การทำให้เอนไซม์แลคเคสบริสุทธิ์และตรึงบนตัวรองรับโพลิเมอร์

นางสาว ศุภลักษณ์ เติมวรธรรม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์โพลิเมอร์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2532

ISBN 974-576-948-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

016163
i 10303218

PARTIAL PURIFICATION OF LACCASE AND ITS IMMOBILIZATION ON POLYMER SUPPORTS

Miss Supaluk Termvoratham

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Program of Polymer Science
Graduate School
Chulalongkorn University
1989

ISBN 974-576-948-7

Thesis Title	Partial Purification of Laccase and its Immobilization on Polymer Supports
By	Miss Supaluk Termvoratham
Department	Petro-Polymer (Inter program)
Thesis Advisor	Assistant Professor Supawan Tantayanon, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Thanit Pewnim, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

.....Thavorn Vijarabhaya..... Dean of the Graduate School
(Professor Thavorn Vijarabhaya,Ph.D.)

Thesis Committee

..... Chairman
(Associate Professor Pattarapan Prasassarakich,Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Assistant Professor Supawan Tantayanon,Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Thanit Pewnim, Ph.D.)

..... Member
(Amnard Sittattrakul, Ph.D.)

..... Member
(Associate Professor Sanha Panichajakul, Ph.D.)

ศุภสักษณ์ เติมวรธรรม : การทำให้เอนไซม์แลคเคสบริสุทธิ์และตรึงบนตัวรองรับโพลิเมอร์ (PARTIAL PURIFICATION OF LACCASE AND ITS IMMOBILIZATION ON POLYMER SUPPORTS) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.ศุภวรรณ ตันตยานนท์, ดร.ธนิต ผิวนิ่ม, 81 หน้า
ISBN 974-576-948-7

สามารถสกัดแลคเคส (EC 1.10.3.2 ; Oxygen oxidoreductase) จากเห็ดนางรม ซึ่งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Pleurotus sapidus. สามารถทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยผ่านขั้นตอนแรกคือ ตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 80% (w/w) หลังจากผ่านกระบวนการไดอะไลซิสแล้ว ทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยวิธี คอลัมน์โครมาโตกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ โดยใช้ DEAE-Sephadex A-50 ทำเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธี อัลตราฟิลเตรชัน จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วยเทคนิค เจล เปอมีเอชัน โครมาโตกราฟฟี โดยใช้ Sephadex G-100 แล้วทำให้แลคเคสแห้งในสภาพเย็นจัดโดยผ่านกระบวนการไลโอฟิไลเซชั่น แลคเคสที่สกัดได้ในขั้นตอนนี้มีความบริสุทธิ์ 40 เท่า แลคเคสมีค่ากัมมันตภาพเฉพาะ 15 หน่วย/มก. โปรตีน การศึกษาสมบัติของแลคเคสโดยวิธี โพลิอะคริลเอไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส พบว่า แลคเคสประกอบด้วยไอโซเอนไซม์ ที่ปรากฏเห็นอย่างน้อย 4 ไอโซเอนไซม์ การวัดการดูดกลืนแสงของแลคเคสในช่วงแสงสีขาวพบว่า แลคเคสมีอะตอมของทองแดงอยู่จริงเพราะสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดในช่วง 600 นาโนเมตร การทดสอบสมบัติของแลคเคสเพิ่มเติมพบว่า นอกจากสามารถออกซิไดซ์ syringaldazine แล้วแลคเคสยังสามารถออกซิไดซ์ catechol และ hydroquinone ด้วย แลคเคสทำงานได้ดีที่สุดที่ pH ประมาณ 6.0 และสามารถทนต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 45 °ซ โดยที่อุณหภูมินี้ แลคเคสเสียกัมมันตภาพไปเพียง 25% เท่านั้น สามารถตรึงแลคเคสกับโพลิเมอร์ของ Amberite IRA-68 โดยมี epichlorohydrin เป็นตัวเชื่อม นอกจากนั้น ยังสามารถตรึงแลคเคสโดยวิธีกักไว้ในร่างแหของโพลิอะคริลเอไมด์ แลคเคสซึ่งตรึงโดยวิธีทั้งสองนี้สามารถใช้งานได้หลายครั้งก่อนที่จะสูญเสียสภาพไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สหสาขาวิชาปิโตรเคมี-โพลิเมอร์ ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์โพลิเมอร์
ปีการศึกษา 2532 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

SUPALUK TERMVORATHAM : PARTIAL PURIFICATION OF LACCASE AND ITS IMMOBILIZATION ON POLYMER SUPPORTS. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUPAWAN TANTAYANON, Ph.D., THANIT PEWNIM, Ph.D; 81 pp.
ISBN 974-576-948-7

