รายงานการวิจัย

เรื่อง

การผลิตเอนไซม์แลคเคสจากทะลายปาล์มเปล่าโดยเชื้อราขาว
Laccase Production from Palm Empty Fruit Bunches by White Rot Fungi

จัดทำโดย

ปิยะรัตน์ บุญแสวง

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์แลคเคสจากทะลายปาล์มเปล่าโดยใช้เชื้อราขาว โดยทำการทดลองคัดเลือกเชื้อราขาวจำนวน 3 สายพันธุ์ได้แก่ *Trametes* sp. BCC 8729, *Xylaria* sp. BCC 7794 และ *Marasmius* sp. BCC 9542 ทำการทดลองในอาหาร 3 ชนิด ได้แก่ สูตรที่ 1 สำหรับการหมักแบบ solid state fermentation และสูตรที่ 2 และ 3 สำหรับการหมักแบบ submerged fermentation พบว่า *Xylaria* sp. BCC 7749 มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์แลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสได้สูงที่สุดในอาหารสูตรที่ 1 เท่ากับ 4.32 และ 5.81 ยูนิต/กรัมทะลายปาล์มเปล่า ตามลำดับ ซึ่งหมักแบบ solid state fermentation หลังจากนั้นทำการศึกษาผลของสารอาหาร สารชักนำ สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการผลิตแลคเคส พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดสจากทะลายปาล์มเปล่า คือ ความชื้น 70% ใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นจำนวน 6 ชิ้น (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของชิ้นวุ้น 5 มม.) เติมแป้งสาลี 7% เป็นสารตั้งต้นร่วม ใช้ xylidine ความเข้มข้น 2 mM เป็นสารชักนำ นอกจากนี้ได้ศึกษาผลของสารอาหารที่เหมาะสมโดยใช้การวางแผนการทดลองแบบ Box Behnken Design พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือการเติม $NH_4H_2PO_4$ 2.06 กรัม/ลิตร, urea 1.07 กรัม/ลิตรและ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 5.22 มก./ลิตร โดยให้การผลิตแลคเคสและแมงกานีสเปอร์ออกซิเดส เท่ากับ 17.2 และ 25.3 ยูนิต/กรัมทะลายปาล์มเปล่าตามลำดับ อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสม คือ 25°ซ และ 6.0 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้นำเอนไซม์แลคเคสที่ผลิตได้จาก *Xylaria* sp. BCC 7749 มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 75% โดยจะได้ค่ากิจกรรมโปรตีนกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคสและ specific acitivity ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น มีค่าเท่ากับ 0.538 มก./มล., 6.32 ยูนิต/มล. และ 11.7 ยูนิต/มก. ตามลำดับ แต่ %yield ลดลงเหลือ 60.4% หลังจากนั้นทำบริสุทธิ์มากขึ้นโดยการนำเอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 75% แล้วนำไปผ่านคอลัมน์ anion-exchange chromatography ที่มี DEAE Toyapearl ที่ผ่านการปรับสมดุลด้วย 0.1M Tris HCl buffer pH 8.0 จะได้กิจกรรมโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์แลคเคส เท่ากับ 0.073 มก./มล. และ 1.89 ยูนิต/มล.ตามลำดับ specific acitivity ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น มีค่าเท่ากับ 25.9 ยูนิต/มก. แต่ %yield ลดลงมากเหลือเพียง 2.96% เอนไซม์แลคเคสที่ผลิตได้จาก *Xylaria* sp. BCC 7749 และทำให้บริสุทธิ์บางส่วนได้ด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 75% กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดที่อุณหภูมิและพีเอช เท่ากับ 45°ซ และ 4.0 ตามลำดับ และมีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิและพีเอช เท่ากับ 30-50°ซ และ 4.0-8.5 ตามลำดับ

Abstract

This research studied the production of laccase from palm empty fruit brunches (PEFB) using white rot fungi. The experiment with 3 strians of white rot fungi; *Trametes* sp. BCC 8729, *Xylaria* sp. BCC 7794 และ *Marasmius* sp. BCC 9542 was conducted in the 3 media; Medium 1 with solid state fermentation, Medium 2 and Medium 3 with the submerged fermentation. The results showed that *Xylaria* sp. BCC 7749 was a good potentail white rot fungus to produce laccase and manganese peroxidase in Medium 1 with solid state fermentation. The high laccase and manganese peroxidase of 4.32 and 5.81 U/gPEFB were obtained. Moreover, the effect of nutrient, inducer and environmental parameters on laccase production was investigated. It was found that the optimum condition was the moisture content of 70%, inoculum size with the 6 pieces of agar (diameter of each piece was 5 mm), the wheat flour supplementation of 7%, 2 mM xylidine as inducer. Also, the Box Behnken Design for nutrient optimization was examined. The addition of $NH_4H_2PO_4$ 2.06 g/l, urea 1.07 g/l and $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 5.22 mg/l gave the high laccase production of 17.2 and 25.3 U/g PEFB, respectively. The optimum temperature and pH were 25°C and 4.5, respectively. In addition, laccase produced from *Xylaria* sp. BCC 7749 was partially purified by the ammonium sulfate precipitation at the concentration of 75%. The protein activity, laccase activity and specific acitivity of the partially purified laccase increased with the values of 0.538 mg/ml, 6.32 U/ml and 11.7 U/mg, respectively. However, the yield after the partial purification was 60.4%. Then, the further step of purification was conducted by using anion-exchange chromatography equipped with DEAE Toyapearl column and 0.1M Tris HCl buffer pH 8.0. The protein activity and laccase activity of the purified laccase decreased with the values of 0.073 mg/ml and 1.89 U/ml, respectively. However, the specific acitivity of the purified laccase increased and reached the value of 25.5 U/mg. However, the low yield of 2.96% was obtained. The laccase produced from *Xylaria* sp. BCC 7749 after the partial purification with the 75% ammonium sulfate precipitation gave the maximum activity at 45°C and pH of 4.0. The stability of partially purified enzyme was in the range of 30-50°C and pH of 4.0-8.5.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	(1)
สารบัญเรื่อง	(3)
สารบัญตาราง	(4)
สารบัญภาพ	(5)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 หลักการและเหตุผล	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
2.1 กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์มและวัสดุเศษเหลือจากการสกัดน้ำมันปาล์ม	3
2.2 ลิกโนเซลลูโลส	5
2.3 เอนไซม์ลิกนิโนไลติก (Ligninolytic enzyme)	8
2.4 เชื้อราที่ผลิตเอนไซม์ลิกนิโนไลติกและปัจจัยที่เกี่ยวข้อง	10
2.5 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ลิกนิโนไลติก	16
บทที่ 3 วิธีการ	18
3.1 วัสดุ	18
3.2 วิธีการวิเคราะห์	19
3.3 วิธีการทดลอง	20
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผล	26
4.1 องค์ประกอบของทะลายปาล์มเปล่า	26
4.2 การคัดเลือกเชื้อราที่เหมาะสมในการผลิตแลคเคสจากทะลายปาล์มเปล่า	26
4.3 ผลของความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคสจากทะลายปาล์มเปล่า	28
4.4 ผลของหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคสจากทะลายปาล์มเปล่า	30
4.5 ผลของสารตั้งต้นร่วม (co-substrate) ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคสจากทะลายปาล์มเปล่า	31
4.6 ผลของสารชักนำที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคสจากทะลายปาล์มเปล่า	33
4.7 สารอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคสจากทะลายปาล์มเปล่า	35
4.8 ผลของอุณหภูมิในการผลิตเอนไซม์แลคเคสจากทะลายปาล์มเปล่า	40
4.9 ผลของพีเอชเริ่มต้นในการผลิตเอนไซม์แลคเคสจากทะลายปาล์มเปล่า	41
4.10 การทำบริสุทธิ์และลักษณะบางประการของเอนไซม์แลคเคสที่ผลิตได้	43
บทที่ 5 บทสรุป	48
เอกสารอ้างอิง	49

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินจากวัสดุเศษเหลือทางการเกษตร	5
ตารางที่ 2	ลักษณะและสมบัติบางประการของเอนไซม์ลิกนิโนไลติก	10
ตารางที่ 3	การวางแผนการทดลองแบบ BBD เพื่อศึกษาผลของสารอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคสจากทะลายปาล์มเปล่า	23
ตารางที่ 4	สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แลคเคสและ MnP จากทะลายปาล์มเปล่าด้วย *Xylaria* sp. BCC 7794 โดยการวางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken design	35
ตารางที่ 5	Analysis of variance (ANNOVA) ของ Box-Behnken design สำหรับการผลิตเอนไซม์แลคเคสและ MnP จากทะลายปาล์มเปล่าด้วย *Xylaria* sp. BCC 7794	37
ตารางที่ 6	การเปรียบเทียบการผลิตแลคเคสและ MnP ที่ได้จากการทดลองกับการทำนายจากสมการแบบจำลองที่ได้	41
ตารางที่ 7	การผลิตเอนไซม์กลุ่มลิกนิโนไลติกโดยเชื้อราขาว	43
ตารางที่ 8	การทำบริสุทธิ์เอนไซม์แลคเคสที่ผลิตได้จากการหมักทะลายปาล์มเปล่าด้วย Xylaria sp. BCC 7794	45

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1	วัสดุเศษเหลือที่ได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	4
ภาพที่ 2	องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส	6
ภาพที่ 3	(a) ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารประกอบฟีนอลโดยแลคเคส และ (b)ระบบ laccase-mediator system (LMS)	8
ภาพที่ 4	ขั้นตอนที่สำคัญและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายลิกนินโดย White-rot basidiomycetes	11
ภาพที่ 5	กิจกรรมเอนไซม์แลคเคสจากการหมักทะลายปาล์มเปล่าโดยใช้อาหารสูตรที่ 1 (solid state fermentation) สูตรที่ 2 และ 3 (submerged fermentation) ด้วยเชื้อราขาว *Xylaria* sp. BCC 7794, *Trametes* sp. BCC 8729 และ *Marasmius* sp. BCC 9542	27
ภาพที่ 6	กิจกรรมเอนไซม์ MnP จากการหมักทะลายปาล์มเปล่าโดยใช้อาหารสูตรที่ 1 (solid state fermentation) สูตรที่ 2 และ 3 (submerged fermentation) ด้วยเชื้อราขาว *Xylaria* sp. BCC 7794, *Trametes* sp. BCC 8729 และ *Marasmius* sp. BCC 9542	27
ภาพที่ 7	ผลของความชื้นเริ่มต้นต่อกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสจากการหมักทะลายปาล์มเปล่าโดยใช้อาหารสูตรที่ 1 (solid state fermentation) ด้วยเชื้อราขาว *Xylaria* sp. BCC 7794	29
ภาพที่ 8	ผลของความชื้นเริ่มต้นต่อกิจกรรมเอนไซม์ MnP จากการหมักทะลายปาล์มเปล่าโดยใช้อาหารสูตรที่ 1 (solid state fermentation) ด้วยเชื้อราขาว *Xylaria* sp. BCC 7794	29
ภาพที่ 9	ผลของปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น (จำนวนชิ้นวุ้นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม.) ต่อกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสจากการหมักทะลายปาล์มเปล่าโดยใช้อาหารสูตรที่ 1 (solid state fermentation) ด้วยเชื้อราขาว *Xylaria* sp. BCC 7794	30
ภาพที่ 10	ผลของปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น (จำนวนชิ้นวุ้นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม.) ต่อกิจกรรมเอนไซม์ MnP จากการหมักทะลายปาล์มเปล่าโดยใช้อาหารสูตรที่ 1 (solid state fermentation) ด้วยเชื้อราขาว *Xylaria* sp. BCC 7794	31
ภาพที่ 11	ผลของการใช้แป้งสาลีเป็นสารตั้งต้นร่วมต่อกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสจากการหมักทะลายปาล์มเปล่าโดยใช้อาหารสูตรที่ 1 (solid state fermentation) ด้วยเชื้อราขาว *Xylaria* sp. BCC 7794	32
ภาพที่ 12	ผลของการใช้แป้งสาลีเป็นสารตั้งต้นร่วมต่อกิจกรรมเอนไซม์ MnP จากการหมักทะลายปาล์มเปล่าโดยใช้อาหารสูตรที่ 1 (solid state fermentation) ด้วยเชื้อราขาว *Xylaria* sp. BCC 7794	32

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 13	ผลของสารชักนำต่อกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสจากการหมักทะลายปาล์มเปล่าโดยใช้อาหารสูตรที่ 1 (solid state fermentation) ด้วยเชื้อราขาว *Xylaria* sp. BCC 7794 ทำการหมักที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ เป็นระยะเวลา 12 วัน	34
ภาพที่ 14	ผลของสารชักนำต่อกิจกรรมเอนไซม์ MnP จากการหมักทะลายปาล์มเปล่าโดยใช้อาหารสูตรที่ 1 (solid state fermentation) ด้วยเชื้อราขาว *Xylaria* sp. BCC 7794 ทำการหมักที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ เป็นระยะเวลา 12 วัน	34
ภาพที่ 15	ภาพสามมิติแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยของ (A) DAHP และ urea ที่ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 5.2 g/l, (B) DAHP และ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ที่ urea 1.1 g/l, (C) urea และ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ที่ DAHP 2.1 g/l ต่อกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสจากการหมักทะลายปาล์มเปล่าด้วย *Xylaria* sp. BCC 7794	38
ภาพที่ 16	ภาพสามมิติแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยของ (A) DAHP และ urea ที่ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 5.2 g/l, (B) DAHP และ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ที่ urea 1.1 g/l, (C) urea และ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ที่ DAHP 2.1 g/l ต่อกิจกรรมเอนไซม์ MnP จากการหมักทะลายปาล์มเปล่าด้วย *Xylaria* sp. BCC 7794	39
ภาพที่ 17	ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมเอนไซม์แลคเคส (เส้นทึบ) และ MnP (เส้นประ) จากการหมักทะลายปาล์มเปล่าโดยใช้อาหารสูตรที่ 1 (solid state fermentation) ด้วยเชื้อราขาว *Xylaria* sp. BCC 7794	40
ภาพที่ 18	ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อกิจกรรมเอนไซม์แลคเคสจากการหมักทะลายปาล์มเปล่าโดยใช้อาหารสูตรที่ 1 (solid state fermentation) ด้วยเชื้อราขาว *Xylaria* sp. BCC 7794 ที่อุณหภูมิ 25 °ซ	42
ภาพที่ 19	ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อกิจกรรมเอนไซม์ MnP จากการหมักทะลายปาล์มเปล่าโดยใช้อาหารสูตรที่ 1 (solid state fermentation) ด้วยเชื้อราขาว *Xylaria* sp. BCC 7794 ที่อุณหภูมิ 25 °ซ	42
ภาพที่ 20	การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆของแลคเคสที่ผลิตได้จากการหมักทะลายปาล์มเปล่าด้วย *Xylaria* sp. BCC 7794	44
ภาพที่ 21	กิจกรรมของแลคเคสที่ผลิตได้จากการหมักทะลายปาล์มเปล่าด้วย *Xylaria* sp. BCC 7794 หลังจากการชะสารละลายผ่าน DEAE-Toyopearl column (0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0) ด้วย 0-0.5 M NaCl ที่อัตราการไหล 0.2 มล./นาที	45
ภาพที่ 22	ผลของพีเอชต่อกิจกรรมและความคงตัวของเอนไซม์แลคเคสที่ผลิตได้จากการหมักทะลายปาล์มเปล่าด้วย *Xylaria* sp. BCC 7794 โดยใช้ ABTS เป็นสารตั้งต้น	46
ภาพที่ 23	ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมและความคงตัวของเอนไซม์แลคเคสที่ผลิตได้จากการหมักทะลายปาล์มเปล่าด้วย *Xylaria* sp. BCC 7794 โดยใช้ ABTS เป็นสารตั้งต้น	47