Thesis Title Study of Laccase from Basidiomycete Fungi for Application in Paper Pulp Biobleaching

Author Miss Nittaya Wanphrut

Master of Science Biotechnology

Examining Committee

Lecturer Dr. Chartchai Khanongnuch	Chairman
Assoc. Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Member
Lecturer Dr. Worawan Chaleeprom	Member
Lecturer Dr. Narumol Thongwai	Member

ABSTRACT

One hundred and sixty four of basidiocarps collected from decayed and rotted wood in Chiang Mai and Chiang Rai Provinces were induced to form mycelia by cultivation on the Pointing's modified medium containing 0.02% (w/v) polymeric dye (Poly R-478) at 30°C. Among 113 isolates, 42 of them were able to grow at 37°C. Among these, 21 were able to form halo of decoloration on Poly R-478 plate. The efficiency of ligninolytic fungi screening method by observing decoloration of Poly R-478 was suitable for laccase producing strains because it showed high positive strain ratio and low missing ratio as 76% and 14%, respectively. Comparing with the well-known lignin degrading white rot fungi, *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 34541 and *Coriolus versicolor* IFO 30388, 8 isolates of ST40, TP7, TP16, NP14, NP21, NP26, NP27 and RC3 showed almost the same growth rate and Poly R-478 degrading capability. The isolate NP21, which was identified to be *Lenzites sp.*, was selected for further study due to its high level of laccase activity up to 2.96 unit/g substrate when cultivated on rubber wood chips and there was no report about laccase production from *Lenzites sp.*

Lenzites sp. NP 21 produced 2.2 and 8.0 units/*l* in basal medium broth containing 0.02% (w/v) Poly R-478 and 0.025% (w/v) lignin powder, respectively. The presence of 0.025% (w/v) veratryl alcohol and 0.05% (w/v) Tween-80 showed an induction effect on laccase production which was increased up to 104 unit/*l*. Addition of 4% (w/v) of peptone solution into solid substrate increased the enzyme production up to 5.69 unit/gram substrate when cultivated at 37°C for 5 d. The laccase production was increased to 9.43 unit/g substrate when 150 μM of $CuSO_4$ was added.

Laccase was purified by using CM-cellulofine and DEAE-cellulose column, and Sephadex G-100 gel filtration chromatography. The molecular weight of purified enzyme was 65 kDa. The purification factor obtained was 893 folds with 49% recovery yield.

The activity of purified laccase was stable up to 45°C, and was decreased when the temperature was higher than 45°C. The thermal half-life at 55°, 60°, and 65°C were 130, 70, and 33 min, respectively. The optimal pH range was between 3.5 to 4.5, with a peak at pH 4.0. It showed high stability between 3.5 to 9.0 after incubation at 4°C for 24 hrs. The enzyme was completely inactivated by 1 mM of sodium azide and $HgCl_2$. Poly R-478 and lignin powder were demonstrated to be potentially competitive inhibitors for laccase activity. Laccase showed the highest oxidation when using 2,6-dimethoxyphenol (DMP) as a substrate.

Pulp bleaching by the purified laccase using 0.2 g of eucalyptus oxygen delignified kraft pulp (ODKP) and 10 mg / gram pulp of 1-hydroxybenzotriazole (HBT) with 5 units/gram pulp of enzyme in 20 mM sodium citrate buffer pH 4.0. After incubation at 37°C for 12 hrs, the purified enzyme could increase the brightness from 78.8% to 80.5%, while without mediator, the brightness was changed from 78.8% to 79.5%.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ **การศึกษาเอนไซม์แลคเคสจากเบซิดิโอไมซีทฟังไจ เพื่อประยุกต์ใช้ในการฟอกสีทางชีวภาพของเยื่อกระดาษ**

ชื่อผู้เขียน **นางสาวนิตยา วันพฤติ**

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ**

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

อาจารย์ ดร. ชาติชาย โชนงนุช	**ประธานกรรมการ**
รศ.ดร. สายสมร ลำยอง	**กรรมการ**
อาจารย์ ดร. วรวรรณ ชาลีพรหม	**กรรมการ**
อาจารย์ ดร. นฤมล ทองไว	**กรรมการ**

บทคัดย่อ

ตัวอย่างเห็ดที่เก็บจากซากผุและเน่าเปื่อยของไม้ จากบริเวณป่าในจังหวัดเชียงใหม่และเชียงราย จำนวน 164 ตัวอย่าง ถูกชักนำให้เกิดการสร้างเส้นใยบนอาหารแข็งที่ประกอบไปด้วย 0.02% (w/v) polymeric dye (Poly R-478) (Pointing's modified medium) ที่อุณหภูมิ 30°C พบว่าสามารถแยกเส้นใยให้อยู่ในรูปของเชื้อที่บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 113 ไอโซเลท ในจำนวนนี้มี 42 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37°C และพบ 21 ไอโซเลทสามารถสร้างวงใสบนอาหารแข็งที่มี Poly R-478 เป็นส่วนประกอบ การเปรียบเทียบการฟอกสี Poly R-478 กับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานคือ *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 34541 และ *Coriolus versicolor* IFO 30388 พบว่า 8 ไอโซเลท คือ ST40, TP7, TP16, NP14, NP21, NP26, NP27 และ RC3 สามารถสร้างวงใสได้ใกล้เคียงกับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานคือ *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 34541 การใช้ลักษณะการฟอกสี Poly R-478 เพื่อคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนินเหมาะสมสำหรับการคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์แลคเคส เนื่องจากมีค่า positive strain ratio สูง และค่า missing ratio ต่ำ คือ 76% และ14% ตามลำดับ เลือกเชื้อไอโซเลท NP21 ที่บ่งบอกชนิดว่าเป็น *Lenzites sp.* ไว้ใช้ในการศึกษาเพราะสามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ปริมาณสูง 2.96 ยูนิทต่อกรัมสับสเตรท เมื่อนำไปเลี้ยงบนขี้เลื่อยยางพารา

Lenzites sp. NP21 สามารถผลิตเอนไซม์แลคเคสได้ 2.2 และ 8.0 ยูนิทต่อลิตร เมื่อใช้ Poly R-478 0.02% (w/v) และ ผงลิกนิน 0.02% (w/v) เป็นตัวเหนี่ยวนำ ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี veratryl alcohol 0.025% (w/v) และ Tween-80 0.05% (w/v) เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 104 ยูนิตต่อลิตร การเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งโดยใช้ขี้เลื่อยยางพาราเป็นสับสเตรทเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 5.69 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรทในสภาวะที่เติมเปปโตน 4% (w/v) และเมื่อเติม 150 μM ของคอปเปอร์ซัลเฟต พบว่าสามารถชักนำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ได้สูงถึง 9.43 ยูนิทต่อกรัมสับสเตรท โดยเลี้ยงที่ 37°C เป็นเวลา 5 วัน

เอนไซม์แลคเคสจากเชื้อ *Lenzites* sp.NP21 สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้โดย CM-cellulofine และ DEAE-cellulose column และชะด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0-1.0 M ใน 20 mM โซเดียมฟอสเฟสบัฟเฟอร์ pH 7.5 โดยเพิ่มความเข้มข้นแบบเส้นตรง (gradeint) และ Sephadex G-100 gel filtration column น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แลคเคสคือ 65 kDa ค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ของแลคเคสและค่าร้อยละของการเก็บเกี่ยวสูงถึง 893 เท่า และ 49% ตามลำดับ

แลคเคสบริสุทธิ์ที่ผลิตได้ สามารถทนอุณหภูมิที่ 45°C โดยไม่สูญเสียกิจกรรม ค่าครึ่งชีวิต (half life) ที่อุณหภูมิ 55°, 60°, และ 65°C คือ 130, 70, และ 33 นาที ตามลำดับ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในระหว่าง 3.5 ถึง 4.5 และสูงสุดที่ pH 4.0 ใน 0.1 M โซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ เมื่อบ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ต่างๆ ที่ pH 3.5 ถึง 9.0 ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 24 ชั่วโมงพบว่าเอนไซม์ยังสามารถทำงานได้ดี เอนไซม์ถูกขัดขวางการทำงานอย่างสมบูรณ์แบบในสภาวะที่มีโซเดียมเอไซด์ นอกจากนี้พบว่า $HgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 1.0 mM มีผลขัดขวางการทำงานของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ จากผลการศึกษาพบว่า Poly R-478 และ ผงลิกนิน ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ในเชิงแข่งขัน เอนไซม์สามารถออกซิไดซ์สับสเตรทได้ดีที่สุดเมื่อใช้ 2,6-dimethoxyphenol (DMP) เป็นสับสเตรท

เมื่อใช้เอนไซม์แลคเคสจากเชื้อ *Lenzites* sp. NP21 ฟอกสีเยื่อกระดาษ eucalyptus oxygen delignified kraft pulp (ODKP) โดยใช้เอนไซม์ 5 ยูนิทต่อกรัมของเยื่อกระดาษ และ 10 มิลลิกรัมต่อกรัมของเยื่อกระดาษ ของ 1-hydroxybenzotriazole (HBT) ใน 0.02 M โซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 4.0 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 12 ชั่วโมง พบว่าสามารถเพิ่มค่าความขาวของเยื่อกระดาษจาก 78.8% เป็น 80.5% ในขณะที่ในสภาวะที่ไม่มี mediator สามารถเพิ่มค่าความขาวของเยื่อกระดาษได้เพียง 79.5% จากการศึกษาการฟอกสีเยื่อกระดาษโดยใช้เอนไซม์แลคเคสในเบื้องต้นพบว่าการใช้ mediator ร่วมกับเอนไซม์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์