Laccase (EC 1.10.3.2 ; Oxygen oxidoreductase) was isolated from Pleurotus sapidus. The enzyme was partially purified by first precipitation with 80% (w/w) ammonium sulfate. After the removal of salts by dialysis the laccase was further purified by ion exchange chromatography using DEAE-Sephadex A-50. The enzyme was concentrated by ultrafiltration and subjected to further purification by gel permeation chromatography using Sephadex G-100. The pooled fractions of partially purified laccase was lyophilized and kept at -20 °C in dried form. The above procedures resulted in 40 folds purification of laccase resulting in the enzyme having a specific activity of 15 unit/mg. protein.

Polyacrylamide gel electrophoresis revealed that laccase consisted of at least 4 isoenzymes. The enzyme solution absorbed light maximally at around 600 nm and was able to oxidise catechol, hydroquinone as well as syringaldazine. P. sapidus laccase exhibited an optimum pH of around 6 and was relatively stable at 45 °C, loosing only 25% of activity at this temperature. Laccase was immobilized on polymer supports involving two methods. The first method employed epichlorohydrin as linking agent. In this case laccase was covalently linked to the polymer of Amberite IRA-68. The second method involved the entrapment of laccase within the network of polyacrylamide gel. The immobilized laccase in both cases were tested for its stability and were found to function for number of times before the activity was finally lost.

ภาควิชา สหสาขาวิชาปิโตรเคมี-โพลิเมอร์
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์โพลิเมอร์
ปีการศึกษา 2532

ลายมือชื่อนิสิต .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my deepest gratitude and appreciation to my co-advisors Dr. Thanit Pewnim and Dr. Amnard Sittattrakul for their invaluable guidances, suggestions and discussions and for their comments and editing of the thesis, to my advisor Assistant Prof. Dr. Supawan Tantayanon for her helpfulness in the preparation and proof of this thesis.

I would also like to express my great gratitude and appreciation to the graduate students at Chulalongkorn University and the authorities at Silpakorn University for their readiness to help and for their friendship.

All instruments, equipments and chemicals used in this investigation were made available by the generosity of the Chemistry Department, Silpakorn University and also of Chulalongkorn University.

I would also like to express my special thank to my friend for assistance in typing this thesis.

Lastly, I wish to thank the thesis committee, Associate Prof. Dr. Sanha Panichajakul and Associate Prof. Dr. Pattarapan Prasassarakich for their comments, to my family who gave me their sympathy and encouragement. I would also like to thank STDB (Office of Science Technology Development Board) for a financial support that allow me to carry out this research project. Time will prove that STDB have made an important contribution to Science and Technology of Thailand. Regarding the laccase project, time will also prove that STDB was right in seeing the significant of this enzyme. For I sincerely believe that laccase will surely have roles to play in our local industries in the years to come.

