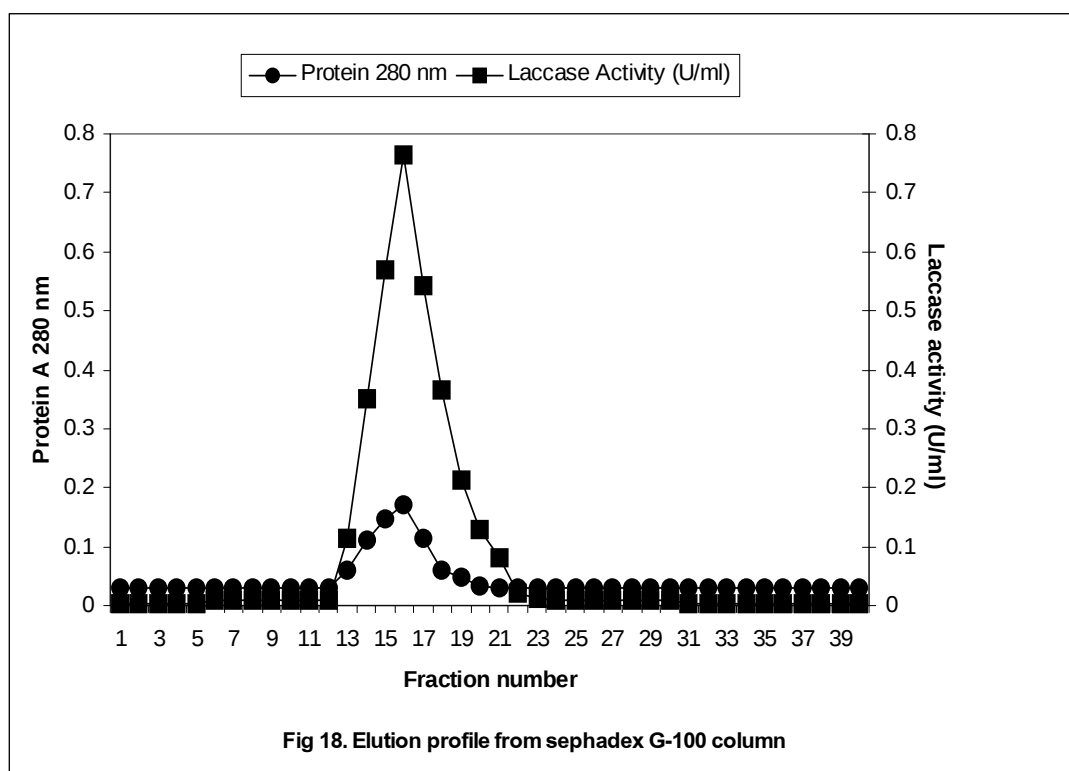
ผลการทดลองพบว่าสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย DEAE-Sephadex A-50 column นั้นมีแอกติวิตีของเอนไซม์ใน fraction ที่ 28-37 และเมื่อรวม fraction ดังกล่าวแล้วมาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย ultramembrane filtration ได้สารละลายปริมาตร 20 มิลลิลิตร มีแอกติวิตีเอนไซม์ 5.267 หน่วยต่อมิลลิลิตร และปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.132 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



### 3.8.4 ผลการทำแลคเคสบริสุทธิ์โดย Sephadex G-100 column

นำสารละลายเอนไซม์มาผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย Sephadex G-100 column (ขนาด 1.5 x 90 เซนติเมตร) ที่ equilibrate ด้วย 0.1 โมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5 จากนั้นทำการชะเอนไซม์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิม เก็บ fraction ละ 10 มิลลิลิตร นำไปวัดปริมาณโปรตีนที่ 280 นาโนเมตร และวัดแอกติวิตีของแลคเคส

ผลการทดลองพบว่าสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต อิมัตัว, DEAE-Sephadex A-50 column และ Sephadex G-100 column นั้นมี แอกติวิตีของเอนไซม์ใน fraction ที่ 13-20 จึงทำการรวม fraction ดังกล่าวแล้วมาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย ultramembrane filtration ที่มี molecular weight cut off 30 Kda ได้สารละลายปริมาตร 12 มิลลิลิตร มีแอกติวิตีเอนไซม์ 5.916 หน่วยต่อมิลลิลิตร และปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.117 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

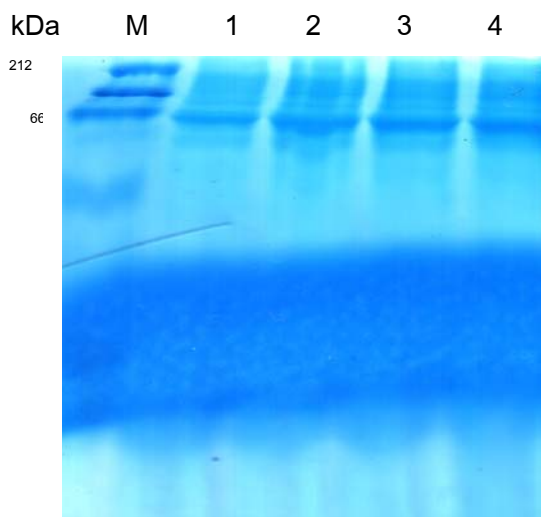


**Table 5** Summary of the purification procedure for *Lentinula edodes* KMUH1

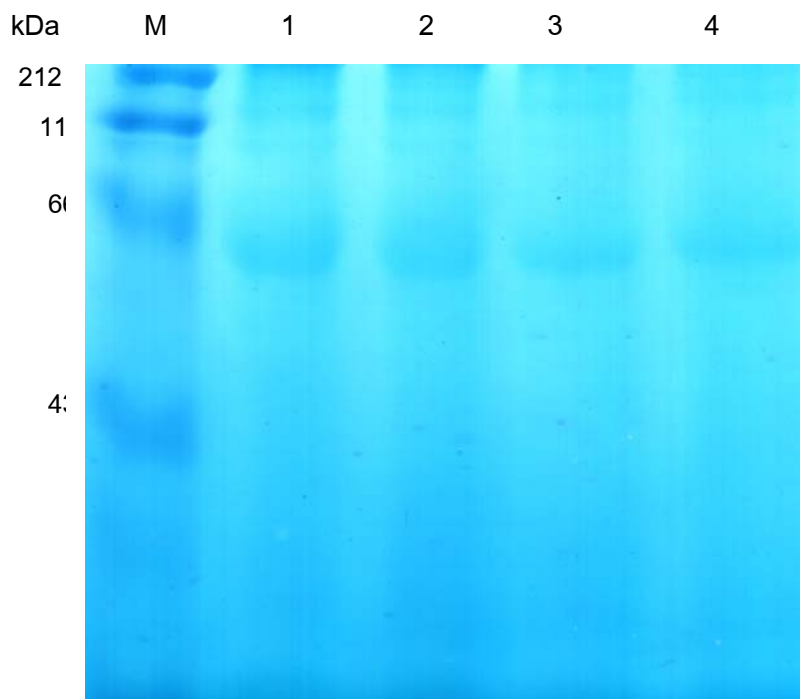
| Purification step                     | Volume (ml) | Activity (U/ml) | Protein (mg/ml) | Total activity (U) | Total protein (mg) | Specific activity (U/mg protein) | Purification fold | Yield (%) |
|---------------------------------------|-------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|----------------------------------|-------------------|-----------|
| Crude culture filtrate                | 400         | 0.4299          | 0.240           | 171.96             | 96.00              | 1.79                             | 1.00              | 100       |
| Ammonium sulphate precipitation (80%) | 60          | 2.706           | 0.176           | 162.36             | 10.56              | 15.37                            | 8.59              | 94.42     |
| Ultra membrane filtration             | 30          | 4.389           | 0.154           | 131.67             | 4.62               | 28.50                            | 15.92             | 76.57     |
| DEAE-Sephadex                         | 20          | 5.267           | 0.132           | 105.34             | 2.64               | 39.90                            | 22.29             | 61.26     |
| Sephadex G-100                        | 12          | 5.916           | 0.117           | 70.99              | 1.40               | 50.71                            | 28.33             | 41.28     |

#### การแยกและวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วย Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

การทำ SDS-PAGE มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์แลคเคส หลังผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนและเจลฟิลเตรชันเทียบกับ crude enzyme โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกจะใส่ crude enzyme เพื่อดูลักษณะแถบโปรตีนบนแผ่นเจล ดังแสดงในรูป ก ส่วนที่ 2 เป็นการใส่เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แสดงในรูป ข



รูป ก แสดงผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยวิธี SDS-PAGE โดยที่ M คือสารโปรตีนมาตรฐาน ที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล 1, 2, 3 และ 4 คือ crude enzyme ที่ความเข้มข้น 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ



รูป ข แสดงผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยวิธี SDS-PAGE โดยที่ M คือสารโปรตีนมาตรฐาน โดยที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล 1, 2, 3 และ 4 คือ purified enzyme ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี ammonium sulphate precipitation, ultra membrane filtration, ion-exchange chromatography และ gel filtration ตามลำดับ

### 3.9 การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อแอกติวิตีของเอนไซม์แลคเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

#### 3.9.1 การศึกษาผลกระทบของพีเอชต่อการเร่งปฏิกิริยา

ศึกษาผลกระทบของพีเอชต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แลคเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (purified) เปรียบเทียบกับแลคเคสที่ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ (crude) ของ *Lentinula edodes* KMUH1 โดยใช้เอนไซม์ปฏิกิริยาด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชในช่วง 2-11 โดยใช้สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (พีเอช 2 ถึง 6) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (พีเอช 7 ถึง 11) ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 10 นาที

ผลการทดลอง (รูปที่ 19) พบว่าแลคเคสทั้งที่อยู่ในรูป crude และ purified มีรูปแบบของผลกระทบของพีเอชเหมือนกันกล่าวคือ เมื่อใช้ช่วงพีเอชของปฏิกิริยาระหว่าง 3-6 แลคเคสจะมีอัตราการเร่งปฏิกิริยาสูงสุด (พีเอชที่เหมาะสม) ที่ช่วงพีเอชประมาณ 3-5 หลังจากนั้นความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาจะลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อพีเอชสูงกว่า 7 พบว่าเอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้

### 3.9.2 การศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยา

ทำการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเร่งปฏิกิริยาของแลคเคส ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (purified) เปรียบเทียบกับแลคเคสที่ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ (crude) ของ *Lentinula edodes* KMUH1 โดยใช้เอนไซม์บ่มกับสับสเตรท ABTS ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิ 20-80 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 10 นาที

ผลการทดลอง (รูปที่ 20) พบว่าเมื่อติดตามปฏิกิริยาในช่วงของอุณหภูมิระหว่าง 20-80 องศาเซลเซียส แลคเคสทั้งที่อยู่ในรูป crude และ purified มีอัตราการเร่งปฏิกิริยาสูงสุด (อุณหภูมิที่เหมาะสม) ที่อุณหภูมิประมาณ 30-60 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นอัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว และพบว่าที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เกือบไม่พบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เลย

### 3.10 การศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อความเสถียรของเอนไซม์แลคเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

#### 3.10.1 ผลการศึกษาความเสถียรต่อพีเอชของแลคเคส

ศึกษาความเสถียรของแลคเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (purified) เปรียบเทียบกับแลคเคสที่ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ (crude) ของ *Lentinula edodes* KMUH1 โดยทำการบ่มเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชในช่วง 2-11 โดยใช้สารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (พีเอช 2 ถึง 6) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (พีเอช 7 ถึง 11) ใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 16 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวัดแอกติวิตีของแลคเคสโดยใช้ ABTS เป็นสับสเตรท

ผลการทดลอง (รูปที่ 21) พบว่าความเสถียรของแลคเคสแลคเคสทั้งที่อยู่ในรูป crude และ purified มีค่าสูงสุดที่พีเอช ระหว่าง 3-6 ส่วนพีเอชในช่วงค่าสูงกว่านี้เอนไซม์จะเสียสภาพไปอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามในช่วงพีเอชที่ต่ำกว่า 3 แลคเคสจะเริ่มเสียสภาพไปได้ช้ากว่า

#### 3.10.2 ผลการศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิของแลคเคส

บ่มแลคเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (purified) เปรียบเทียบกับแลคเคสที่ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ (crude) ของ *Lentinula edodes* KMUH1 ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 เป็นเวลานาน 60 นาที ที่อุณหภูมิ 20-80 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 10 นาทีมาวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ โดยใช้สับสเตรท ABTS

ผลการทดลอง (รูปที่ 22) พบว่าเอนไซม์แลคเคสทั้งที่อยู่ในรูป crude และ purified มีความเสถียรสูงในช่วงอุณหภูมิ 20-40 โดยที่อุณหภูมิระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส แลคเคส ไม่มีการสูญเสียแอกติวิตีของเอนไซม์เลยเมื่อเก็บไว้ที่สภาวะดังกล่าวนาน 60 นาที

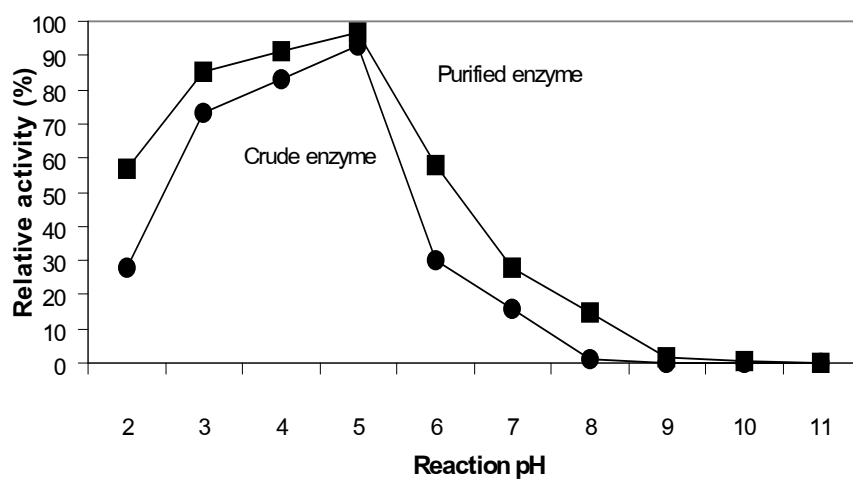


Fig 19. Effects of pH on enzyme activity of crude and purified laccase of *Lentinula edodes*. The enzyme reaction was performed at 37°C for 10 min.

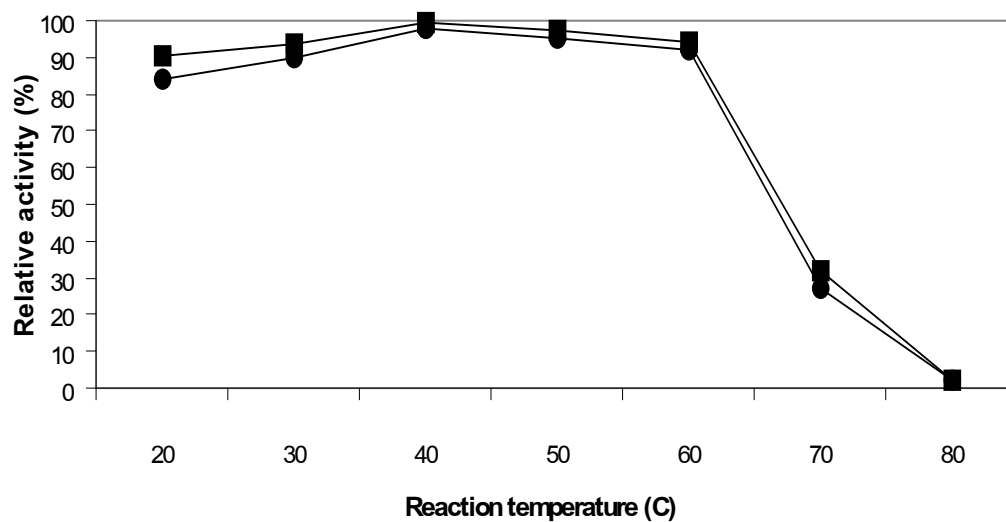


Fig 20. Effects of temperature on enzyme activity. The enzyme reaction was performed in 0.1M acetate buffer pH 5.0 for 10 min.

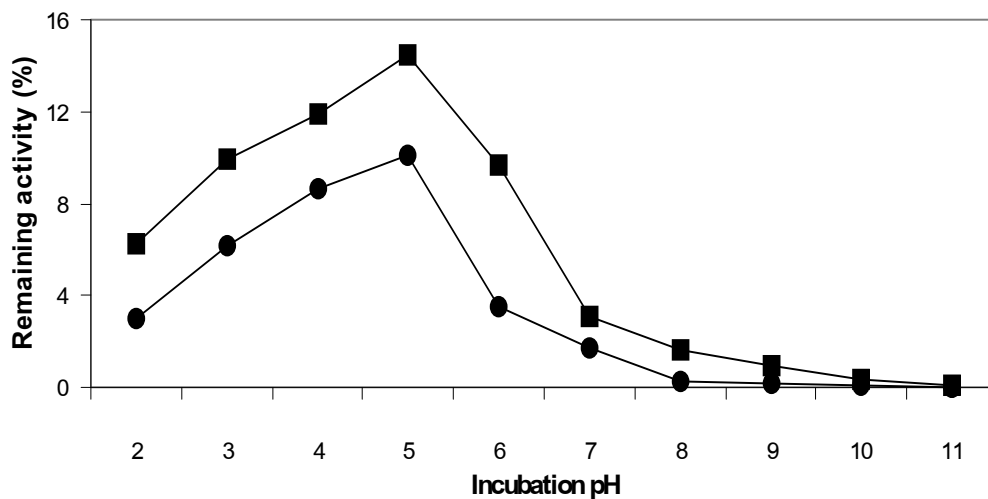


Fig. 21 Effects of pH on enzyme stability of crude and purified laccase of *Lentinula edodes*. The enzyme activity was measured after incubating at various pH at 37C for 16 hrs.

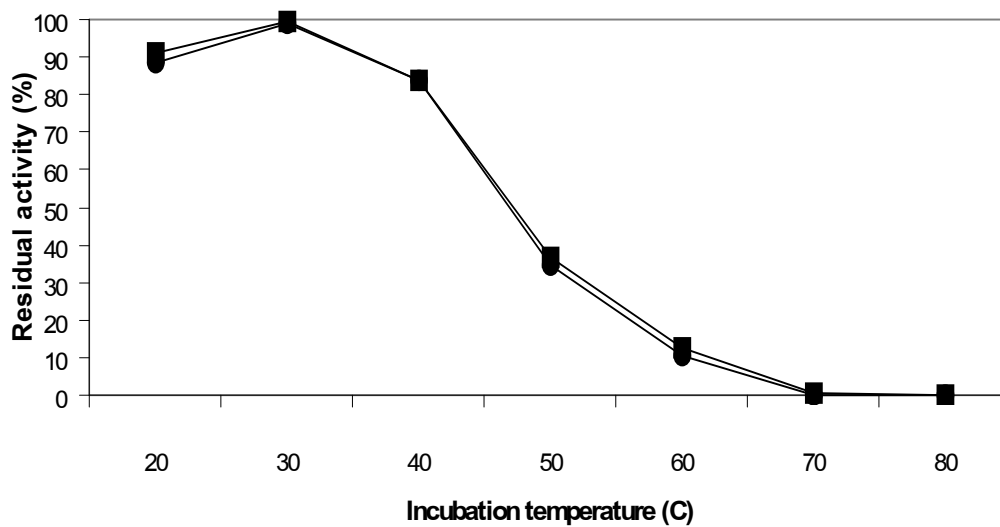


Fig 22. Effects of temperature on crude and purified enzyme atability. Activity remaining was measure after incubating in 0.1M acetate buffer pH 5 at various temperature for 30 min.

### 3.11 การศึกษาการยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์แลคเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

#### 3.11.1 ผลกระทบของไอออนโลหะต่อแอกติวิตีของแลคเคส

ศึกษาผลกระทบของไอออนโลหะต่อแอกติวิตีของแลคเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (purified) เปรียบเทียบกับแลคเคสที่ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ (crude) ของ *Lentinula edodes* KMUH1 โดยใช้ ABTS เป็นสับสเตรท ทำการบ่มเอนไซม์ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5 ที่มีโลหะความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

ผลการทดลอง (ตารางที่ 6) พบว่า สารประกอบอนินทรีย์ของโลหะ  $\text{HgCl}_2$  สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของแลคเคส ทั้งที่อยู่ในรูป crude 60% โดยไม่มีผลกระทบต่อ purified ส่วนสารอื่นๆมีการยับยั้งเล็กน้อย นอกจากนี้บางชนิดสามารถกระตุ้นแอกติวิตีของเอนไซม์ได้

**Table 6** Effects of metal ions on laccase activity

| Metal ion salt  | Concentration (mM) | Relative activity (%) (Crude laccase) | Relative activity (%) (Purified laccase) |
|-----------------|--------------------|---------------------------------------|------------------------------------------|
| None            | -                  | 100                                   | 100                                      |
| $\text{BaCl}_2$ | 1                  | 102                                   | 96                                       |
| $\text{CaCl}_2$ | 1                  | 91                                    | 100                                      |
| $\text{CoCl}_2$ | 1                  | 95                                    | 73                                       |
| $\text{HgCl}_2$ | 1                  | 40                                    | 104                                      |
| KCl             | 1                  | 101                                   | 100                                      |
| $\text{MnCl}_2$ | 1                  | 94                                    | 102                                      |
| NaCl            | 1                  | 96                                    | 102                                      |
| $\text{SrCl}_2$ | 1                  | 100                                   | 101                                      |
| $\text{ZnCl}_2$ | 1                  | 99                                    | 101                                      |
| $\text{CuCl}_2$ | 1                  | 175                                   | 177                                      |

#### 3.11.2 ผลกระทบของตัวยับยั้งต่อแอกติวิตีของแลคเคส

ศึกษาผลกระทบของตัวยับยั้งต่อแอกติวิตีของแลคเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (purified) เปรียบเทียบกับแลคเคสที่ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ (crude) ของ *Lentinula edodes* KMUH1 โดยใช้ ABTS เป็นสับสเตรท ทำการบ่มเอนไซม์ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5 ที่มีตัวยับยั้งที่ความเข้มข้นต่างๆ

ผลการทดลอง (ตารางที่ 7) พบว่า พบว่าเอนไซม์แลคเคสที่อยู่ในรูป crude สามารถถูกยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ด้วยโซเดียมเอไซด์ ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ และซีสเตอีน ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ purified มีค่าแอกติวิตีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

**Table 7** Effects of inhibitors on laccase activity

| Inhibitors       | Concentration (mM) | Relative activity (%)<br>(Crude laccase) | Relative activity (%)<br>(Purified laccase) |
|------------------|--------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------|
| None             | -                  | 100                                      | 100                                         |
| NaN <sub>3</sub> | 0.01               | 16                                       | 40                                          |
|                  | 0.02               | 5                                        | 29                                          |
|                  | 0.05               | 0                                        | 16                                          |
|                  | 0.1                | 0                                        | 3                                           |
|                  | 1                  | 0                                        | 0.5                                         |
| EDTA             | 0.1                | 109                                      | 111                                         |
|                  | 1                  | 107                                      | 109                                         |
|                  | 3                  | 104                                      | 106                                         |
|                  | 5                  | 102                                      | 105                                         |
| Cystein          | 0.01               | 74                                       | 80                                          |
|                  | 0.02               | 47                                       | 58                                          |
|                  | 0.05               | 4                                        | 21                                          |
|                  | 0.1                | 0                                        | 0.5                                         |
|                  | 1                  | 0                                        | 0.2                                         |

### 3.11.3 การศึกษาความจำเพาะของสับสเตรตต่อแอกติวิตีแลคเคส

การศึกษาความจำเพาะของสับสเตรตต่อแอกติวิตีของแลคเคส ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (purified) เปรียบเทียบกับแลคเคสที่ปลดปล่อยออกมาจากเซลล์ (crude) โดยบ่มเอนไซม์กับสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พี เอช 5 วัดแอกติวิตีกับสับสเตรตต่างๆ ที่ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ที่ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 นาที อัตราการออกซิไดส์สับสเตรตวัดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่เหมาะสมของแต่ละสับสเตรต

ผลการทดลอง (ตารางที่ 8) พบว่า synringaldazine ให้ค่าแอกติวิตีของพบว่า เอนไซม์แลคเคสทั้งที่อยู่ในรูป crude และ purified สูงที่สุดรองลงมาก็คือ ABTS และ 2,6-

demethoxyphenol ในขณะที่ pyrogallol และ guaiacol มีค่าแอกติวิตีไม่สูง และแลคเคสไม่สามารถออกซิไดส์ veratryl alcohol และ tyrosine ได้

**Table 8** Substrate oxidizing activities of laccase

| Substrate           | Absorbance<br>(nm) | Relative activity (%)<br>(Crude laccase) | Relative activity (%)<br>(Purified laccase) |
|---------------------|--------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------|
| ABTS                | 436                | 100                                      | 100                                         |
| Syringaldazine      | 526                | 141                                      | 148                                         |
| 2,6-Dimethoxyphenol | 468                | 85                                       | 89                                          |
| Guaiacol            | 436                | 3                                        | 8                                           |
| Pyrogallol          | 450                | 28                                       | 36                                          |
| Veratryl alcohol    | 310                | 0                                        | 0                                           |
| Tyrosine            | 280                | 0                                        | 0                                           |

### 3.12 การศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบของความเข้มข้นสับสเตรตต่อการเร่งปฏิกิริยาของแลคเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

ทำการศึกษากิจกรรมของสับสเตรตต่อการเร่งปฏิกิริยาของแลคเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จาก *Lentinula edodes* สายพันธุ์ KMH1 โดยใช้เอนไซม์ 0.5 หน่วยต่อกับสับสเตรต ABTS, Syringaldazine และ 2,6-Dimethoxyphenol ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.1-3.0 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายอะซีเตทบัฟเฟอร์ พี เอช 5.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาในการบ่ม 5 นาที นำผลการทดลองที่ได้ไปพล็อตระหว่างส่วนกลับของอัตราเร็วของการเร่งปฏิกิริยากับส่วนกลับของความเข้มข้นของสับสเตรต ที่แปรผันตามวิธีของ Lineweaver-Burk

ผลการทดลอง (รูปที่ 23) พบว่า เมื่อใช้ปริมาณ ABTS ในการทำปฏิกิริยาระหว่าง 0.1-3.0 มิลลิโมลาร์ แลคเคสมีอัตราการเร่งของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีค่าสูงสุดเมื่อใช้ ABTS 2 มิลลิโมลาร์ เมื่อเพิ่มปริมาณ ABTS สูงกว่า 2 มิลลิโมลาร์ ไม่พบการเพิ่มอัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ เมื่อนำค่าส่วนกลับของอัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์และส่วนกลับของความเข้มข้น ABTS มาทำการพล็อตกราฟ Lineweaver-Burk (รูปที่ 24) สามารถหาค่า Michaelis constant ( $K_m$ ) สำหรับปฏิกิริยาการออกซิไดส์ ABTS ได้ค่าประมาณ 0.719 มิลลิโมลาร์ และค่า  $V_{max}$  0.557 มิลลิโมลต่อวินาที

เมื่อใช้ปริมาณ Syringaldazine ในการทำปฏิกิริยาระหว่าง 0.1-3.0 มิลลิโมลาร์ แลคเคสมีอัตราการเร่งของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 25) และมีค่าสูงสุดเมื่อใช้ Syringaldazine 1.8

มิลลิโมลาร์ เมื่อเพิ่มปริมาณ Syringadine สูงกว่า 1.8 มิลลิโมลาร์ ไม่พบการเพิ่มอัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ เมื่อนำค่าส่วนกลับของอัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์และส่วนกลับของความเข้มข้น Syringadine มาทำการพล็อตกราฟ Lineweaver-Burk (รูปที่ 26) สามารถหาค่า Michaelis constant (Km) สำหรับปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ Syringadine ได้ค่าประมาณ 1.85 มิลลิโมลาร์ และค่า Vmax 1.268 มิลลิโมลต่อนาที

และเมื่อใช้ปริมาณ 2,6-Dimethoxyphenol ในการทำปฏิกิริยาระหว่าง 0.1-3.0 มิลลิโมลาร์ แลคเคสมีอัตราการเร่งของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 27) และมีค่าสูงสุดเมื่อใช้ 2,6-Dimethoxyphenol 2.4 มิลลิโมลาร์ เมื่อเพิ่มปริมาณ 2,6-Dimethoxyphenol สูงกว่า 2.4 มิลลิโมลาร์ ไม่พบการเพิ่มอัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ เมื่อนำค่าส่วนกลับของอัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์และส่วนกลับของความเข้มข้น 2,6-Dimethoxyphenol มาทำการพล็อตกราฟ Lineweaver-Burk (รูปที่ 28) สามารถหาค่า Michaelis constant (Km) สำหรับปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ 2,6-Dimethoxyphenol ได้ค่าประมาณ 1.49 มิลลิโมลาร์ และค่า Vmax 0.623 มิลลิโมลต่อนาที

แต่เมื่อทำการหาค่า Km และ Vmax โดยใช้การคำนวณจากสูตร ซึ่งอาศัยข้อมูลจากกราฟพบว่าค่าที่ได้ แตกต่างกันเล็กน้อย ดังแสดงในตารางที่ 9

**Table 9** Substrate specificity of purified laccase *Lentinula edodes* KMH1

| Substrate           | Value from graph |       | Value from estimate |       |
|---------------------|------------------|-------|---------------------|-------|
|                     | Km               | Vmax  | Km                  | Vmax  |
| ABTS                | 0.719            | 0.557 | 0.746               | 0.578 |
| Syringaldazine      | 1.85             | 1.268 | 2.754               | 1.887 |
| 2,6-dimethoxyphenol | 1.49             | 0.623 | 1.515               | 0.633 |

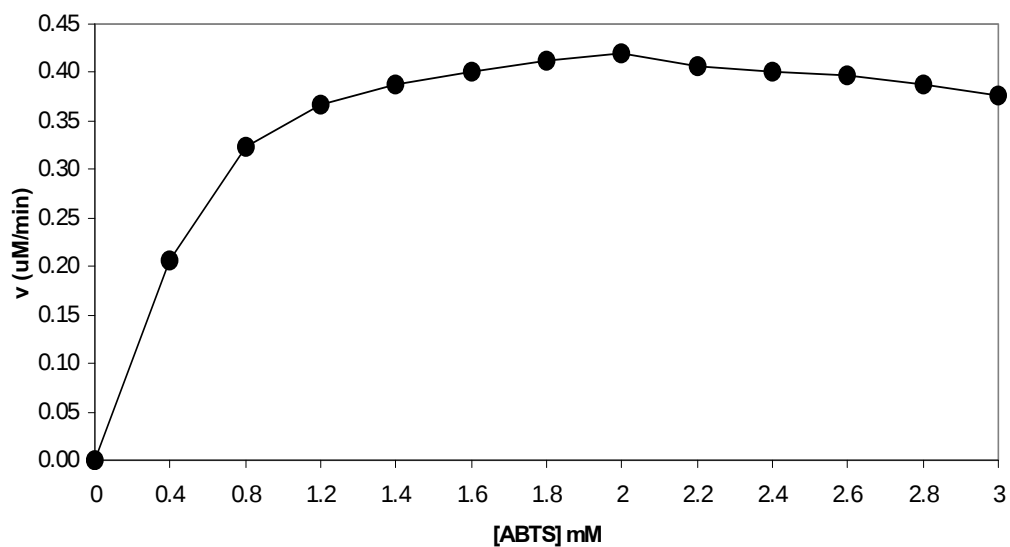


Fig 23. Correlation between ABTS concentration versus velocity of laccase activity

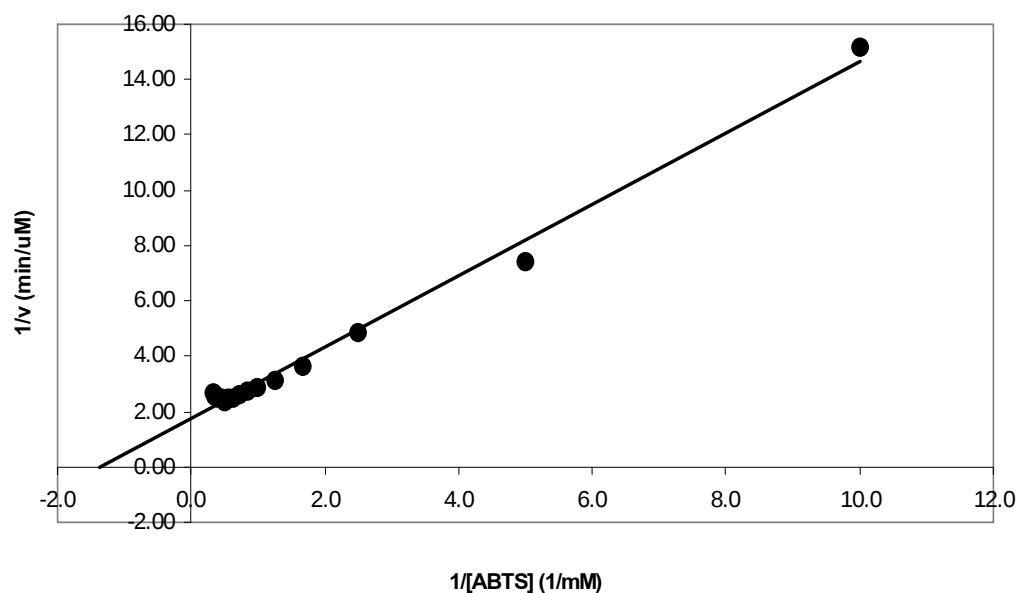


Fig 24. Lineweaver-Burk plot of inverse velocity laccase activity and inverse ABTS concentration

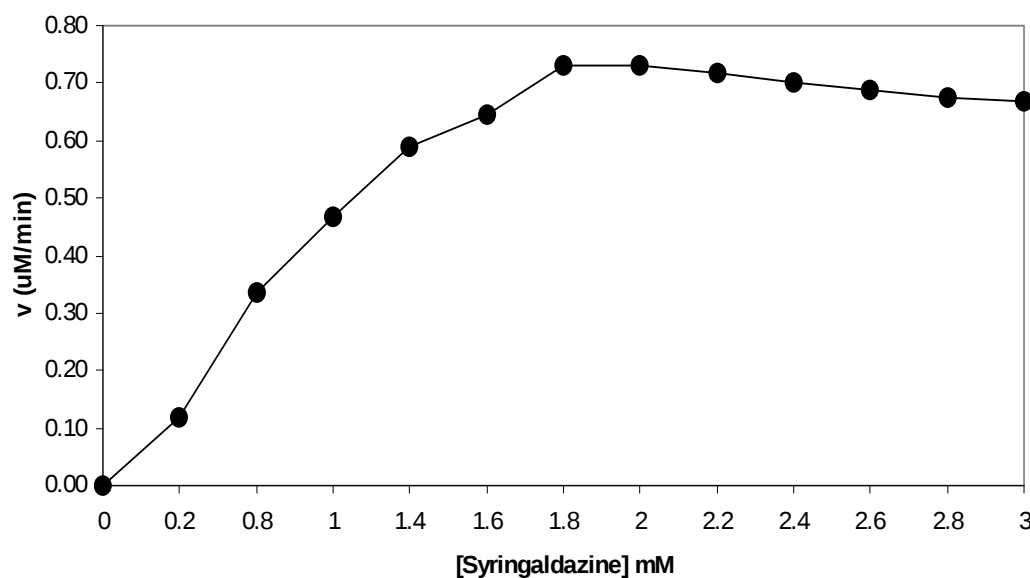


Fig 25. Correlation between Syringaldazine concentration vbersus velocity of laccase activity

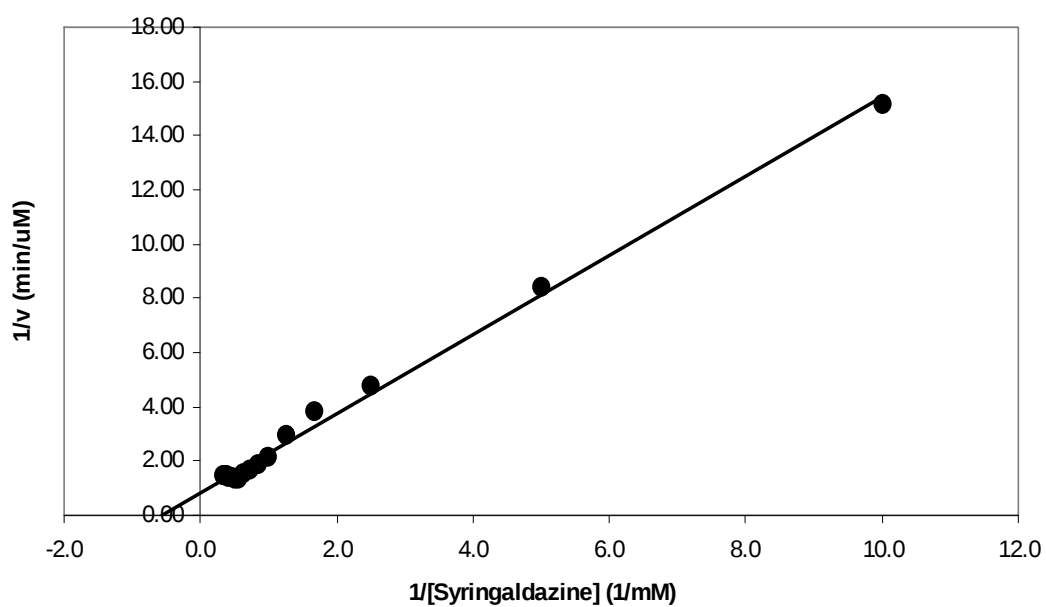
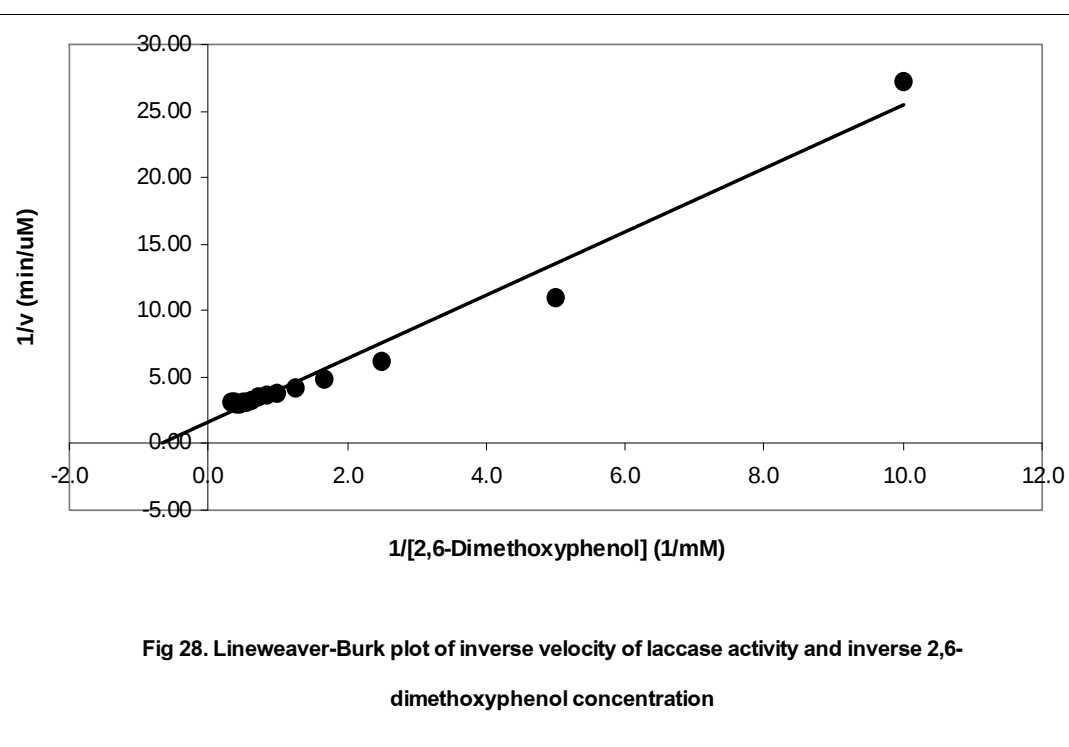
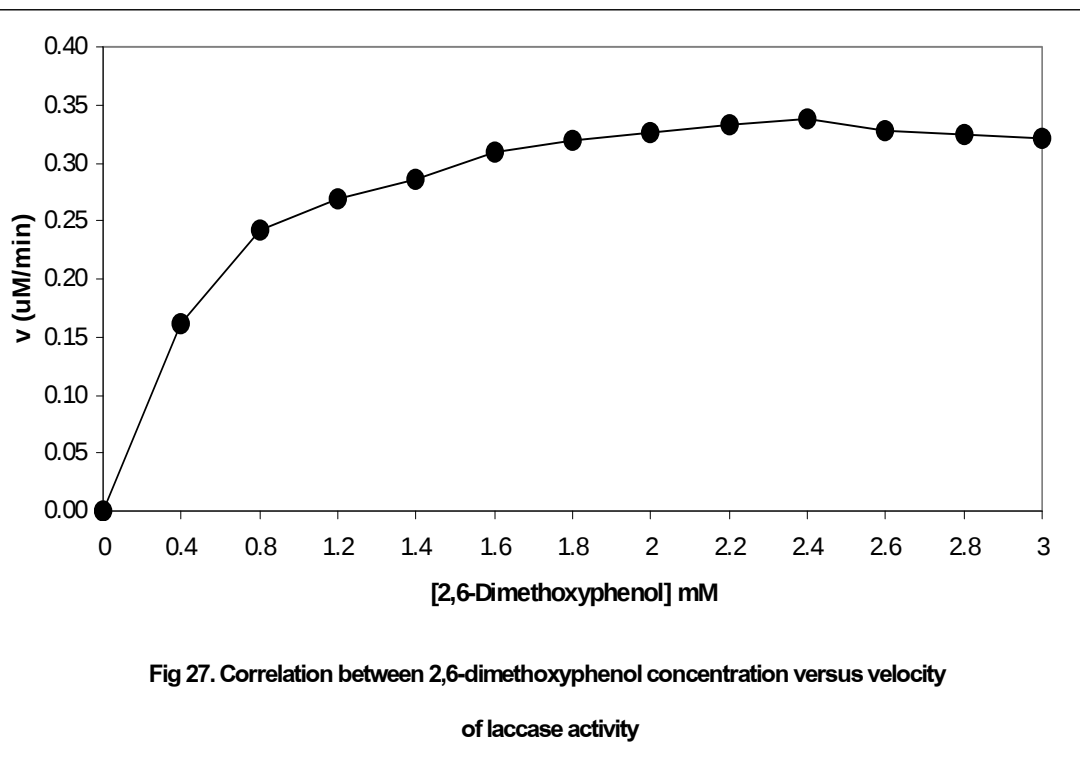


Fig 26. Lineweaver-Burk plot of inverse velocity laccase activity and inverse syringaldazine concentration



### 3.13 การศึกษาความสามารถของแลคเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในการฟอกจางสีสังเคราะห์

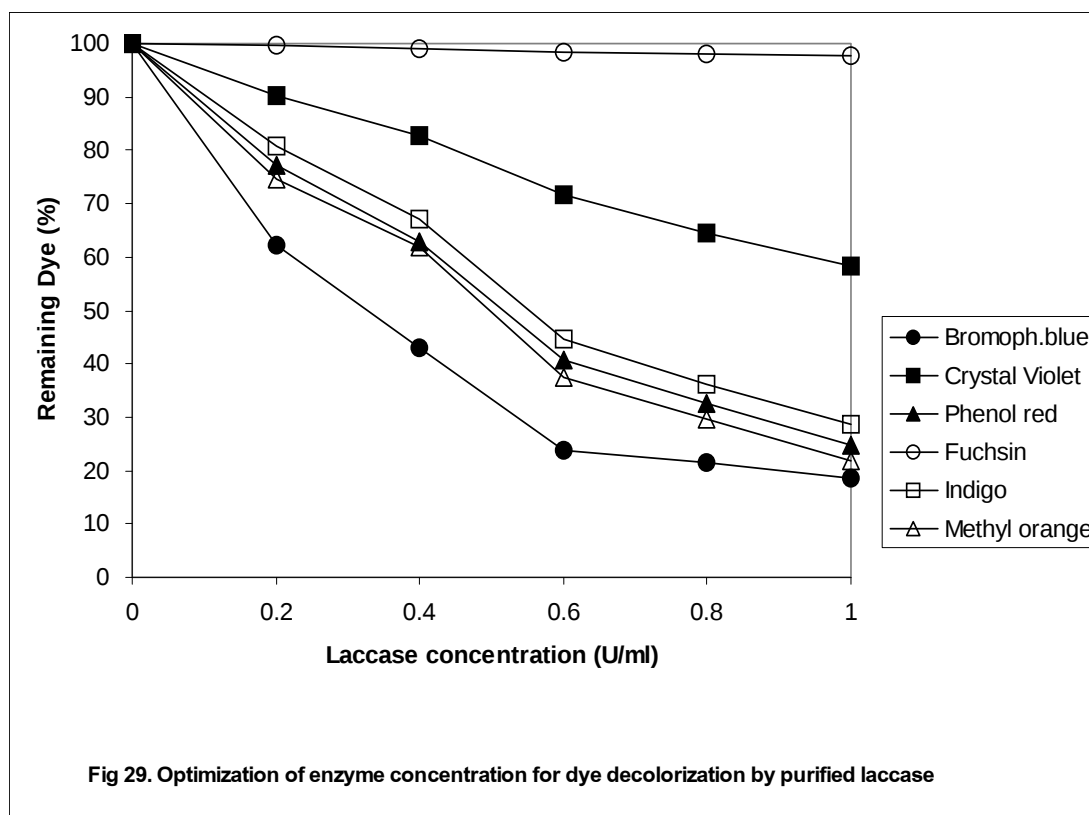
#### 3.13.1 การศึกษาปริมาณของแลคเคสในการฟอกจางสีสังเคราะห์

ศึกษาหาปริมาณของแลคเคสที่เหมาะสมในการฟอกจางสีสังเคราะห์ ซึ่งใช้สีอยู่ 3 กลุ่มใหญ่ ดังแสดงในตารางที่ 10 การเตรียมสารละลายสีเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ในการทดลองทำได้โดยใช้แลคเคสบริสุทธิ์ในช่วง 0.2 ถึง 1.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในสารละลายปฏิกิริยาประกอบด้วย เอนไซม์ ใน 0.1 โมลาร์ อะซีเตสบัฟเฟอร์ พี เอช 5.0 และสีที่ความเข้มข้นสุดท้าย 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายใน 3 มิลลิลิตรปรับด้วยบัฟเฟอร์ จากนั้นบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวควบคุมที่ใช้ในการทดลองคือการนำแลคเคสไปต้มทำลายแอกติวิตีในน้ำเดือดนาน 5 นาที

ผลการทดลอง (รูปที่ 29) การฟอกจางสีสังเคราะห์ในกลุ่ม triphenyl methane ได้แก่ บลอมฟีนอลบลู, คริสตัลไวโอเล็ต, ฟีนอลเรด และ ฟุซิจิน สีสังเคราะห์ในกลุ่ม anthraquinone ได้แก่ indigo และสีสังเคราะห์ในกลุ่ม azo ได้แก่ methyl orange พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณแลคเคสความสามารถในการฟอกจางสีก็เพิ่มขึ้นตามไปด้วย และมากกว่า 50% การฟอกจางสีสังเคราะห์เมื่อบ่มกับเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 0.4-1 U/ml

**Table 10** Structure, concentration and maximum absorbance wavelength of dyes

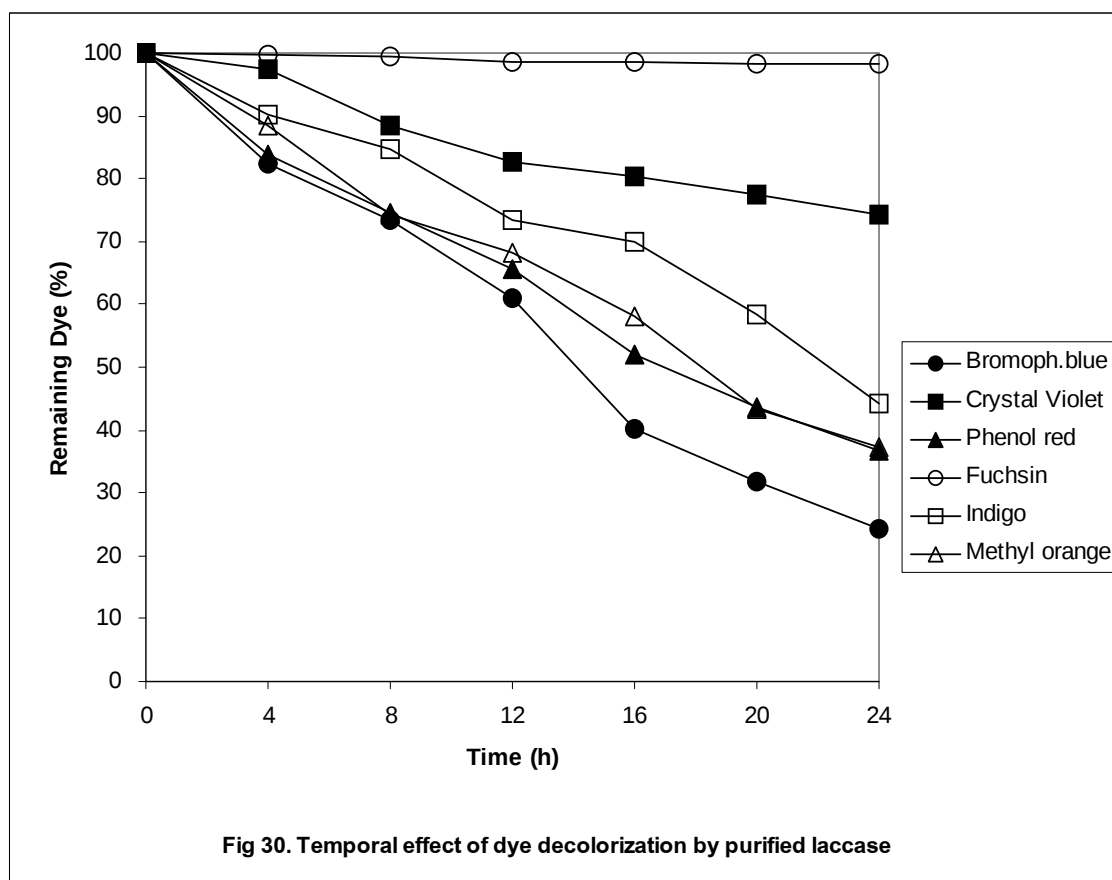
| Dye type          | Dyes             | Concentrations of dyes<br>(mg/l) | Maximum absorbance<br>wavelength (nm) |
|-------------------|------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| Triphenyl methane | Bromophenol blue | 60                               | 592                                   |
|                   | Crystal violet   | 60                               | 490                                   |
|                   | Phenol red       | 60                               | 431                                   |
|                   | Fuscin           | 60                               | 530                                   |
| Anthraquinone     | Indigo           | 60                               | 580                                   |
| Azo dye           | Methyl orange    | 60                               | 466                                   |



### 3.13.2 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการฟอกจางสีสังเคราะห์

ศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการฟอกจางสีสังเคราะห์ ซึ่งใช้สีอยู่ 3 กลุ่มใหญ่ ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว การเตรียมสารละลายสีเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ในการทดลองทำได้โดยใช้แลคเคสบริสุทธิ์ที่ 0.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในสารละลายปฏิกิริยาประกอบด้วย เอนไซม์ ใน 0.1 โมลาร์ อะซีเตสบัฟเฟอร์ พี เอช 5.0 0.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร และสีที่ความเข้มข้นสุดท้าย 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายใน 3 มิลลิลิตรปรับด้วยบัฟเฟอร์ จากนั้นบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ตัวอย่างทุกๆ 4 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวควบคุมที่ใช้ในการทดลองคือการนำแลคเคสไปต้มทำลายแอกติวิตีในน้ำเดือดนาน 5 นาที

ผลการทดลอง (รูปที่ 30) การฟอกจางสีสังเคราะห์ในกลุ่ม triphenyl methane ได้แก่ บลอมฟีนอลบลู, คริสตัลไวโอเล็ต, ฟีนอลเรด และ ฟุชซิน สีสังเคราะห์ในกลุ่ม anthraquinone ได้แก่ indigo และสีสังเคราะห์ในกลุ่ม azo ได้แก่ methyl orange พบว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่มนานขึ้น ความสามารถในการฟอกจางสีก็เพิ่มขึ้นตามไปด้วย และความสามารถในการฟอกจางสีสังเคราะห์มีค่าสูงในช่วงระยะเวลาแรกๆของการบ่ม (4 และ 8 ชั่วโมง) ซึ่งอัตราการฟอกจางสีเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการบ่ม

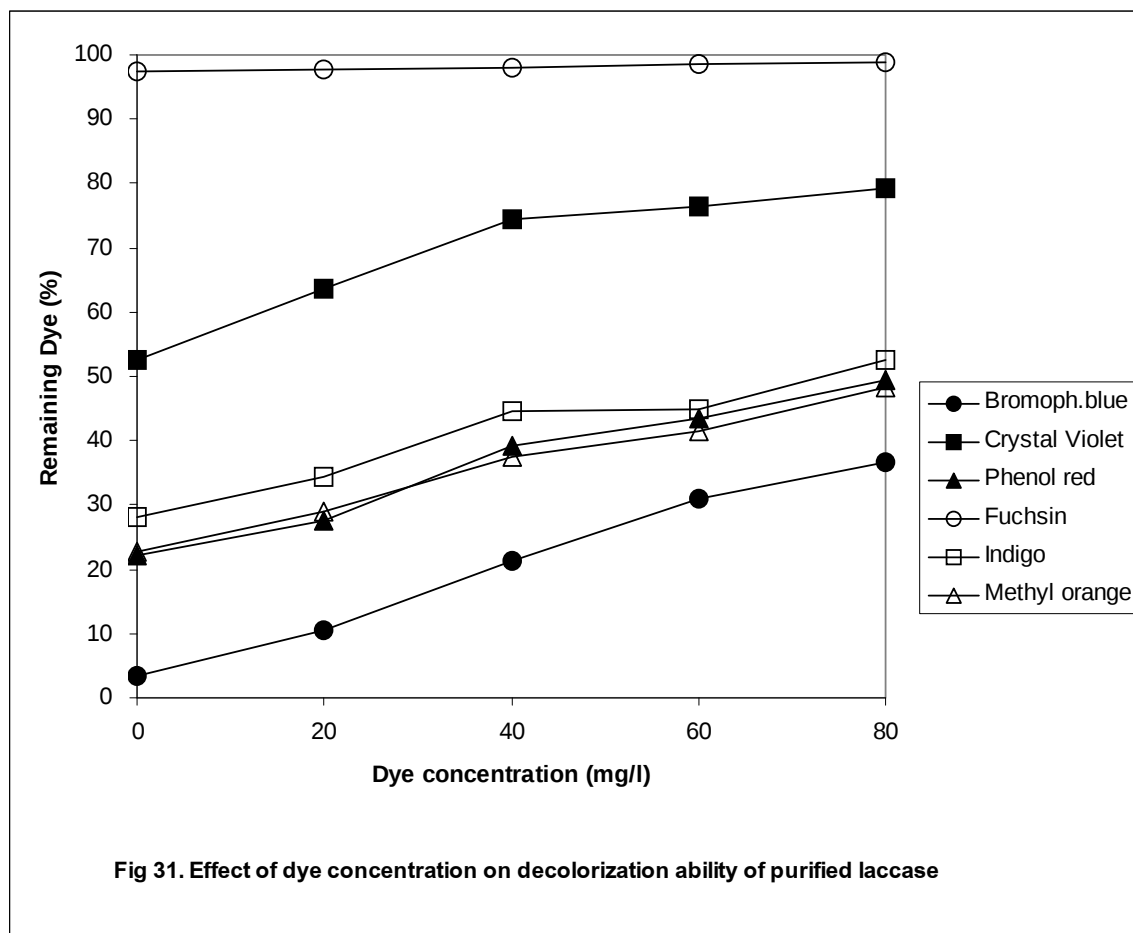


### 3.13.3 การศึกษาความเข้มข้นของสีสังเคราะห์ต่อความสามารถในการฟอกจางสีสังเคราะห์ของแลคเคส

ศึกษาหาปริมาณของสีสังเคราะห์ต่อความสามารถในการฟอกจางสีสังเคราะห์ของแลคเคส ซึ่งใช้สีอยู่ 3 กลุ่มใหญ่ ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว การเตรียมสารละลายสีเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ในการทดลองทำได้โดยใช้แลคเคสบริสุทธิ์ที่ 0.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในสารละลายปฏิกิริยาประกอบด้วย เอนไซม์ ใน 0.1 โมลาร์ อะซีเตสบัฟเฟอร์ พี เอช 5.0 0.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร และแปรผันความเข้มข้นของสีที่ความเข้มข้นสุดท้าย ในช่วง 20-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตรสุดท้ายของสารละลายใน 3 มิลลิลิตรปรับด้วยบัฟเฟอร์ จากนั้นบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตัวควบคุมที่ใช้ในการทดลองคือการนำแลคเคสไปต้มทำลายแอคทิวิตีในน้ำเดือดนาน 5 นาที

ผลการทดลอง (รูปที่ 31) การฟอกจางสีสังเคราะห์ในกลุ่ม triphenyl methane ได้แก่ บลอมฟีนอลบลู, คริสตัลไวโอเล็ต, ฟีนอลเรด และ ฟุซิซิน สีสังเคราะห์ในกลุ่ม anthraquinone ได้แก่ indigo และสีสังเคราะห์ในกลุ่ม azo ได้แก่ methyl orange พบว่า การฟอกจางสีสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่ำๆ แลคเคส สามารถฟอกจางสีสังเคราะห์ได้มาก โดยเฉพาะ

ในช่วง 20-40 มิลลิกรัมต่อลิตรของสีสังเคราะห์ นอกจากนี้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสีสังเคราะห์เพิ่มขึ้นความสามารถในการฟอกจางสีมีค่าลดลงไปตามความเข้มข้นที่มากขึ้น ในช่วง 80-100 มิลลิกรัมต่อลิตรของสีด้วยแลคเคสที่ 0.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร



### 3.14 การศึกษาคุณลักษณะทางโมเลกุลของจีนที่ผลิตแลคเคส

#### 3.14.1 การออกแบบไพรเมอร์ (Primer design)

จากการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนอนุรักษ์ของจีน *lac* โดยอาศัยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดสายพันธุ์ต่างๆในกลุ่ม Basidiomycota ที่พบในฐานข้อมูล พบว่าบริเวณของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของจีน *lac* มีลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงดังข้อมูลต่อไปนี้

| ชื่อไพรเมอร์       | ลำดับนิวคลีโอไทด์         | ขนาด (เบส) | Tm (องศาเซลเซียส) |
|--------------------|---------------------------|------------|-------------------|
| Forword <i>lac</i> | ATGCTTCCCTTCGTTTATCTTCTGG | 25         | 50.9              |
| Reverse <i>lac</i> | TCAAGGTAATTGAGCAGGGG      | 20         | 46.7              |

### 3.14.2 การแยกอาร์เอ็นเอจากเส้นใยเห็ดหอม

จากการเพาะเลี้ยงเส้นใยของเห็ดหอมในอาหารเหลวมันฝรั่งเด็กซ์โทรส บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างโดยการกรองและล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง และนำเส้นใยไปสกัดแยกอาร์เอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดแยกอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (Total RNA Extraction Kit (Plant) [Mini] (RBC BIOSCIENCE, TAIWAN) ภายหลังการตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1 % agarose gel อาร์เอ็นเอที่แยกได้นี้จะนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน *lac* และศึกษาถึงการแสดงออกของจีนด้วยเทคนิค RT-PCR ต่อไป

### 3.14.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของจีน *lac* โดยเทคนิค RT-PCR

จากการนำอาร์เอ็นเอที่แยกสกัดได้จากเส้นใยเห็ดหอมมาทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของจีน *lac* ด้วยเทคนิค RT-PCR ร่วมกับไพรเมอร์ Forward *lac* และ Reverse *lac* เกิดปัญหาขึ้นในระหว่างการทดลอง โดยผลิตภัณฑ์ PCR มีความบริสุทธิ์น้อยมากและมีชิ้นดีเอ็นเออื่นๆปนเปื้อน ซึ่งไม่ทราบสาเหตุ อาจเกิดเนื่องจากความผิดปกติของเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง จึงต้องกลับไปทำการแยกอาร์เอ็นเอจากเส้นใยเห็ดหอมใหม่อีกครั้ง และทำการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของจีน *lac* โดยเทคนิค RT-PCR ซึ่งเมื่อสามารถผ่านขั้นตอนการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของจีน *lac* แล้ว จะทำการแยกสกัดและทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ โดยตัดชิ้นเจลตรงตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ และนำมาแยกสกัดชิ้น PCR ให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดแยกสกัดดีเอ็นเอจากเจลสำเร็จรูป จากนั้นขั้นตอนต่อไปจะเป็นการโคลนชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR และคัดเลือกโคลนที่ต้องการ และขั้นตอนสุดท้ายคือการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลนที่คัดเลือกได้

## บทที่ 4

### สรุปผลการทดลอง

#### 4.1 สรุปผลการศึกษา

1. เมื่อเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมบนอาหารแข็งที่ 25, 30 และ 32 องศาเซลเซียส พบว่าเส้นใยเห็ดหอมทุกสายพันธุ์มีรูปแบบการเจริญแบบทวิคูณ (Logarithmic growth) โดยมีช่วง log phase อยู่ในช่วงอายุ 10-20 วัน และจะเริ่มเข้าสู่ stationary phase ที่อายุ 25-30 วัน ในขณะที่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่สภาวะเดียวกัน มีรูปแบบการเจริญเหมือนกันแต่มีช่วง log phase อยู่ในช่วงอายุ 20-40 วัน และจะเริ่มเข้าสู่ stationary phase ที่อายุ 40-60 วัน

2. เส้นใยเห็ดหอมสามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้ในระหว่างการเจริญของเส้นใย และพบว่า เอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส ของเห็ดหอมสายพันธุ์ลูกผสมมีค่าแอกติวิตีของเอนไซม์สูงสุดสูงกว่าสายพันธุ์พ่อ-แม่ทุกอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง โดยพบว่าสายพันธุ์ KMH1 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตแลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้สูงทุกอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง

3. จากการศึกษาและพัฒนาเทคนิคการทำให้แลคเคสบริสุทธิ์บางส่วน เมื่อผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วย สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว แยกด้วย DEAE-Sephadex A-50 column ทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย ultramembrane filtration และแยกด้วย Sephadex G-100 column พบว่าได้แลคเคสที่มีค่าแอกติวิตีจำเพาะเพิ่มจาก 1.79 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เป็น 50.71 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งสูงกว่าแอกติวิตีเริ่มต้นประมาณ 28 เท่า

4. จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อแอกติวิตีของเอนไซม์แลคเคสที่อยู่ในรูป crude และ ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (purified) พบว่า

4.1 Crude และ purified แลคเคส มีรูปแบบ พีเอชที่เหมาะสม เหมือนกันคือ ที่ช่วงพีเอชประมาณ 3-5 เมื่อพีเอชสูงกว่า 7 พบว่าเอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ และมีอัตราการเร่งปฏิกิริยาสูงสุด (อุณหภูมิที่เหมาะสม) ที่อุณหภูมิประมาณ 30-60 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นอัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว และพบว่าที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เกือบไม่พบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เลย

4.2 แลคเคสทั้งที่อยู่ในรูป crude และ purified มีความเสถียรต่อพีเอช ที่ 3-6 ส่วนพีเอชในช่วงค่าสูงกว่านี้เอนไซม์จะเสียสภาพไปอย่างรวดเร็ว และมีความเสถียรสูงในช่วงอุณหภูมิ 20-

40 โดยที่อุณหภูมิระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส แลคเคส ไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์เลยเมื่อเก็บไว้ที่สภาวะดังกล่าวนาน 60 นาที

4.3 สารประกอบอินทรีย์ของโลหะ  $\text{HgCl}_2$  สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของแลคเคส ที่อยู่ในรูป crude 60% โดยไม่มีผลกระทบต่อ purified ส่วนสารอื่นๆมีการยับยั้งเล็กน้อย แลคเคสที่อยู่ในรูป crude สามารถถูกยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ด้วยโซเดียมเอไซด์ ความเข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ และซีสเดอินความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ purified มีค่าแอคติวิตีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

4.4 syringaldazine ให้ค่าแอคติวิตีของแลคเคสทั้งที่อยู่ในรูป crude และ purified สูงที่สุดรองลงมาก็คือ ABTS และ 2,6-demethoxyphenol ในขณะที่ pyrogallol และ guaiacol มีค่าแอคติวิตีไม่สูง และแลคเคสไม่สามารถออกซิไดส์ veratryl alcohol และ tyrosine ได้

4.5 ผลการศึกษาจลนพลศาสตร์ของแลคเคส เมื่อใช้ ABTS เป็นสับสเตรท ได้ค่า Michaelis constant ( $K_m$ ) สำหรับปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ ประมาณ 0.719 มิลลิโมลาร์ และค่า  $V_{max}$  0.557 มิลลิโมลต่อวินาที เมื่อใช้ Syringadine สามารถหาค่า Michaelis constant ( $K_m$ ) สำหรับปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ ได้ค่าประมาณ 1.85 มิลลิโมลาร์ และค่า  $V_{max}$  1.268 มิลลิโมลต่อวินาที และเมื่อใช้ 2,6-Dimethoxyphenol สามารถหาค่า Michaelis constant ( $K_m$ ) สำหรับปฏิกิริยาการออกซิไดซ์ ได้ค่าประมาณ 1.49 มิลลิโมลาร์ และค่า  $V_{max}$  0.623 มิลลิโมลต่อวินาที

5. จากการศึกษาความสามารถของแลคเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในการฟอกจางสีสังเคราะห์ในกลุ่ม triphenyl methane ได้แก่ บลอมฟีนอลบลู, คริสตัลไวโอเล็ต, ฟีนอลเรด และ ฟุชชีน สีสังเคราะห์ในกลุ่ม anthraquinone ได้แก่ indigo และสีสังเคราะห์ในกลุ่ม azo ได้แก่ methyl orange พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณแลคเคสความสามารถในการฟอกจางสีก็เพิ่มขึ้นตามไปด้วย และเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการบ่มนานขึ้น ความสามารถในการฟอกจางสีก็เพิ่มขึ้นตามไปด้วย และความสามารถในการฟอกจางสีสังเคราะห์มีค่าสูงในช่วงระยะเวลาแรกๆของการบ่ม ซึ่งอัตราการฟอกจางสีเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการบ่ม นอกจากนี้ สีสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นต่ำๆ แลคเคสสามารถฟอกจางสีสังเคราะห์ได้มาก และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสีสังเคราะห์เพิ่มขึ้นความสามารถในการฟอกจางสีมีค่าลดลงไปตามความเข้มข้นที่มาก

#### 4.2 ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองพบว่าเอนไซม์แลคเคสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีศักยภาพในการนำมาฟอกจางสีสังเคราะห์ งานที่นจะทำต่อไปจะเป็นการหาวิธีการนำเอนไซม์มาประยุกต์ใช้ในระดับขยายส่วน และมีการเตรียมรูปแบบของเอนไซม์ให้เหมาะสมกับการใช้งาน เช่น การตรึงเอนไซม์

## เอกสารอ้างอิง

1. สมาคมวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมแห่งประเทศไทย. คู่มือการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานทอผ้าและฟอกย้อม. 2544. 129 หน้า.
2. Avtonomova AV, Krasnopol LM, Maksimov VN. Optimization of nutrient medium for submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.)P.Karst. Microbiology. 2006; 75(2): 148-153.
3. Baldrian P. Fungal laccase-occurrence and properties. FEMS Microbiology Review. 2006; 30: 215-242.
4. Baldrian P, Gabriel. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. FEMS Microbiology Letters. 2002; 206: 69-74.
5. Buswell JA, Cai YJ, Chang ST, Peberdy JF, Fu SY, Yu HS. Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 1996; 12: 537-542.
6. Cavallazzi JP, Kasuya CM, Soares MA. Screening of inducers for laccase production by *Lentinula edodes* in liquid medium. Brazilian Journal of Microbiology. 2005; 36: 383-387.
7. Cavallazzi RP, Brito MS, Oliveira MGA, Villas-Boas SG, Kasuya MCM. Lignocellulolytic enzymes of three *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler strains during cultivation on eucalyptus bark-based medium. Food, Agriculture and Environment. 2004; 2(1): 291-297.
8. Chen S, Ge W, Buswell JA. Biochemical and molecular characterization of a laccase from the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. European Journal of biochemistry. 2004. Impress.
9. Chen S, Ma D, Ge W, Buswell JA. Induction of laccase activity in the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. FEMS Microbiology Letters. 2003; 218: 143-148.
10. Collins PJ, Dobson ADW. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. Applied and Environmental Microbiology. 1997; 63: 3444-3450.
11. D'Annibale A, Celletti D, Felici M, DiMattia E, Giovannozzi-Sermanni G. Substrate specificity of laccase from *Lentinus edodes*. Acta Biotechnology. 1996; 16: 257-270.
12. Dong JL, Zhang YZ. Purification and characterization of two laccase isoenzymes from a lignolytic fungus *Trametes gallica*. Prep Biochem Biotechnol. 2004; 34: 179-194.

13. Eggert C, Temp U, Eriksson K-EL. The lignolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. Applied and Environmental Microbiology. 1996; 62: 1151-1158.
14. Giardina P, Cannio R, Martirani L, Marzullo L, Palmieri G, Sannia G. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degradating basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology. 1995; 61: 2408-2413.
15. Grabski AC, Grimek HJ, Burgess RR. Immobilization of manganese peroxidase from *Lentinula edodes* and its biocatalytic generation of Mn<sup>III</sup>-Chelate as a chemical oxidant of chlorophenols. Biotechnology and Bioengineering 1998; 60(2): 204-215.
16. Gracia TA, Santiago MF, Ulhoa CJ. Studies on the *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 laccase purified by hydrophobic interaction chromatography. Applied and Microbial Biotechnology. 2007; 75: 311-318.
17. Hassegawa RH, Kasuya MCM, Vanetti MCD. Growth and antibacterial activity of *Lentinula edodes* in liquid media supplemented with agricultural wastes. Electronic Journal of Biotechnology. 2005; 8(2): 212-217.
18. Hatakka A. Biodegradation of lignin. In: Hofrichter M, Steinbuchel A (eds) Biopolymers. Wiley-VCH, Weinheim. 2001: 129-180.
19. Hatvani N, Mecs I. Production of laccase and manganese peroxidase by *Lentinula edodes* on malt-containing by-product of the brewing process. Process Biochemistry. 2001; 37: 491-496.
20. Hatvani N, Mecs I. Effect of nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinula edodes* on solid medium. Enzyme and Microbial Technology. 2002; 30: 381-386.
21. Hatvani N, Mecs I. Effect of certain heavy metals on the growth, dye decolorization, and enzyme activity of *Lentinula edodes*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2003; 55: 199-203.
22. Hilden KS, Makela MR, Hakala TK, Hatakka A, Lundell T. Expression on wood, molecular cloning and characterization of three lignin peroxidase (LiP) encoding genes of the white rot fungus *Phlebia radiata*. Curr Genet. 2006; 49: 97-105.
23. Heinzkill M, Bech L, Halkier T, Schneider P, Anke T. Characterization of laccase and peroxidase from wood-rotting fungi (family *Coprinaceae*). Applied and Environmental Microbiology 1999; 63: 1223-1227.

24. Kilaru S, Hoegger PJ, Kues U. The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. Curr Genet. 2006; 50: 45-60.
25. Kofujita H, Ohta T, Asada Y, Kuwahara M. Purification of synthetic textile dyes by *Phlebia tremellosa*. FEMS Microbiol Lett. 1991. 37: 562-569.
26. Leatham GF. The ligninolytic activities of *Lentinus edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. Applied Microbiology and Biotechnology 1986; 24: 51-58.
27. Lobanok AG, Babitskaya VG, Plenina LV, Puchkova TA, Osadchaya OV. Composition and biological activity of submerged mycelium of the xylotrophic basidiomycete *Lentinus edodes*. Applied Biochemistry and Microbiology. 2003; 39(1): 60-64.
28. Makela MR, Hilden KS, Hakala TK, Hatakka A, Lundell TK. Expression and molecular properties of a new laccase of the white rot fungus *Phlebia radiata* grown on wood. Curr Genet. 2006; 50: 323-333.
29. Makkar RS, Tsuneda A, Tokuyasu K, Mori Y. *Lentinula edodes* produces a multicomponent protein complex containing manganese (II)-dependent peroxidase, laccase and beta-glucosidase. FEMS Microbiology Letters. 2001; 200: 175-179.
30. Mansur M, Suarez T, Fernandez-Larrea JB, Brizuela MA, Gozalez AE. Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. Applied and Environmental Microbiology. 1997; 63: 2637-2646.
31. Mata G, Savoie JM. Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. World Journal of Microbiology and biotechnology. 1998; 14: 513-519.
32. Mayer AM, Staples RC. Laccase: new functions for an old enzyme. Phytochemistry. 2002; 60: 551-565.
33. Motson E, Verachtert H. Growth of higher fungi on wheat straw and their impact on the digestibility of substrate. Applied Microbiology and Biotechnology. 1991; 53: 421-424.
34. Murugesan K, Arulmani M, Nam In-Hyun, Kim YM, Chang YS, Kalaichelvan. Purification and characterization of laccase produced by a white rot fungus *Pleurotus sajor-caju* under submerged culture condition and its potential in decolorization of azo dyes. Applied microbiology and Biotechnology. 2006; 72: 939-946.

35. Nigam P, Armour G, Banat IM, Singh D, Merchant R. Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues. Bioresources Technology. 2000; 72: 219-226.
36. Ohga S, Royse DJ. Transcriptional regulation of laccase genes during growth and fruiting of *Lentinula edodes* on supplemented sawdust. FEMS Microbiology Letter 2001; 201: 111-115.
37. Okeke BC, Paterson A, Smith JE, Watson-Craik IA. The relationship between phenol oxidase activity, soluble protein and ergosterol with growth of *Lentinus* species in oak sawdust logs. Applied Microbiology and Biotechnology 1994; 41: 28-31.
38. Palmieri G, Giardin P, Bianco C, Fontanella B, Sannia G. Copper induction of laccase Isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology. 2000; 66(3): 920-924.
39. Perez J, Jefferies TW. Mineralization of <sup>14</sup>C-ring-labeled synthetic lignin correlates with the production of lignin peroxidase, not of manganese peroxidase or laccase. Applied and Environmental Microbiology 1990; 56: 1806-1812.
40. Pointing SB, Jones EBG, Vrijmoed LLP. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. Mycologia. 2000; 92: 139-144.
41. Robinson T, Chandran B, Nigam P. Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolourisation of textile dyes. Enzyme and Microbial Technology. 2001; 29: 575-579.
42. Robinson T, McMullan G, Marchant R, Nigam P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposal alternative. Bioresources Technology. 2001; 77: 247-255.
43. Robles A, Lucas R, Martinez-Canamero M, Omar NB, Perez R, Galvez A. Characterization of laccase activity produced by the hyphomycete *Chalara* (Syn. *Thielavopsis*) *paradoxa* CH32. Enzyme and Microbial Technology. 2002; 31: 516-522.
44. Schlosser D, Grey R, Fritsche W. Patterns of lignolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. Applied Microbiology and Biotechnology 1997; 47: 412-418.

45. Smith M, Shnyreva A, Wood DA, Thurston CF. Tandem organization and highly disparate expression of the two laccase genes *lcc1* and *lcc2* in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. Microbiology. 1998; 144: 1063-1069.
46. Soden DM, Callaghan JO, Dobson ADW. Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. Mycobiology. 2002; 148: 4003-4014.
47. Soden DM, Dobson ADW. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju* Mycobiology. 2002; 148: 4003-4014.
48. Teerapatsakul C, Parra R, Bucke C, Chitradon. Improvement of laccase production from *Ganoderma* sp. KU-AIK4 by medium engineering. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Impress.
49. Tetsch L, Bend J, Holker U. Molecular and enzymatic characterisation of extra- and intracellular laccases from the acidophilic ascomycete *Hortaea acidophila*. Antonie van Leeuwenhoek. 2006; 90: 183-194.
50. Thurston CF. The structure and function of fungus laccases. Microbiology. 1994; 140: 19-26.
51. Tinoco R, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R. Kinetic differences of purified laccase from six *Pleurotus ostreatus* strains. Letters in Applied Microbiology. 2001; 32: 331-335.
52. Tsvileva OM, Pankratov AN, Nikitina VE, Garibova LV. Relationship between the molecular structure of the nitrogen source and the activity of the extracellular lectin of *Lentinus edodes* (Berk.)Sing [*Lentinula edodes* (Berk.)Pegler] upon submerged cultivation. Microbiology. 2004; 73(4): 410-413.
53. Vares T, Kalsi M, Hatakka A. Lignin peroxidases, manganese peroxidases and other ligninolytic enzymes produced by *Phledia radiata* during solid-state fermentation of wheat straw. Applied and Environmental Microbiology 1995; 61: 3515-3520.
54. Xing ZT, Cheng JH, Tan Q, Pan YJ. Effect of nutritional parameters on laccase production by the culinary and medicinal mushroom, *Grifola frondosa*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2006; 22: 1215-1221.
55. Yaver DS, Golightly EJ. Cloning and characterization of three laccase genes from the white-rot basidiomycete *Trametes villosa*: genomic organization of the laccase gene family. Gene. 1996; 181: 95-102.

56. Yaver DS, Xu F, Golightly EJ, Brown KM, Brown SH, Rey MW, Schneider P, Halkier T, Mondorf K, Dolboge H. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Tranetes villosa*. Applied and Environmental Microbiology. 1996; 62: 834-841.
57. Zeng GM, Yu HY, Huang HL, Huang DL, Chen YN, Huang GH, Li JB. Laccase activities of a soil fungus *Penicillium simplicissimum* in relation to lignin degradation. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2006. Impress.
58. Zho J, Kwan HS. Characterization molecular cloning and differential expression analysis of laccase genes from the edible mushroom *Lentinus edodes*. Applied and Environmental Microbiology 2000; 66: 2531-2533.

ภาคผนวก

**To be submitted to**  
**Applied Biochemistry and Microbiology**

**Purification and characterization of laccase from thermo-tolerance shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) and decolorization of chemically different dyes**

**ABSTRACT**

Extracellular laccases in cultures of thermo-tolerance shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) grown in liquid culture on a potato dextrose broth was purified using ammonium sulphate precipitation, anion exchange chromatography on DEAE and gel filtration chromatography on Sephadex G-100. The enzyme was purified up to 28.33-fold from the initial protein preparation with an overall yield of 41.28%. The optimum pH for enzyme activity was around 5.0, and it was most active at 40 °C. The enzyme oxidized 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid; ABTS) diazodium salt, syringaldazine, 2,6-dimethoxyphenol, guaiacol and pyrogallol, but not veratryl alcohol and tyrosine. The enzymatic characteristics  $K_m$  and  $V_{max}$  have been determined using ABTS, syringaldazine and 2,6-dimethoxyphenol as the substrate were 0.719 mM/0.557 mmol/min, 1.85 mM/1.268 mmol/min and 1.49 mM/0.623 mmol/min respectively. The effects of metal ions and inhibitors on laccase activity were tested by using ABTS as the substrate. The enzyme was inhibited by  $CoCl_2$  and  $BaCl_2$ . In contrast, 1mM  $CuCl_2$  activated purified laccase by 77%. Purified laccase was effective in the decolorization of chemically different dyes-bromophenol blue, crystal violet, phenol red, fusicin, indigo and methyl orange-without any mediators.

**Key words:** Laccase, Shiitake mushroom, *Lentinula edodes*, Purification, Characterization

## INTRODUCTION

*Lentinula edodes*, commonly known variously as the black oak mushroom, shiitake or shiang-gu, is a gilled mushroom in Class Basidiomycetes, Family Tricholomataceae, and Order Agaricales. It was first cultivated in China more than 800 years ago (Chang and Miles, 1987). Shiitake mushroom produces low calories, sodium, fat and cholesterol, while rich in protein, carbohydrate, fiber, vitamins and minerals. Mushroom extracted can stimulate the immune system, lower blood pressure and cholesterol including resistance to AIDS, etc (Kues and Liu, 2000). Shiitake mushroom is mainly grown on natural of *Quercus* spp. and its productivity depends on the quality of sawdust used as the substrate. During growth and fruiting of this fungus extracellular amylolytic and lignocellulolytic enzymes were produced. The amylases are extracellular enzymes and available for digestion of starch as a carbon source for metabolism in order to provide soluble hydrolysis. This mushroom has been shown to secrete a wide range of cellulases complex namely cellobiohydrolase, carboxymethylcellulase, beta-glucosidase and the hemicellulases, xylanase, beta-xylosidase (Leatham, 1985; Adsawasoonnet, 1991; Buswell, 1996). This mushroom also secretes the ligninases, laccase, manganese peroxidase (Grabski et al., 1995), of which laccase is the most abundant (Cullen et al., 1997; D'Annibale et al., 1996). Laccase are ligninolytic enzymes (Evans et al., 1994), but they find applications in biosensors, pulping, textile dyes, detoxification of polluted water and other biotechnological procedures (Palmieri et al., 1993; Brenna and Bianchi 1994; Reid and Paice, 1994; Ghindilis et al., 1995; Martirani et al., 1996). Large amounts of chemically different dyes are used for various industrial applications such as textile dyeing, and a significant proportion of these dyes enter the environment in wastewater. Sequenced anaerobic/aerobic digestion and other

biological processes have been proposed as having potential in the treatment of textile wastewater (Banat et al., 1996). Kirby et al (2000) reported that *Phlebia tremellosa* decolorized eight synthetic textile dyes added to the culture under stationary incubation conditions. In Thailand, Panyamee et al (2005) develop new thermo-tolerance hybrids strains of *L. edodes*, which produced high yields and aroma content from original parent, obtained from foreign imported and commercial with the local wild type strains. These fungus produce various enzymes with industrial applications. Among the enzymes produced by this mushroom, laccase is of particular interest because of its effectiveness in numerous biotechnological applications. Preparations of this fungus have exhibited strong laccase activity with no lignin peroxidase and weak manganese peroxidase (MnP) activities. However, there are no reports on decolorization or biodegradation of phenolic compounds by purified laccase from thermo-tolerance shiitake mushroom. Due to its ready availability as an edible mushroom, using purified laccase by this fungus has clear advantages for environmental bioremediation: the enzyme produced by this mushroom is safe for humans and the waste culture after harvesting the mushroom can be used as a source of the enzyme. In this paper, we deal with the isolation and characterization of laccase from thermo-tolerance shiitake mushroom, and the utilization of the purified enzyme for decolorization of dyes.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Chemicals**

ABTS, Potato dextrose agar (PDA), Potato dextrose broth (PDB) were from Sigma Chemical Company (U.S.A). Syringaldazine, 2,6-Dimethoxyphenol and Guaiacol were from Fluka (Switzerland). The chemicals used in the purification step were from

Pharmacia biotech (Sweden) and Fluka (Switzerland). All other chemicals used in these investigations were either from Himedia laboratory Ltd or from Merck (India) Ltd.

### **Microorganism and culture conditions**

Thermo-tolerance shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) (KMUH1) was used throughout this study. Mycelia were maintained on PDA. For production of laccase, PDB was used. As inoculums, mycelium blocks (1 cm diameter) were cut from a PDA plate culture. One block was placed in a 250 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml PDB medium, and incubated at 32 °C under stationary culture condition for 40 days. The mycelium was removed from the supernatant by centrifugation at 8,000 rpm 4 °C (Beckman Instruments, Inc., California, USA) for 10 min. The supernatant was used as a crude enzyme solution to be purified in the further experiments.

### **Enzyme assay and protein determination**

To determine the laccase activity, ABTS was used as the substrate (Modified from Munoz et al., 1997). The reaction mixture for the standard assay contained 0.02M ABTS (0.2 M acetate buffer pH 5.2), and the enzyme solution in a total volume of 100  $\mu$ l. After incubation at 37 °C for 2 min, the reaction mixture was detected by measuring the absorbance increase at 436 nm ( $\epsilon_{436} = 29.3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). One unit of laccase activity was defined as the amount of enzyme that catalyzed the oxidation of 1  $\mu$ mole ABTS in reaction mixture at 37 °C in 1 min. Protein concentration was measured with Lowry assay using bovine serum albumin (BSA, Sigma) as the standard.

### **Purification of laccase**

The culture supernatant was fractionated with saturated ammonium sulphate in order to remove unwanted proteins (Modified from Fukushima and Kirk (1995). The culture liquid was concentrated with ultra membrane filtration MW cut off 30 KDa.

Crude laccase was loaded onto anion exchange column (DEAE-Sephadex A-50) that has been equilibrated with sodium acetate buffer (0.1M, pH 5.0). Unbound proteins were washed out with sodium acetate buffer (0.1M, pH 5.0) and the bound proteins were eluted using sodium acetate buffer (0.05M, pH 5.0) with a linear gradient of NaCl (0-1M). Ten milliliters of fractions were collected. The protein content of each fraction was determined by measuring the absorbance at 280 nm. Laccase activity of each fraction was determined as described earlier. Laccase rich fractions were pooled together, concentrated and used for further purification on Sephadex G-100 column. Proteins were eluted with the same buffer and 10 ml fractions were collected and again the laccase rich fractions were pooled, concentrated, filtered through 0.22  $\mu$ m sterile membranes and stored at -20  $^{\circ}$ C, until further use.

#### **Effect of pH and temperature on laccase activity and stability**

The effect of pH on laccase activity was examined in the pH range 2.0-11.0 (0.1M acetate buffer was used at pH values from 2.0-6.0, 0.1M phosphate buffer was used from 7.0-11.0) using ABTS as the substrate. The effect of temperature on the enzyme activity was determined at pH 5.0. The reactions were performed by incubating at each temperature and pH 5.0 for 10 min. The effect of pH on the enzyme stability was investigated by measurement of the activity remaining after incubation for 16 h at 37  $^{\circ}$ C in various buffer. The thermal stability of laccase was investigated in 0.1M acetate buffer pH 5.0 for 60 min at various temperatures. After incubation, the activity remaining was determined.

#### **Substrate specificity**

Spectrophotometric measurement of substrate oxidation by purified laccase was carried out in a 1 ml reaction mixture containing the test substrate 0.02M in 0.1M

acetate buffer pH 5.0. The reactions were conducted at 37 °C for 10 min. The rates of substrate oxidation were determined by measuring the absorbance increase, and the molar extinction coefficients were obtained from the literature (Eggert et al., 1996; Shin and Lee, 2000). Michaelis constants ( $K_m$ ) and  $V_{max}$  were calculated from Lineweaver-Burk plots (Lineweaver-Burk, 1934).

### **Dye decolorization by laccase**

The decolorization of chemically different dyes by purified laccase was determined over 24 h periods. The reaction mixture for the standard assay contained 60 mg/l dye, 0.1M acetate buffer pH 5.0 and enzyme solution (0.2-1.0 U/ml, final concentration) in a total volume of 3 ml. During incubation at 37 °C, the time course of decolorization was determined every 4 h by measuring the absorbance of 592 nm for bromophenol blue, 490 nm for crystal violet, 431 nm for phenol red, 530 nm for fuchin, 580 nm for indigo and 466 methyl orange.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Purification of laccase**

The purification chart for the purification of the laccase from the liquid culture filtrate of thermo-tolerance shiitake mushroom is shown in Table 1. The method gave 28.33-fold purification with 41.28% recovery of the enzyme activity. The elution profile of the laccase activity from Sephadex G-100 column is shown in Fig. 1. The result of SDS-PAGE (data not shown) shows that the enzyme preparation is pure and the determined relative molecular weight is 60 kDa. The relative molecular masses of the laccase purified from the culture filtrate of *Ganoderma lucidum*, *Chaetomium thermophilum*, *Neurospora crassa*, and *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* are 68

Kda, 77 kDa, 64.8 kDa and 60 kDa, respectively. It is worth mentioning that Nagai et al (2002) have also reported laccase from a different strain of *Lentinula edodes* but the molecular weight of the laccase reported by them is 72.2 kDa. The difference in the molecular weight of the two laccases from the same species may be due to different strains.

### **Effects of pH and temperature on enzyme activity and stability**

The pH profile for laccase activity against ABTS showed one peak of maximum activity at pH 5.0 (Fig. 2.). When the effect of pH on enzyme stability was determined at 37 °C, the enzyme was stable at a pH range from 3.0-6.0 (Fig. 3.). The optimum temperature of laccase was determined at pH 5.0; the maximum activity was observed at 40 °C (Fig. 4.) The thermal stability of laccase was determined by incubating the enzyme at pH 5.0 (laccase was stable at 37 °C for 16 h at this pH) for 30 min. There was no loss of laccase activity after incubating at 30 °C, but incubating the enzyme at 40 °C resulted in a 16% loss of laccase activity. Thus, we concluded that laccase is stable up to 30 °C (Fig. 5.). Such differences have been observed by several authors and ascribed to variable degree of substrate protonation under different pH conditions (D'Annibale et al., 1996; Fukushima and Kirk, 1995).

### **Substrate specificity**

Substrate specificity was determined at the optimum pH for each substrate. As shown in Table 2, the conventional substrates of laccase, such as ABTS, syringaldazine, 2,6-dimethoxyphenol, guaiacol, and pyrogallol, were oxidized by laccase. Tyrosine, and verathyl alcohol, the standard substrates for tyrosinase, and arylalcohol oxidase, were not oxidized. The double reciprocal plot using ABTS, syringaldazine and 2,6-dimethoxyphenol as the variable substrate were done. The calculated Km values for the

above substrate were 0.719 mM, 1.85 mM and 1.49 mM respectively.

### **Effects of metal ions and inhibitors**

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 Cystein (99.8% inhibition), 0.1 mM Cystein (99.5% inhibition), 1 mM  $\text{NaN}_3$  (99.5% inhibition) and 0.1 mM  $\text{NaN}_3$  (97% inhibition), whereas EDTA had only a slight activated effect. In contrast, 1 mM  $\text{CuCl}_2$  activated laccase by 77% (Table 3). When the effect of metal ions on enzyme activity was tested, 1 mM  $\text{CuCl}_2$  activated laccase activity. Some fungal *lac* have been reported to show type-2 binuclear copper signal besides type-1 copper (Reinhammar, 1984). Call and Mucke (1997) reported that removal of type-2 copper reduced the residual activity of the intact enzyme to 5% and that reconstitution is achieved by incubation with  $\text{CuCl}_2$  under aerobic conditions. Considering these facts, the activation of *lac* by  $\text{Cu}^{2+}$  may be due to the filling of type-2 copper binding sites with copper ions.

### **Decolorization of dyes**

The optimum pH for the decolorization of most dyes was 4.0 but the optimum pH for oxidation of ABTS was 5.0. Therefore, the reactions for each dye were performed at pH 5.0. Laccase rapidly decolorized three type dyes, triphenyl methane dyes (bromphenol blue, crystal violet, phenol red and fusicin), anthraquinone dye (indigo) and azo dye (methyl orange), depending on laccase concentration without any mediators (Fig. 6.). Field et al (1992) showed a correlation between anthracene and benzo a pyrene biodegradation and poly R-478 decolorization. Considering these reports, *lac* may have the capacity to degrade triphenyl methane, anthraquinone and azo dyes.

## CONCLUSION

This research successfully purified laccase from *Lentinula edodes* thermo-tolerance hybrid by ion-exchange chromatography combined with gel filtration techniques. After final purification step, the enzyme was purified 28.33 fold with an increase in specific activity from 1.79 to 50.71 U/mg proteins. The properties of the purified enzyme indicated that this purified laccase enzyme functioned as acidic pH. This enzyme was strongly inhibited by 0.1 and 1.0 mM cystein and 1 mM NaN<sub>3</sub>. This study confirms that ability of purified laccase of *L. edodes* in decolorizing different groups of dyes and suggests that this enzyme could be used for the decolorization of industrial effluents.

## ACKNOWLEDGMENT

This research was partially funded by Thailand Research Fund and Commission on Higher Education under the grant # MRG5180295. The authors gratefully acknowledged a support of instruments from Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University, Division of Biotechnology, Division of Food Science and Technology, Faculty of Agro-Industrial Technology, Rajamangala University of Technology Isan, Kalasin Campus, Kalasin, Thailand.

## REFERENCES

- Adsawasoontonnet J, Panichajakul P, Triratana, S. External carbon source for development and fruiting of *Lentinula edodes* (Shiitake) in liquid media. Microbial Utilization of Renewable Resource. 1991; 8: 617-626.

- Avtonomova AV, Krasnopol LM, Maksimov VN. Optimization of nutrient medium for submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.)P.Karst. Microbiology. 2006; 75(2): 148-153.
- Baldrian P. Fungal laccase-occurrence and properties. FEMS Microbiology Review. 2006; 30: 215-242.
- Baldrian P, Gabriel. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. FEMS Microbiology Letters. 2002; 206: 69-74.
- Buswell JA, Cai YJ, Chang ST, Peberdy JF, Fu SY, Yu HS. Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 1996; 12: 537-542.
- Cavallazzi JP, Kasuya CM, Soares MA. Screening of inducers for laccase production by *Lentinula edodes* in liquid medium. Brazilian Journal of Microbiology. 2005; 36: 383-387.
- Cavallazzi RP, Brito MS, Oliveira MGA, Villas-Boas SG, Kasuya MCM. Lignocellulolytic enzymes of three *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler strains during cultivation on eucalyptus bark-based medium. Food, Agriculture and Environment. 2004; 2(1): 291-297.
- Chen S, Ge W, Buswell JA. Biochemical and molecular characterization of a laccase from the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. European Journal of biochemistry. 2004. Impress.
- Chen S, Ma D, Ge W, Buswell JA. Induction of laccase activity in the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. FEMS Microbiology Letters. 2003; 218: 143-148.

- Collins PJ, Dobson ADW. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. Applied and Environmental Microbiology. 1997; 63: 3444-3450.
- D'Annibale A, Celletti D, Felici M, DiMattia E, Giovannozzi-Sermanni G. Substrate specificity of laccase from *Lentinus edodes*. Acta Biotechnology. 1996; 16: 257-270.
- Dong JL, Zhang YZ. Purification and characterization of two laccase isoenzymes from a lignolytic fungus *Trametes gallica*. Prep Biochem Biotechnol. 2004; 34: 179-194.
- Eggert C, Temp U, Eriksson K-EL. The lignolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. Applied and Environmental Microbiology. 1996; 62: 1151-1158.
- Giardina P, Cannio R, Martirani L, Marzullo L, Palmieri G, Sannia G. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degradating basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology. 1995; 61: 2408-2413.
- Grabski AC, Grimek HJ, Burgess RR. Immobilization of manganese peroxidase from *Lentinula edodes* and its biocatalytic generation of Mn<sup>III</sup>-Chelate as a chemical oxidant of chlorophenols. Biotechnology and Bioengineering 1998; 60(2): 204-215.
- Gracia TA, Santiago MF, Ulhoa CJ. Studies on the *Pycnoporus sanguineus* CCT-4518 laccase purified by hydrophobic interaction chromatography. Applied and Microbial Biotechnology. 2007; 75: 311-318.

- Hassegawa RH, Kasuya MCM, Vanetti MCD. Growth and antibacterial activity of *Lentinula edodes* in liquid media supplemented with agricultural wastes. Electronic Journal of Biotechnology. 2005; 8(2): 212-217.
- Hatakka A. Biodegradation of lignin. In: Hofrichter M, Steinbuchel A (eds) *Biopolymers*. Wiley-VCH, Weinheim. 2001: 129-180.
- Hatvani N, Mecs I. Production of laccase and manganese peroxidase by *Lentinula edodes* on malt-containing by-product of the brewing process. Process Biochemistry. 2001; 37: 491-496.
- Hatvani N, Mecs I. Effect of nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinula edodes* on solid medium. Enzyme and Microbial Technology. 2002; 30: 381-386.
- Hatvani N, Mecs I. Effect of certain heavy metals on the growth, dye decolorization, and enzyme activity of *Lentinula edodes*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2003; 55: 199-203.
- Hilden KS, Makela MR, Hakala TK, Hatakka A, Lundell T. Expression on wood, molecular cloning and characterization of three lignin peroxidase (LiP) encoding genes of the white rot fungus *Phlebia radiata*. Curr Genet. 2006; 49: 97-105.
- Heinzkill M, Bech L, Halkier T, Schneider P, Anke T. Characterization of laccase and peroxidase from wood-rotting fungi (family *Coprinaceae*). Applied and Environmental Microbiology 1999; 63: 1223-1227.
- Kilaru S, Hoegger PJ, Kues U. The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. Curr Genet. 2006; 50: 45-60.

- Kofujita H, Ohta T, Asada Y, Kuwahara M. Purification of synthetic textile dyes by *Phlebia tremellosa*. FEMS Microbiol Lett. 1991. 37: 562-569.
- Leatham GF. The ligninolytic activities of *Lentinus edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. Applied Microbiology and Biotechnology 1986; 24: 51-58.
- Lobanok AG, Babitskaya VG, Plenina LV, Puchkova TA, Osadchaya OV. Composition and biological activity of submerged mycelium of the xylotrophic basidiomycete *Lentinus edodes*. Applied Biochemistry and Microbiology. 2003; 39(1): 60-64.
- Makela MR, Hilden KS, Hakala TK, Hatakka A, Lundell TK. Expression and molecular properties of a new laccase of the white rot fungus *Phlebia radiata* grown on wood. Curr Genet. 2006; 50: 323-333.
- Makkar RS, Tsuneda A, Tokuyasu K, Mori Y. *Lentinula edodes* produces a multicomponent protein complex containing manganese (II)-dependent peroxidase, laccase and beta-glucosidase. FEMS Microbiology Letters. 2001; 200: 175-179.
- Mansur M, Suarez T, Fernandez-Larrea JB, Brizuela MA, Gozalez AE. Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading basidiomycete CECT 20197. Applied and Environmental Microbiology. 1997; 63: 2637-2646.
- Mata G, Savoie JM. Extracellular enzyme activities in six *Lentinula edodes* strains during cultivation in wheat straw. World Journal of Microbiology and biotechnology. 1998; 14: 513-519.
- Mayer AM, Staples RC. Laccase: new functions for an old enzyme. Phytochemistry. 2002; 60: 551-565.

- Motson E, Verachtert H. Growth of higher fungi on wheat straw and their impact on the digestibility of substrate. Applied Microbiology and Biotechnology. 1991; 53: 421-424.
- Murugesan K, Arulmani M, Nam In-Hyun, Kim YM, Chang YS, Kalaichelvan. Purification and characterization of laccase produced by a white rot fungus *Pleurotus sajor-caju* under submerged culture condition and its potential in decolorization of azo dyes. Applied microbiology and Biotechnology. 2006; 72: 939-946.
- Nigam P, Armour G, Banat IM, Singh D, Merchant R. Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues. Bioresources Technology. 2000; 72: 219-226.
- Ohga S, Royse DJ. Transcriptional regulation of laccase genes during growth and fruiting of *Lentinula edodes* on supplemented sawdust. FEMS Microbiology Letter 2001; 201: 111-115.
- Okeke BC, Paterson A, Smith JE, Watson-Craik IA. The relationship between phenol oxidase activity, soluble protein and ergosterol with growth of *Lentinus* species in oak sawdust logs. Applied Microbiology and Biotechnology 1994; 41: 28-31.
- Palmieri G, Giardin P, Bianco C, Fontanella B, Sannia G. Copper induction of laccase Isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. Applied and Environmental Microbiology. 2000; 66(3): 920-924.
- Panyamee P. Biochemical regulation in fruiting, aroma formation and breeding for new thermo-tolerance shiitake mushroom (*Lentinula edodes*). Graduate School Khon Kaen University. 2005. ISBN 974-666-734-3.

- Perez J, Jefferies TW. Mineralization of  $^{14}\text{C}$ -ring-labeled synthetic lignin correlates with the production of lignin peroxidase, not of manganese peroxidase or laccase. Applied and Environmental Microbiology 1990; 56: 1806-1812.
- Pointing SB, Jones EBG, Vrijmoed LLP. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. Mycologia. 2000; 92: 139-144.
- Robinson T, Chandran B, Nigam P. Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolourisation of textile dyes. Enzyme and Microbial Technology. 2001; 29: 575-579.
- Robinson T, McMullan G, Marchant R, Nigam P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposal alternative. Bioresources Technology. 2001; 77: 247-255.
- Robles A, Lucas R, Martinez-Canamero M, Omar NB, Perez R, Galvez A. Characterization of laccase activity produced by the hyphomycete *Chalara* (Syn. *Thielavopsis*) *paradoxa* CH32. Enzyme and Microbial Technology. 2002; 31: 516-522.
- Schlosser D, Grey R, Fritsche W. Patterns of lignolytic enzymes in *Trametes versicolor*: Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. Applied Microbiology and Biotechnology 1997; 47: 412-418.
- Smith M, Shnyreva A, Wood DA, Thurston CF. Tandem organization and highly disparate expression of the two laccase genes *lcc1* and *lcc2* in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. Microbiology. 1998; 144: 1063-1069.

- Soden DM, Callaghan JO, Dobson ADW. Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. Mycobiology. 2002; 148: 4003-4014.
- Soden DM, Dobson ADW. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju* Mycobiology. 2002; 148: 4003-4014.
- Teerapatsakul C, Parra R, Bucke C, Chitradon. Improvement of laccase production from *Ganoderma* sp. KU-ALK4 by medium engineering. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Impress.
- Tetsch L, Bend J, Holker U. Molecular and enzymatic characterisation of extra- and intracellular laccases from the acidophilic ascomycete *Hortaea acidophila*. Antonie van Leeuwenhoek. 2006; 90: 183-194.
- Thurston CF. The structure and function of fungus laccases. Microbiology. 1994; 140: 19-26.
- Tinoco R, Pickard MA, Vazquez-Duhalt R. Kinetic differences of purified laccase from six *Pleurotus ostreatus* strains. Letters in Applied Microbiology. 2001; 32: 331-335.
- Tsivileva OM, Pankratov AN, Nikitina VE, Garibova LV. Relationship between the molecular structure of the nitrogen source and the activity of the extracellular lectin of *Lentinus edodes* (Berk.)Sing [*Lentinula edodes* (Berk.)Pegler] upon submerged cultivation. Microbiology. 2004; 73(4): 410-413.
- Vares T, Kalsi M, Hatakka A. Lignin peroxidases, manganese peroxidases and other ligninolytic enzymes produced by *Phledia radiata* during solid-state fermentation of wheat straw. Applied and Environmental Microbiology 1995; 61: 3515-3520.

- Xing ZT, Cheng JH, Tan Q, Pan YJ. Effect of nutritional parameters on laccase production by the culinary and medicinal mushroom, *Grifola frondosa*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2006; 22: 1215-1221.
- Yaver DS, Golightly EJ. Cloning and characterization of three laccase genes from the white-rot basidiomycete *Trametes villosa*: genomic organization of the laccase gene family. Gene. 1996; 181: 95-102.
- Yaver DS, Xu F, Golightly EJ, Brown KM, Brown SH, Rey MW, Schneider P, Halkier T, Mondorf K, Dolboge H. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Tranetes villosa*. Applied and Environmental Microbiology. 1996; 62: 834-841.
- Zeng GM, Yu HY, Huang HL, Huang DL, Chen YN, Huang GH, Li JB. Laccase activities of a soil fungus *Penicillium simplicissimum* in relation to lignin degradation. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2006. Impress.
- Zho J, Kwan HS. Characterization molecular cloning and differential expression analysis of laccase genes from the edible mushroom *Lentinus edodes*. Applied and Environmental Microbiology 2000; 66: 2531-2533.

### Figure Captions

**Figure 1** Elution profile from sephadex G-100 column

**Figure 2** Effect of pH on enzyme activity of purified laccase of *Lentinula edodes*. The enzyme reaction was performed at 37 °C for 10 min.

**Figure 3** Effect of pH on enzyme stability of purified laccase of *Lentinula edodes*. The enzyme activity was measured after incubating at various pH at 37 °C for 16 hrs.

**Figure 4** Effect of temperature on enzyme activity of purified laccase of *Lentinula edodes*. The enzyme reaction was performed in 0.1M acetate buffer pH 5.0 for 10 min.

**Figure 5** Effect of temperature on enzyme stability of purified laccase of *Lentinula edodes*. Activity remaining was measured after incubating in 0.1M acetate buffer pH 5.0 at various temperatures for 30 min.

**Figure 6** Optimization of enzyme concentration for dyes decolorization by purified laccase.

**Table 1** Summary of the purification procedure for *Lentinula edodes* KMUH1

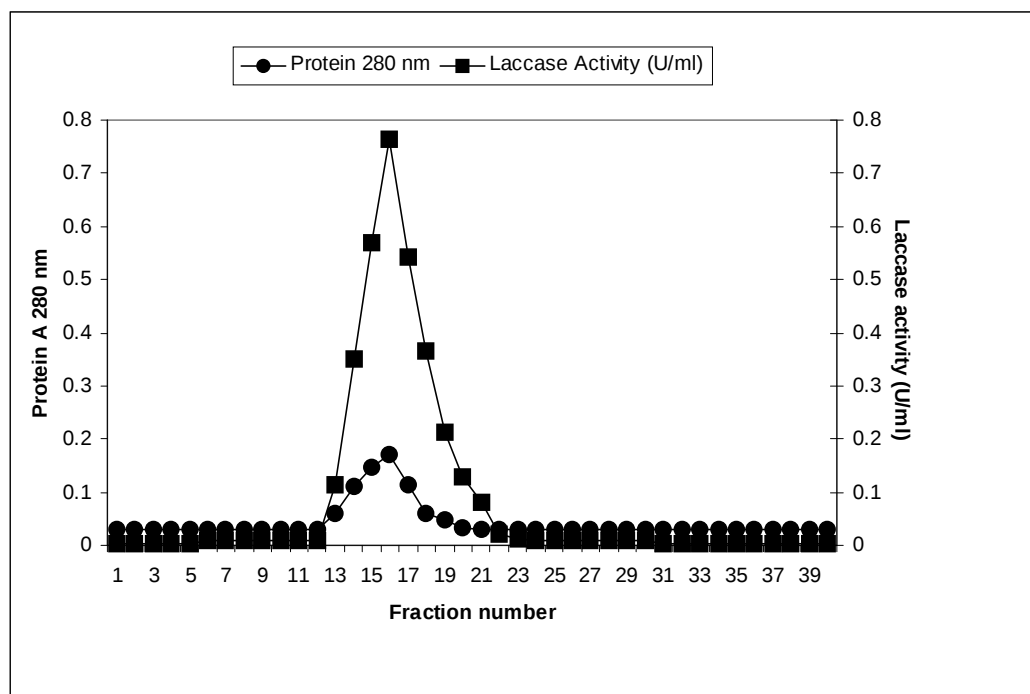
| Purification step                     | Volume (ml) | Activity (U/ml) | Protein (mg/ml) | Total activity (U) | Total protein (mg) | Specific activity (U/mg protein) | Purification fold | Yield (%) |
|---------------------------------------|-------------|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------|----------------------------------|-------------------|-----------|
| Crude culture filtrate                | 400         | 0.4299          | 0.240           | 171.96             | 96.00              | 1.79                             | 1.00              | 100       |
| Ammonium sulphate precipitation (80%) | 60          | 2.706           | 0.176           | 162.36             | 10.56              | 15.37                            | 8.59              | 94.42     |
| Ultra membrane filtration             | 30          | 4.389           | 0.154           | 131.67             | 4.62               | 28.50                            | 15.92             | 76.57     |
| DEAE-Sephadex                         | 20          | 5.267           | 0.132           | 105.34             | 2.64               | 39.90                            | 22.29             | 61.26     |
| Sephadex G-100                        | 12          | 5.916           | 0.117           | 70.99              | 1.40               | 50.71                            | 28.33             | 41.28     |

**Table 2** Substrate specificity of purified laccase *Lentinula edodes* KMUH1

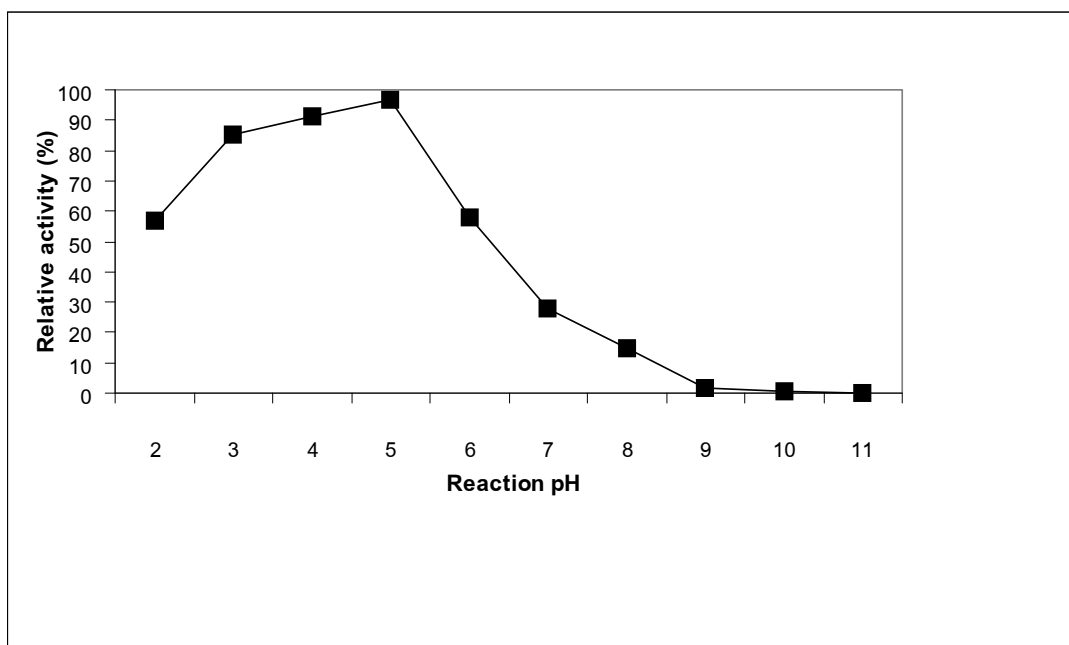
| Substrate           | Value from graph |       | Value from estimate |       |
|---------------------|------------------|-------|---------------------|-------|
|                     | Km               | Vmax  | Km                  | Vmax  |
| ABTS                | 0.719            | 0.557 | 0.746               | 0.578 |
| Syringaldazine      | 1.85             | 1.268 | 2.754               | 1.887 |
| 2,6-dimethoxyphenol | 1.49             | 0.623 | 1.515               | 0.633 |

**Table 3** Effects of metal ions and inhibitors on laccase activity

| <b>Metal ion salt<br/>(1 mM)</b> | <b>Relative activity<br/>(%)</b> | <b>Inhibitors</b>        | <b>Relative activity<br/>(%)</b> |
|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| None                             | 100                              | None                     | 100                              |
| BaCl <sub>2</sub>                | 96                               | NaN <sub>3</sub> 0.01 mM | 40                               |
| CaCl <sub>2</sub>                | 100                              | NaN <sub>3</sub> 0.02 mM | 29                               |
| CoCl <sub>2</sub>                | 73                               | NaN <sub>3</sub> 0.05 mM | 16                               |
| HgCl <sub>2</sub>                | 104                              | NaN <sub>3</sub> 0.1 mM  | 3                                |
| KCl                              | 100                              | NaN <sub>3</sub> 1 mM    | 0.5                              |
| MnCl <sub>2</sub>                | 102                              | EDTA 0.1 mM              | 111                              |
| NaCl                             | 102                              | EDTA 1 mM                | 109                              |
| SrCl <sub>2</sub>                | 101                              | EDTA 3 mM                | 106                              |
| ZnCl <sub>2</sub>                | 101                              | EDTA 5 mM                | 105                              |
| CuCl <sub>2</sub>                | 177                              | Cystein 0.01 mM          | 80                               |
|                                  |                                  | Cystein 0.02 mM          | 58                               |
|                                  |                                  | Cystein 0.05 mM          | 21                               |
|                                  |                                  | Cystein 0.1 mM           | 0.5                              |
|                                  |                                  | Cystein 1 mM             | 0.2                              |

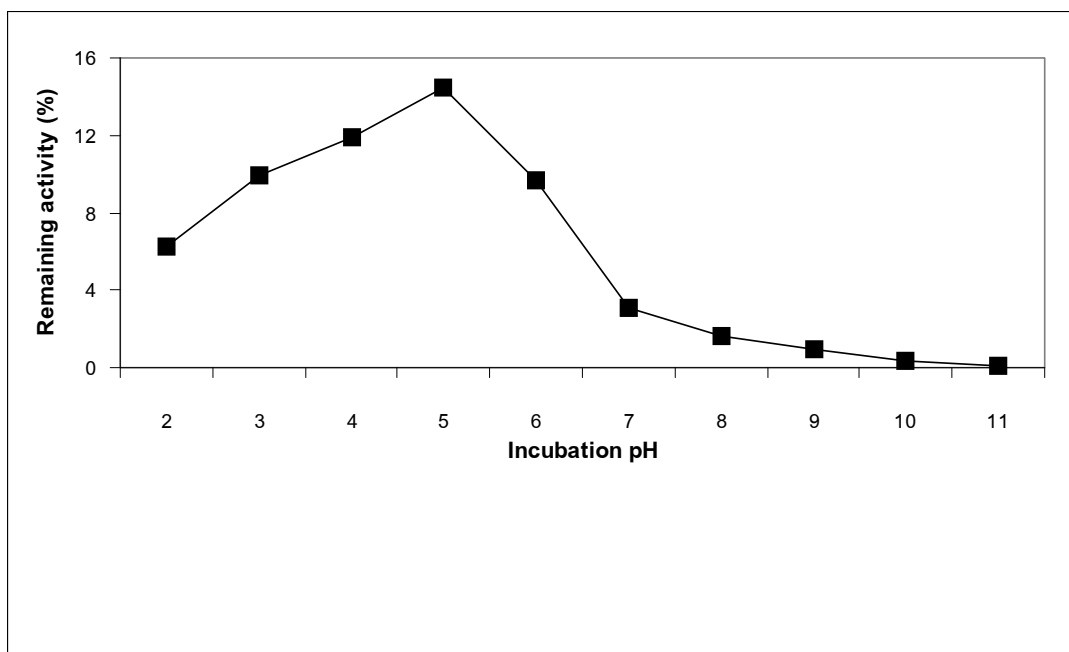


**Figure 1** Elution profile from sephadex G-100 column

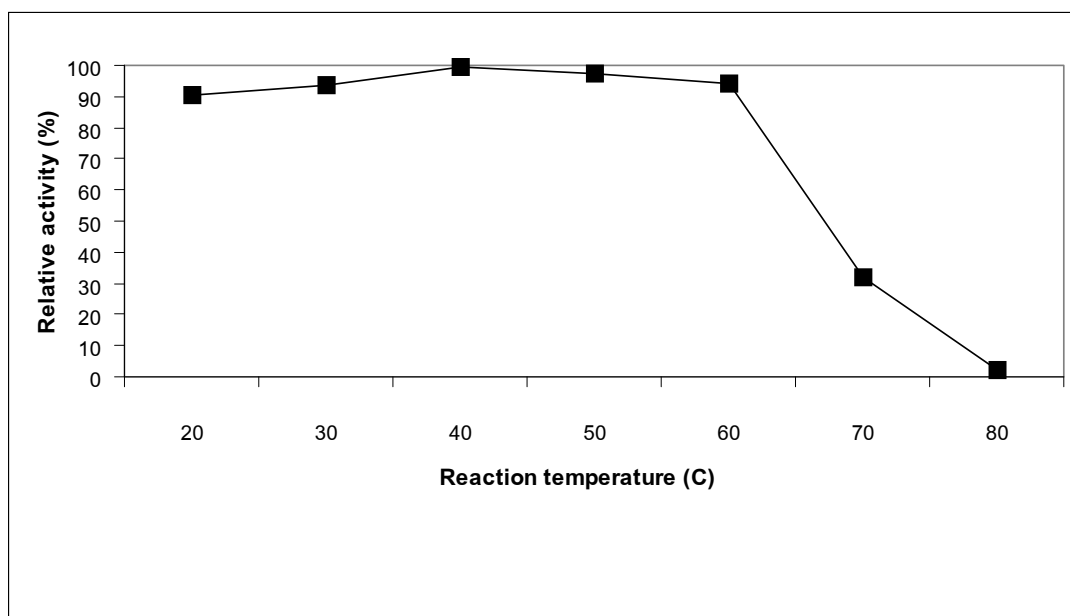


**Figure 2** Effect of pH on enzyme activity of purified laccase of *Lentinula edodes*.

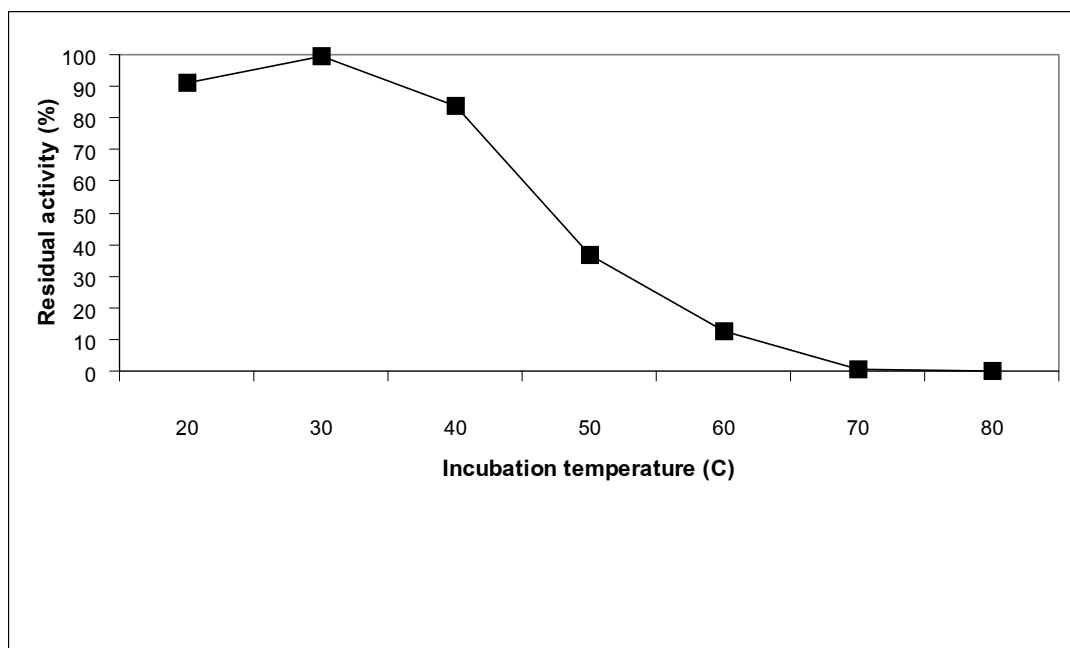
The enzyme reaction was performed at 37 °C for 10 min.



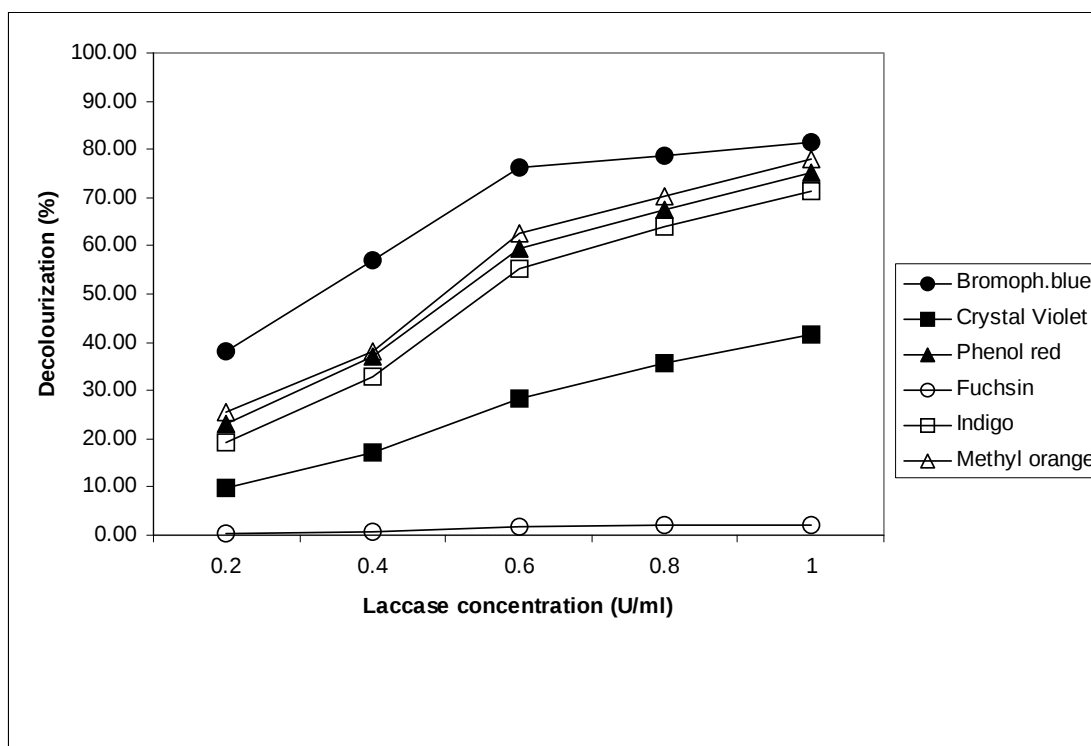
**Figure 3** Effect of pH on enzyme stability of purified laccase of *Lentinula edodes*. The enzyme activity was measured after incubating at various pH at 37 °C for 16 hrs.



**Figure 4** Effect of temperature on enzyme activity of purified laccase of *Lentinula edodes*. The enzyme reaction was performed in 0.1M acetate buffer pH 5.0 for 10 min.



**Figure 5** Effect of temperature on enzyme stability of purified laccase of *Lentinula edodes*. Activity remaining was measured after incubating in 0.1M acetate buffer pH 5.0 at various temperatures for 30 min.



**Figure 6** Optimization of enzyme concentration for dyes decolorization by purified laccase.