CONTENTS

PAGE

ABSTRACT (in Thai)..... iv

ABSTRACT..... v

ACKNOWLEDGEMENTS..... vi

LIST OF FIGURES..... x

LIST OF TABLES..... xii

ABBREVIATIONS.....xiii

CHAPTER

I. INTRODUCTION..... 1

1.1 Reactions catalysed by laccase..... 2

1.2 Sources and roles of laccase in nature.... 5

1.2.1 Laccase from plants..... 5

1.2.2 Laccase from fungi..... 17

1.3 Properties of laccase..... 17

1.4 Immobilization of laccase..... 19

1.5 Aims of the investigation..... 23

II. CHEMICALS AND EQUIPMENTS..... 24

III. METHODS OF EXPERIMENT..... 28

3.1 Extraction of laccase from Haed Nangrom (*Pleurotus sapidus*)..... 28

3.2 Ion exchange chromatography using DEAE Sephadex A-50..... 30

3.3 Gel permeation chromatography of laccase using Sephadex G-100..... 30

3.4 Polyacrylamide gel electrophoresis of laccase..... 31

3.5 The assay for laccase..... 34

3.6 The determination of protein by the Lowry Method..... 37

PAGE

3.7 Spectral properties of partially purified laccase and commercially available *Pyricularia oryzae* laccase..... 37
3.8 Studies on partially purified laccase..... 37
3.8.1 The effect of temperature..... 37
3.8.2 The determination of optimum pH for reaction..... 37
3.8.3 Catalytic actions of laccase on catechol and hydroquinone..... 38
3.9 Immobilize laccase on Amberite IRA-68..... 38
3.10 Determination of the time-curve of reaction of immobilized laccase..... 39
3.11 The test for the stability of immobilized laccase..... 39
3.11.1 The batch system..... 39
3.11.2 Continuous column system..... 40
3.12 Immobilize laccase by entrapment within the polyacrylamide gel..... 40
IV. RESULTS AND DISCUSSION..... 43
4.1 Partial purification of laccase..... 43
4.1.1 Anion exchange chromatography using DEAE Sephadex A-50..... 46
4.1.2 Gel permeation chromatography on Sephadex G-100..... 46
4.1.3 Polyacrylamide gel electrophoresis of laccase..... 49
4.2 Spectral properties of partially purified laccase and commercially available *Pyricularia oryzae* laccase..... 51
4.3 Optimum pH for partially purified laccase. 53

PAGE

4.4 Effect of temperature on partially purified laccase..... 53
4.5 Reaction of laccase on catechol and hydroquinone..... 56
4.6 Immobilization of laccase..... 59
4.6.1 Immobilization of laccase by covalent binding to Amberite IRA-68 using epichlorohydrin as the linking agent..... 60
4.6.2 Immobilization of laccase by entrapment within the poly-acrylamide gel..... 64
4.7 Potential application of laccase..... 72
V. CONCLUSION..... 75
REFERENCES..... 76
VITAE..... 81

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
1.1	Example of reactions catalysed by laccase.....	4
1.2	Example of lacquerwares produced at the center of Industrial Promotion of the Northern Region of Thailand.....	12
1.3	Lacquer tree, *Melanorrhoe usitata*, grown in Chiangmai.....	14
1.4	Appearance of the Yan Rak after the action of laccase.....	15
1.5	Steps involved in the production of a lacquerware using the lacquer from *M. usitata*..	16
1.6	Three methods for the immobilization of enzymes.	22
3.1	The use of the dialysis bag.....	29
3.2	Flow chart outlining steps involved in the purification of laccase.....	32
3.3	Casting gel rods with gel rod casting stand....	33
3.4	The continuous assay of laccase using the time-scanning mode of Shimadzu UV-visible spectrophotometer.....	36
3.5	A set up of continuous column system for the assay of immobilize laccase-Amberite IRA-68....	41
4.1	Haed Nangrom (*Pleurotus sapidus*).....	44
4.2	Purification of laccase using an anion-exchange chromatography DEAE Sephadex A-50.....	47
4.3	Purification of laccase using Sephadex G-100 chromatography.....	48
4.4	Polyacrylamide gel electrophoresis of laccase..	50

FIGURE PAGE

4.5 Scanning spectrum of the partially purified laccase (*P. sapidus*) and commercially prepared enzyme (*Pyricularia oryzae*)..... 52
4.6 Effect of pH on reaction of syringaldazine by partially purified laccase..... 54
4.7 Effect of temperature on reaction of syringaldazine by partially purified laccase... 55
4.8 Oxidation of catechol by partially purified laccase..... 57
4.9 Oxidation of hydroquinone by partially purified laccase..... 58
4.10 Immobilization of laccase to Amberite IRA-68 via the cross-linking agent, epichlorohydrin... 61
4.11 Immobilization of laccase to Amberite IRA-68 using epichlorohydrin as cross-linking agent... 62
4.12 Time course reaction of immobilized laccase.... 63
4.13 Stability of covalently immobilized laccase after testing by batch system..... 64
4.14 Diagram of continuous..... 66
4.15 Stability of covalently-immobilized laccase testing by the continuous system..... 67
4.16 Stability of entrapped laccase after testing by batch system..... 68
4.17 Immobilization of laccase to polyacrylamide gel using entrapment method..... 69
4.18 Stability of entrapped laccase testing by the continuous system..... 71

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
1.1	Compositions of catechol derivatives in sap from different types of lacquer trees.....	10
1.2	Overall compositions of sap from different types of lacquer trees showing the compositions of gummic substance, water and laccase plus the unidentified component.....	11
1.3	List of some copper-containing proteins. Sources of these proteins vary from bacteria to fungi to plants and to animals. Some are blue in colour some are non-blue.....	20
2.1	List of chemicals and sources.....	24
2.2	List of materials.....	26
2.3	List of equipments.....	27
4.1	Partial purification of laccase.....	45

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

A_{280}	Absorbancy at wavelength of 280 nanometer
gm	gram
kg	kilogram
M	Molarity
mg	Milligram
min	Minute
ml	Millilitre
mM	Millimolar
nm	Nanometer
OD	Optical density
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PEG	Polyethylene glycol
TEMED	N,N,N,N´-tetramethylene diamine
°C	Degree Celsius
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย