لاکاز: پیشرفت‌های اخیر و اهمیت نانوزیست‌فناوری آن

حسین صالحی زاده[1*]، مهدیه علیخویی[1]، محمد صالحی زاده[2]

۱- اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده فنی و مهندسی

۲- مونترال، دانشگاه کنکوردیا، گروه مهندسی شیمی

پیام نگار: **Salehi633@hotmail.com**

چکیده

لاکاز آنزیمی از گروه اکسیدازها (اُکساینده‌ها)، مشهور به اکسیداز چند مسی آبی رنگ است که توسط میکروارگانیسم‌ها به ویژه قارچ‌ها و گیاهان تولید می‌شود. لاکاز از اکسیژن مولکولی به‌عنوان پذیرندهٔ الکترون جهت اکسایش زیستی استفاده می‌کند در حالیکه در پراکسیدازها، پراکسید هیدروژن پذیرندهٔ الکترون است. گسترهٔ کاربرد این آنزیم طیف وسیعی از فرایندهای شیمیایی و صنایع، نظیر رنگبری در صنعت نساجی، سفید کردن خمیر کاغذ، سمیت زدایی از پساب، پالایش زیستی، صنایع غذایی، تولید مواد آلی از سوبسترای فنولی و آمینی، پیل‌های سوختی و زیست نانوفناوری را شامل می‌شود. گرچه قارچ‌های رشته ای، لاکازها را به میزان زیادی تولید می‌کنند، ولی تولید لاکاز در مقیاس صنعتی با بازدهی بالا، هنوز با مشکلاتی نظیر رشد غیر قابل کنترل قارچ، ایجاد پلی ساکاریدها در اطراف میسل‌ها و ترشح ترکیبات خاص مانند پروتئازهای غیر فعال‌کننده مواجه است. در حال حاضر محققان با یافتن میکروارگانیسم‌های مناسب و بهبود فرایند تولید و تخلیص لاکاز، درصدد افزایش بازدهی، محصول دهی و کاهش قیمت نهایی لاکاز می‌باشند. این مقاله مروری بر معرفی لاکاز، خصوصیات، فرایندهای تولید، اثر عوامل مختلف بر پایداری و فعالیت آنزیم و برخی از کاربردهای آن در صنایع متنوع دارد.

کلمات کلیدی: اکساینده، اکسایش زیستی، حسگرهای زیستی، سفید کردن، لاکاز، میکروارگانیسم

۱- مقدمه

لاکاز توسط انواع قارچ‌ها، گیاهان و برخی باکتری‌ها تولید می‌شود [۱,۲]. باکتری‌هایی نظیر *آزوسپیریلیوم لیپوفرم*[1][۳]، *باسیلوس سابتیلیس*[2][۴]، *استرپتومایسس لوندولا*[3][۵]، *مارینوموناس مدیترانه*[4] قادر به تولید لاکاز هستند. طیف وسیعی از قارچها نظیر *اسکومایست‌ها*[5]، *دتروماست ها*[6]، *بازیدیومایست ها*[7]، *نروسپورا کراسا*[8]، *فانروچات فلاوید-آلبا*[9]، *ترامتس پوبسنس*[10]، *کریلوس هیرسوتوس*[11]، *پیکنوپروس سانگونوس*[12]، *پانوس تیگرینوس*[13]،

1. Azospirillum Lipoferum
2. Bacillus Subtilis
3. Streptomyces Lavendulae
4. Marinomonas Mediterranea

5. Ascomycetes
6. Deuteromycetes
7. Basidiomycetes
8. Neurospora Crassa
9. Phanerochaete Flavido-Alba
10. Trametes Pubescens
11. Coriolus Hirsutus
12. Pycnoporus Sanguineus
13. Panus Tigrinus

ترامتس چند رنگی دارای لاکاز هستند. همچنین امکان تهیه لاکاز از گیاهانی نظیر کلم، چغندر، شلغم، سیب، گلابی، مارچوبه، سیب زمینی و انواع سبزی‌ها وجود دارد.

گرچه واکنش‌های اکسایش شیمیایی در بسیاری از صنایع رخ می‌دهند، ولی دارای معایبی نظیر غیر ویژه بودن، واکنش‌های جانبی نامطلوب و به مخاطره انداختن محیط زیست با مصرف مواد شیمیایی خطرناک می‌باشند. اکسایش زیستی با استفاده از آنزیم‌ها به‌دلیل ویژه عمل کردن، زیست تخریب پذیر بودن آنزیم‌ها و انجام واکنش در شرایط عملیاتی ملایم، برتری دارد. در حال حاضر واکنش‌های اکسایش زیستی با استفاده از آنزیم‌ها برای طیف وسیعی از فرایندها و صنایع نظیر غذایی، نساجی، کاغذ و خمیر، تصفیه پساب، و غیره به کار می‌رود. آنزیم لاکاز در اکسایش زیستی از اکسیژن مولکولی به‌عنوان پذیرندهٔ الکترون استفاده می‌کند و بسیار مورد توجه است. لاکاز (بنزن دیول: اکسیدو ردوکتازها ۱,۱۰,۳,۲ EC) متعلق به خانواده اکسیدازهاست و به پروتئین‌های چند مسی آبی رنگ شهرت دارد. ویژگی‌های این پروتئین به واسطه حضور چهار اتم مس کاتالیزوری در ساختار آن است و رنگ آبی متمایل به سبز به واسطه حضور یون مس است [۶,۷]. لاکاز، واکنش اکسایش دی فنل‌ها، آمینو فنول‌ها، پلی‌فنول‌ها، پلی‌آمین‌ها، لیگنین‌ها، آریل دی آمین‌ها[1] و غیره را کاتالیز می‌کند. قابلیت کاهندگی لاکاز برای ترکیبات غیر فنولی کافی نیست به‌همین دلیل به یک مولکول واسطه برای انتقال الکترون نیاز دارد. از واسطه‌های کاهنده نظیر (۲-۲'- آزینوبیس)[2] و (N- هیدروکسی بنزوتری زول)[3] و (۳-هیدروکسی یانتارانیلیک اسید)[4] در سامانه‌های مختلفی چون اکسایش آلاینده‌های آلی و گسترش حسگرهای زیستی می‌توان استفاده کرد.

تاکنون بیشترین مقدار لاکاز به‌وسیله قارچ پوسیده سفید گزارش شده است. این میکروارگانیسم قادر به تبدیل همه ترکیبات لیگنین به دی اکسید کربن و آب است. بنابراین *بازیدیومایست‌های پوسیده سفید*[5] بیش از سایر قارچ‌ها در تجزیه لیگنین مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. برای آنزیم‌هایی نظیر لیگنین پراکسیداز، پراکسیداز منگنز، لاکاز و گلوکوزاکسیداز و گلیوکسال اکسیداز[6] ساز وکار منحصر به فردی برای تخریب لیگنین وجود ندارد و بسته به نوع میکروارگانیسم متفاوت است. به‌طور مثال *پلوروتوس استراتوس*[7] متعلق به گروهی از میکروارگانیسم‌های تخریب‌کنندهٔ لیگنین است که لاکاز و پراکسیداز منگنز را تولید می‌کند، ولی لیگنین پراکسیداز[8] تولید نمی‌کند و یا *پیکنوپروس سیناباریوس*[9] لاکاز را به‌عنوان تنها آنزیم تجزیه‌کنندهٔ لیگنین تولید می‌کند. گرچه اغلب آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ لیگنین، خارج سلولی می‌باشند، تحقیقات نشان داده است که لاکازهای درون سلولی نیز در قارچ‌های پوسیده سفید وجود دارد که به‌عنوان پیش ساز برای لاکاز خارج سلولی عمل می‌کند. در این مقاله به معرفی لاکاز، ساز و کار عملکرد آن، خصوصیات ساختاری لاکاز، فرایندهای تولید و اثر عوامل مختلف بر پایداری و فعالیت آنزیم و برخی از کاربردهای آن در صنایع می‌پردازد.

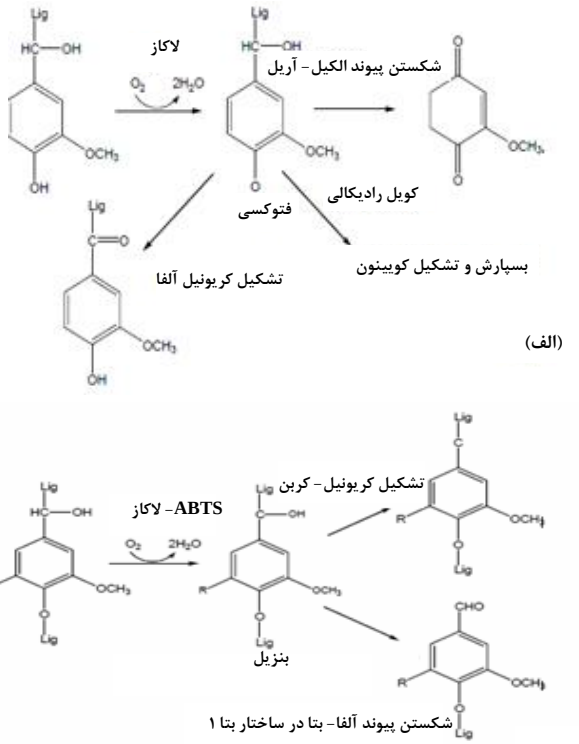
۲- ساز و کار عملکرد لاکاز

لاکاز مانند یک باتری عمل می‌کند. الکترون‌های ناشی از واکنش‌های اکسایش منفرد را ذخیره می‌کند تا اکسیژن مولکولی را احیا نماید. اکسایش سوبسترا به‌وسیله لاکاز یک واکنش تک الکترونی است که یک رادیکال آزاد تولید می‌کند. به‌همین دلیل برای کاهش کامل اکسیژن مولکولی به آب، باید چهار مولکول سوبسترا اکسید شوند. در اکسایش سوبسترای خنثی، پیوند بین (کربن آلفا-کربن بتا) و پیوند بین (آلکیل- آریل)[10] می‌شکند (شکل (۱-الف)).

لاکاز شبیه به دیگر آنزیم‌های اکسیدکنندهٔ فنول، لیگنین را به‌وسیله کوپل کردن رادیکال‌های فنوکسی تولید شده از اکسایش گروه‌های فنولی لیگنین بسپارش می‌کند. به‌دلیل ویژه بودن لاکاز برای زیر واحدهای فنولی در لیگنین و محدود بودن لیگنین در دسترس در دیواره فیبری، لاکاز برای فرایند سفید کردن خمیر کاغذ، نیاز به واسطه‌هایی نظیر (۲-۲ آزینوبیس ۳-اتیبنزتیزولین-۶-اسید سولفونیک)[11] (ABTS) دارد (شکل (۱)- (ب))[۸].

1. Aryl Diamines
2. 2-2'-Azinobis (3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) (ABTS)
3. N-Hydroxybenzotriazole (HBT)
4. 3-Hydroxyanthranilic Acid
5. White-rot Fungi
6. Glyoxal Oxidase
7. Pleurotus Ostreatus
8. Lignin Peroxidase
9. Pycnoporus Cinnabarinus
10. Aryl-Alkyl Cleavage
11. 2,2'-Azino-Bis(3-Ethybenzthizoline-6-Sulfonic Acid)

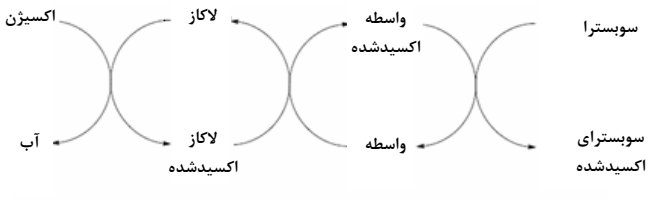
www.SID.ir
Archive of SID



شکل ۱- اکسایش زیستی توسط لاکاز (الف) واحدهای فنولی لیگنین به‌وسیله لاکاز (ب) ترکیبات مدل لیگنین غیر فنولی به‌وسیله یک سامانه لاکاز همراه با واسطه[۸]

لاکاز مانند دیگر آنزیم‌های تجزیه‌کننده لیگنینی، به‌دلیل قابلیت پایین برای کاهش یافتن و طبیعت بسپاری تصادفی لیگنین، فقط می‌تواند بخش‌های فنلی لیگنین را اکسید کند [۹,۱۰]. بنابراین، از برخی ترکیبات واسطه کوچک طبیعی با وزن مولکولی پائین می‌توان برای اکسید کردن قسمت غیر فنولی لیگنین استفاده کرد [۱۱] (شکل (۱)- (ب)).

همانطور که در بالا توضیح داده شد در برخی موارد لاکاز قادر نیست تمام بخش‌های یک ترکیب لیگنینی را اکسید کند که در این صورت باید از یک مولکول واسطه مناسب استفاده کرد. یک مولکول واسطه به‌عنوان یک حامل الکترون عمل می‌کند، وقتی که به‌وسیله آنزیم اکسید شد یک واسطهٔ اکسیدکنندهٔ قوی تولید می‌کند که این ماده از فضای آنزیمی خارج می‌شود و سوبسترایی را اکسید می‌کند. این سوبسترا به‌دلیل اندازهٔ بزرگش نمی‌تواند وارد جایگاه فعال آنزیم شود. چون آنزیم و بسپار به‌صورت مستقیم برهمکنش نمی‌دهند فقط با استفاده از واسطه‌ها، امکان اکسایش بسپارها وجود دارد (شکل (۲)) [۱۲].



شکل ۲- چرخه کاتالیزگری یک سامانهٔ اکسایش لاکاز همراه با مولکول واسطه [۱۲]

مولکول واسطه اکسید شده می‌تواند یک ساز وکار اکسایشی را طی کند که قابل انجام برای آنزیم نیست. بنابراین طیف وسیعی از مواد را می‌تواند پوشش دهد [۱۳]. گرچه تاکنون بیش از ۱۰۰ مولکول واسطه شناخته شده، ولی اغلب از دو مولکول ABTS و تری آزول ۱-هیدروکسی بنزوتری آزول[1] (HBT) استفاده می‌شود [۱۴]. لاکازهای مختلف به‌راحتی ABTS را به‌وسیله رادیکال‌های آزاد اکسید می‌کنند و کاتیون $ABTS^{+}$ را تولید می‌نمایند که غلظت رادیکال کاتیونی (سبز-آبی) متناسب با فعالیت آنزیم است. می‌توان با یک مرحله اکسایش دیگر کاتیون فوق را به دی کاتیون تبدیل کرد. $ABTS^{2+}$ تولید شده دارای توان بالاتری برای اکسید کردن در مقایسه با $ABTS^{+}$ را دارا است [۱۵].

HBT متعلق به ترکیبات نیتروژن چند حلقه ای هستند که دارای گروه‌های واسطه‌ای (N-OH) می‌باشد. آنزیم با مصرف اکسیژن، HBT را به یک واسطه فعال تبدیل می‌کند. در یک تحقیق مروری توان کاهش HBT در حدود ۱/۷۲-۱/۱ تخمین زده شده است [۱۶]. سامانه (لاکاز- واسطه)، کاربردهای زیادی در رنگبری و یا سفید کردن در صنعت نساجی[۱۴]، تخریب هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای، تخریب علف کش‌ها و حشره کش‌ها و سنتز مواد آلی دارد. استفاده از مواد واسطه قبلی (ABTS و HBT) مشکلاتی نظیر سمی بودن و گران بودن و غیر فعال شدن لاکاز در غلظت‌های حدود ۱ میلی مولار از این مولکول‌ها می‌باشد، که با استفاده از مولکول‌های واسطه طبیعی چون (p-کوماریک اسید)[2]، (۴-هیدروکسی بنزوئیک اسید)[3]، سیرین گالدئید[4] و غیره می‌توان بر این مشکلات فائق آمد [۱۴].

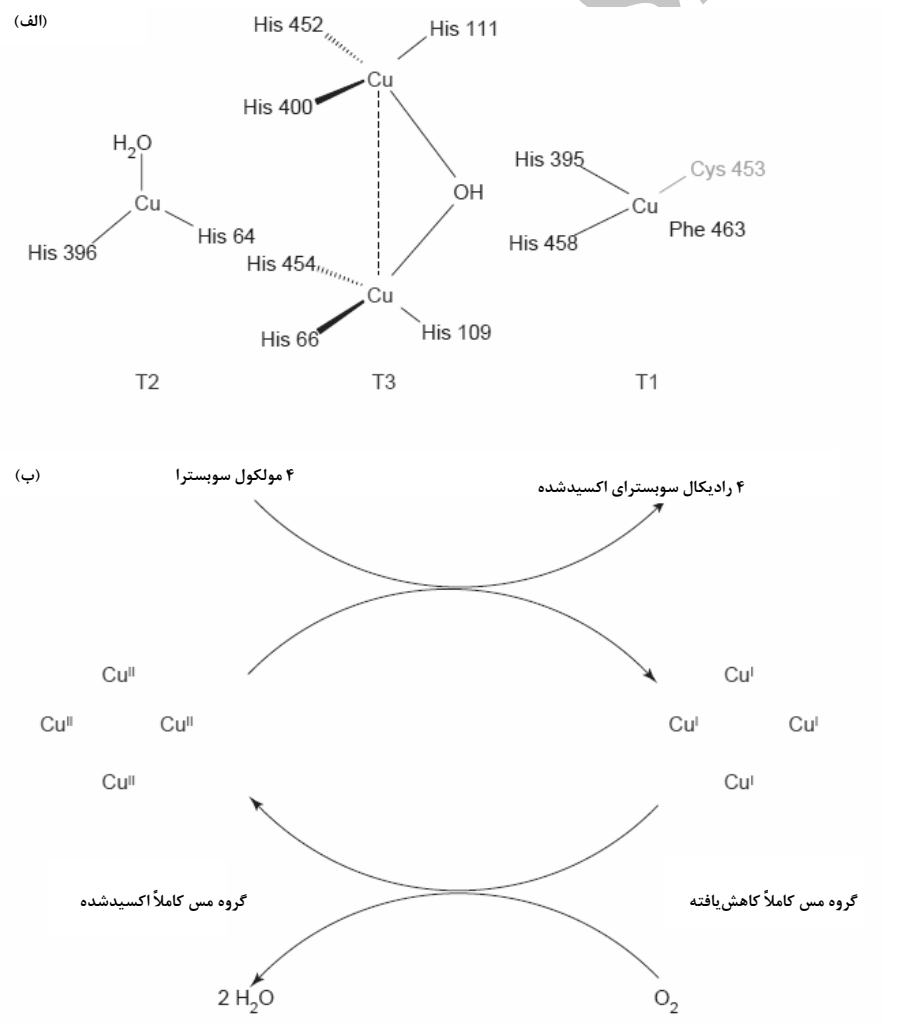
1. Triazole 1-Hydroxybenzotriazole
2. p-Coumaric Acid
3. 4-Hidroxybenzoic Acid
4. Syringaldehyde

Archive of SID
www.

۳- خصوصیات ساختاری آنزیم لاکاز

اکثر لاکازهای قارچی، گلیکوپروتئین‌های مونومری، دیمری یا ترامری هستند. گلیکولیزه کردن لاکازهای قارچی در پایداری حرارتی حساسیت به تخریب توسط پروتئازها، حفظ اتم مس و ترشح آنزیم مؤثر است [۱۷]. عملیات خالص‌سازی نشان داده است که آنزیم‌های لاکاز از چندین قسمت تشکیل شده اند، محتوای گلیکولیزه شده و گلیکوپروتئینی قارچی به ترکیبات محیط کشت وابسته هستند. جرم مولکولی مونومر در طیف ۱۰۰-۵۰ کیلودالتون می‌باشد. یک ویژگی مهم آنزیم، قسمت قندی آن است که به قسمت پروتئینه به‌صورت کووانسی پیوندیافته و باعث پایداری آنزیم می‌گردد. بسیاری از لاکازهای قارچی، ایزوزیم‌های مشابه آنزیم را ترشح می‌کنند[۷]. این ایزوزیم‌ها از ژن‌های یکسان یا متفاوتی نسبت به آنزیم لاکاز کد می‌شوند. تعداد ایزوزیم‌های موجود بسته به نوع گونه و اینکه القاکننده ویا غیر القایی باشد، فرق می‌کند.

ساختار جایگاه فعال آنزیم لاکاز و سیکل کاتالیزوری آن در شکل (۳) آورده شده است. مس نوع ۱ (T1) به پروتئین رنگ آبی می‌دهد و جایگاهی است که اکسایش سوبسترا رخ می‌دهد. مس‌های نوع ۲ (T2) و نوع ۳ (T3) یک گروه سه هسته‌ای تشکیل می‌دهند که کاهش اکسیژن مولکولی و رهاسازی آب رخ می‌دهد. (ب) نمایی از جایگزینی یک سیکل کاتالیزوری لاکاز که دو مولکول آب از کاهش و یک مولکول اکسیژن مولکولی به‌دست می‌دهد و همزمان، اکسایش چهار مولکول سوبسترا به رادیکال‌های آزاد مربوطه نیز صورت می‌گیرد [۱۸].



شکل ۳- لاکازها: ساختار جایگاه فعال و سیکل کاتالیزوری؛ (الف) مدل گروه کاتالیزوری لاکاز به‌دست آمده از ترامتس چند رنگی شامل چهار اتم مس است.

www.SID.ir

۳-۱ ویژه بودن سوبسترای لاکاز

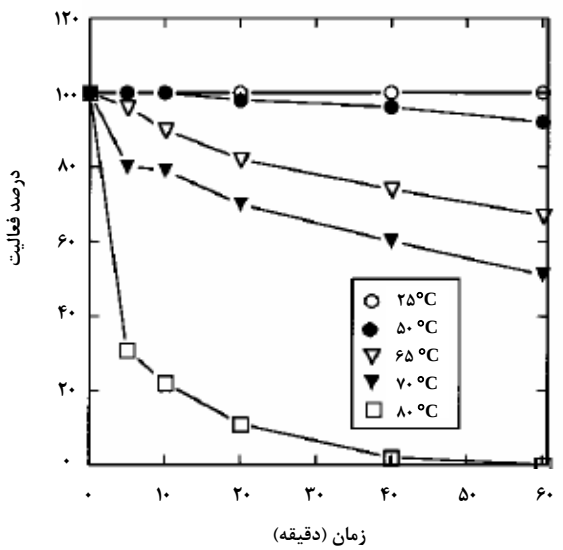
سوبسترای اکسید شونده به‌وسیله یک لاکاز با لاکاز دیگر متفاوت است. این آنزیم‌ها، اکسایش تک الکترونی طیف وسیعی از سوبستراهای آلی و معدنی شامل پلی فنول‌ها و آمین‌های آروماتیک را انجام می‌دهند و باعث کاهش چهار الکترونی اکسیژن به آب می‌شوند [۶]. در مورد داده‌های سینتیکی برای لاکازهای به‌دست‌آمده از منابع مختلف، می‌توان گفت مقادیر K_m برای سوبستراهای مختلف مشابه و در حدود ۱۰-۵ مولار است، ولی V_{max} برای هر لاکاز با توجه به منبعی که از آن به‌دست می‌آید، متفاوت است. ثابت‌های سینتیکی نیز بسته به pH با هم فرق دارند.

۳-۲ تأثیر pH روی پایداری و فعالیت لاکاز

برای لاکازها pH بهینه به‌شدت به سوبسترا وابسته است. به‌طور مثال وقتی که ABTS را به‌عنوان سوبسترا استفاده می‌کند، pH محیط اسیدی و در دامنهٔ ۵-۳ است. در این حالت pH بهینه در حدود ۴ است. این تغییرات ممکن است ناشی از تغییرات در واکنش باشد که به‌دلیل آنزیم، اکسیژن یا سوبسترا است. اختلاف در توان احیا بین سوبسترای فنولی و مس در جایگاه T1 می‌تواند اکسایش سوبسترا در pH بالا را افزایش دهد، ولی آنیون هیدروکسید (OH^-) به اتم‌های مس موجود در جایگاه (T2/T3) متصل می‌شود که این اتصال به‌دلیل بازدارندگی فعالیت لاکاز ناشی از وقفه بین انتقال الکترون داخلی بین مراکز T1 و (T2/T3) می‌باشد. این دو اثر مخالف، نقش مهمی را در تعیین pH بهینه آنزیم‌های لاکاز بازی می‌کند. به‌طور مثال لاکاز تولید شده توسط *ترامتس مودستا*[1] در pH= ۴ به‌طور کامل فعال، و در pH=۴/۵، بسیار پایدار می‌باشد ولی نیمه عمر آن به ۱۲۵ دقیقه در pH= ۳ کاهش می‌یابد [۱۹].

۳-۳ تأثیر دما بر پایداری و فعالیت لاکاز

دمای بهینه لاکاز از یک گونه به‌گونه دیگر بسیار متغیر است به‌طور مثال لاکاز به‌دست آمده از قارچ پیکنوپروس *سینابارینوس*[2] در دماهای کمتر از ۵۰ °C بسیار پایدار است ((u/ml) ۲۴). در ۷۰°C نیمه عمر آنزیم فوق ۶۰ دقیقه است، در حالی‌که در ۸۰ °C آنزیم به‌طور کامل غیر فعال می‌شود. مشخص شده است که گرماگذاری آنزیم مذکور قبل از استفاده در T= ۴۰-۵۰ °C، فعالیت لاکاز را افزایش می‌دهد (شکل (۴)) [۲۰]. روش دیگر که به منظور افزایش پایداری لاکاز استفاده می‌شود، تثبیت آنزیم روی آلومین است که در مواردی که پایداری حرارتی آنزیم اهمیت دارد، نظیر کاربردهای خاص زیست فناوری، می‌توان از روش فوق استفاده کرد[۲۱].



شکل ۴- فعالیت لاکاز خالص شده از *پیکنوپروس سینابارینوس* بعد از گرماگذاری در دماهای مختلف. (فعالیت ۱۰۰ درصد به میزان (u/ml) ۲۴ اشاره دارد)[۱۹].

۳-۴ تأثیر بازدارنده‌ها بر فعالیت لاکاز

نحوه عملکرد لاکازها در مقابل بازدارنده‌ها در بیشتر موارد مشابه است [۲۲]. بسیاری از یون‌ها نظیر هالیدها، سیانیدها، تیوسیانیدها، فلوئوریدها و هیدروکسیدها به مس نوع ۲و۳ متصل می‌شوند که این اتصال سبب وقفه انتقال الکترون داخلی و باعث بازدارندگی فعالیت آنزیم می‌شود. دیگر بازدارنده‌ها شامل یون‌های فلزی (به‌طور مثال Hg^{+2})، اسیدهای چرب، عوامل سولفیدریل، هیدروکسی گلیسین و اسید کوجیک[3] و غیره هستند. برخی ترکیبات باعث شلاته شدن اتم مس می‌شوند. لاکازها به مواد شلاته کننده نظیر EDTA، دی‌متیل گلی‌کسیم[4]، (N,N'-دی متیل دی تیوکاربامات)[5] و NTA حساسیت بالایی دارند و فعالیت کاتالیزوری آنها کاهش می‌یابد.

1. Trametes Modesta
2. Pycnoporus Cinnabarinus
3. Kojic Acid
4. Dimethyl Glyoxime
5. N, N'-Dimethyldithiocarbamate

Archive of SID

www.

۴- تولید لاکاز و فرایندهای آن

آنزیم لاکاز اغلب توسط قارچها بـه‌صـورت بـرون سـلولی در محـیط کشت تراوش می‌شود. تولید لاکاز به شدت به شرایط محـیط کـشت قارچی وابسته است. اغلب در حالت عادی، قارچها لاکاز را در غلظت پایین تولید می‌کنند ولی با افزودن مکمل‌هـای مختلـف بـه محـیط می‌توان به غلظت بالاتری دست یافت. بـه‌طـور مثـال اضـافه کـردن ترکیبات آروماتیـک ماننـد ۵،۲ زایلیـدین و لیگنـین باعـث افـزایش فعالیت لاکاز می‌شود،که ۵،۲ زایلیدین به‌عنوان القاکننـده بیـشترین تأثیر را دارد. اضافه کردن ۱۰ میلـی مـولار از ایـن مـاده بعـد از ۲۴ ساعت گرماگذاری بیشترین القاکنندگی را روی فعالیت لاکاز خواهد داشـت و فعالیـت لاکـاز را تـا ۹ برابـر افـزایش مـی‌دهـد، ولـی در غلظت‌های بالاتر به‌دلیل سمی بودن اثر عکس دارد. غلظـت بـیش از اندازه گلوکوز به‌عنوان منبع کربنی در محیط کشت، اثر بازدارنـدگی روی تولید لاکاز قارچی خواهد داشت، زیرا افزایش در مقدار گلوکـوز محیط کشت باعث یک تأخیر در تولید لاکاز می‌شود. روش سـاده و مؤثر برای غلبه بر این مشکل استفاده از سلولوز به‌عنوان منبع کربن در محـیط کـشت مـی‌باشـد [۱۱]. جـدول (۱) فهرسـتی از میکروارگانیسم‌های تولیدکننده لاکاز و شرایط تولیـد آن را نمـایش می‌دهد.

جدول ۱- بیشینه فعالیت لاکاز به‌دست آمده از قارچ‌های رشته‌ای مختلف در مقیاس راکتور زیستی [۲۳]

نوع قارچ	نوع راکتور	نوع کشت	القاکننده	بیشینه فعالیت آنزیم(U/L)
نروسپورا کراسا[1]	غشایی مؤئینه ای	کشت غوطه ور،تثبیت شده روی تکیه گاه	۱ میکرو مولار سیکلوهگزان	۱۰۰۰۰
ترامتس پوبسنس[2]	همزن دار ۲۰ لیتری	کشت غوطه ور، سلول‌های آزاد خوراک دهی نیمه پیوسته	۲میلی مولار Cu^{2+}	۷۴۰۰۰۰
کریلوس هیرسوتوس[3]	جار تخمیرکنندهٔ ۱۰ لیتری	کشت غوطه ور، سلول‌های آزاد	۰/۲۵ گرم بر لیتر Cu^{2+}	۸۳۸۳۰
پیکنوپروس سانگونوس[4]	بیو استات ۱۵ لیتری	کشت غوطه ور، سلول‌های آزاد	۱۶ میلی مولار وراتریل الکل	۸۱۳۱
پانوس تیگرینوس[5]	همزن دار ۳ لیتری	کشت غوطه ور، سلول‌های آزاد	پساب کارخانه زیتون	۴۶۰۰
ترامتس چند رنگی[6]	بستر ضربانی ۰/۵ لیتری	کشت غوطه ور(دانه ای)	-	۱۶۰۰۰
پلوروتوس استراتوس[7]	خوراک جامد	فرایند لایه ریزان	نیشکر	۳۵۰۰
پیکنوپروس سینابارینوس[8]	راکتور زیستی فاز بخار	حالت جامد	بخار اتانول	۱۰۰۰۰
پلوروتوس استراتوس[9]	راکتور حلقوی هوا بالابر[10] ۵ لیتری	کشت غوطه ور دانه‌ای	پساب کارخانه زیتون	۱۲۰۰
فونالیا تروجی[11]	همزن دار ۲ لیتری	تثبیت شده روی دانه‌های سدیم-آلژینات	-	۱۰۰۰
ترامتس هیرسوتا[12]	راکتور حلقوی هوا بالابر	کشت غوطه ور	گلیسرین، Cu^{2+}	۱۹۴۰۰

1. *Neurospora crassa*
2. *Trametes pubescens*
3. *Coriolushirsutus*
4. *Pycnoporus sanguineus*
5. *Panus tigrinus*
6. *Trametes versicolor*
7. *Pleurotus ostreatus*
8. *Pycnoporus cinnabarinus*
9. *Pleurotus ostreatus*
10. Air Lift
11. *Funalia trogii*
12. *Trametes hirsute*

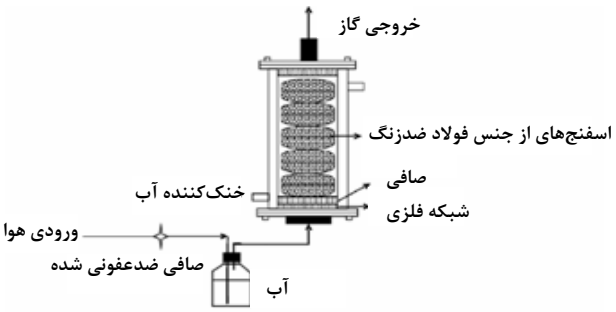
www.SID.ir

بر طبق جدول (۱)، تاکنون تولید لاکاز به روش کشت غیر مداوم، مداوم، نیمه مداوم در حالت سلول‌های آزاد و تثبیت شده گزارش شده است. همچنین انواع فرایندهای غوطه ور و حالت جامد اعمال شده است. در زیر به تشریح برخی از این فرایندها پرداخته می‌شود:

۴-۱ فرایند تخمیر غوطه ور[1]

تولید صنعتی آنزیم‌ها در محیط کشت غوطه ور از معمول ترین روش‌ها است. رشد توده زیستی قارچی تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر انتقال جرم، سرعت متابولیک و ترشح محصول دارد. میسلیوم قارچها می‌توانند اطراف پره‌های همزن بپیچند و نیز باعث انسداد منفذ ورود خوراک شده و گرانروی محیط کشت را افزایش دهند. این مشکلات، عملیات راکتور زیستی را محدود می‌کند. امروزه روش‌های مختلفی برای کنترل رشد قارچها در راکتورهای زیستی به کار می‌روند. در سال ۲۰۰۱ یک سامانه ضربانی گسترش پیدا کرد که امکان کنترل رشد گوی شکل را فراهم می‌کرد. از این طریق مدت انجام فرایند افزایش می‌یافت[۲۴]. قارچهای رشته‌ای به‌صورت طبیعی تمایل دارند که به سطوح مختلف بچسبند. سلول‌های قارچی تثبیت شده نسبت به سلول‌های آزاد برتری‌های زیادی نظیر امکان تکرار کشت ناپیوسته از طریق جدا کردن سلول‌ها از محیط، آسان شدن شرایط کشت پیوسته و مراحل پائین دستی، کاهش گرانروی محیط کشت و افزایش سرعت انتقال جرم و میزان اکسیژن، انعطاف‌پذیری بیشتر نسبت به اغتشاشات محیطی مانند pH یا غلظت مواد شیمیایی سمی، محافظت از سلول‌ها در مقابل آسیب‌های ناشی از تنش، پایداری کمتر ژنتیکی برای تولید گونه‌های نوترکیب دارند [۲۵]. تثبیت سلول بیشتر از طریق به دام انداختن و اتصال انجام می‌شود. هردو روش برای تثبیت سلول‌های قارچهای خاص تولید کنندهٔ لاکاز به کار می‌روند. به‌طور مثال، محققین در سال ۲۰۰۱ نوع خاصی از قارچها را روی یک غشا تثبیت کرده و امکان تولید لاکاز به‌صورت پیوسته برای مدت ۴ ماه بدون غیر فعال شدن آنزیم را فراهم کردند. بهترین ماده‌ای که برای تثبیت سلول‌ها در راکتور زیستی ثابت بستر در شرایط عملیاتی ناپیوسته برای نوع خاصی از قارچ پوسیده سفید پیشنهاد شده است اسفنجی از جنس فولاد ضد زنگ است که بیشترین فعالیت لاکاز را فراهم آورده است (شکل (۵)) [۲۶].

1. Submerged Fermentation



شکل ۵- راکتور ثابت بستر با سلول‌های تثبیت شده بر روی اسفنجی از جنس فولاد ضد زنگ [۲۶]

عامل دیگری که تولید لاکاز را تحت تأثیر قرار می‌دهد دور همزن است. تنش برشی بالا باعث آسیب به میسل‌های قارچی می‌شود. در مقایسه ای که برای تولید محصول و بازدهی لاکاز صورت گرفته سه نوع مختلف راکتور همزن دار، هوا بالا بر و مخزن چرخشی بررسی شده است[۲۳]. نتایج نشان داد که دور همزن و همزدن اثر منفی روی تولید لاکاز دارد و بهترین تولید در راکتورهای هوا-بالابر انجام می‌شود، زیرا تنش کمتری تولید می‌کنند و ساده و قابل اطمینان و ارزان قیمت هستند و می‌توانند به میزان وسیعی در تولید لاکاز به کار روند. تولید لاکاز به‌وسیله قارچهای پوسیده سفید در راکتورهای زیستی در شرایط عملیاتی نیمه پیوسته دارای بازدهی بسیار بالایی است. در این روش امکان کنترل سرعت رشد به‌وسیله تنظیم غلظت سوبسترا وجود دارد و از این طریق می‌توان از سنتز پروتئاز که باعث غیر فعال شدن سریع لاکازها می‌شوند، جلوگیری کرد. در نتیجه می‌توان اصلی‌ترین برتری عملیات نیمه پیوسته را امکان کنترل سرعت واکنش و واکنش‌های متابولیکی به‌وسیله سرعت خوراک‌دهی دانست[۲۷].

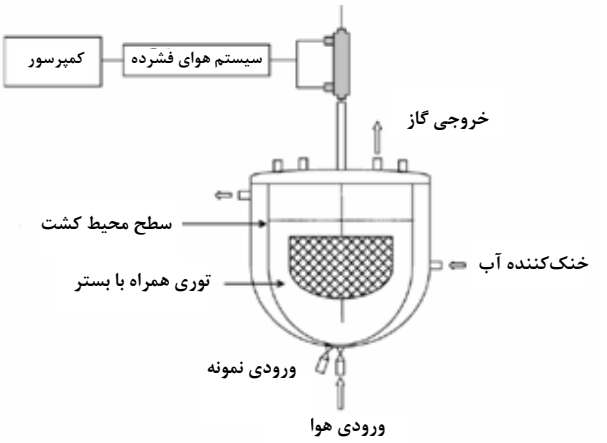
۴-۲ فرایند تخمیر حالت جامد

از آنجا که تخمیر حالت جامد، شرایطی شبیه به شرایط طبیعی رشد قارچها را فراهم می‌کند، این روش برای تولید آنزیم‌ها توسط قارچها مناسب است. از سوی دیگر در این نوع تخمیر، نسبت به حالت غوطه‌ور، بازدهی محصول بالاتر و فرایندهای پایین دستی آن راحت‌تر است. برای چنین شرایطی از سوبستراهای جامد طبیعی به ویژه مواد کشاورزی لیگنوسلولوزی مانند لیگنین، سلولوز و نیمه سلولوزی استفاده می‌شود. که به‌عنوان محرک‌های لاکاز عمل

Archive of SID

www.

می‌کنند. به علاوه، اکثر آنها غنی از قند هستند که به‌دلیل طبیعت آلی شان به‌راحتی توسط میکروارگانیسم‌ها متابولیزه می‌شوند و این امر باعث اقتصادی بودن فرایند می‌شود. با وجود این، استفاده از مواد لیگنوسلولوزی، مشکلات متعددی نظیر تخریب بستر و رشد بیش از اندازه روی بستر که باعث کاهش انتقال اکسیژن و جرم می‌شود نیز دارند. همه این مسائل مانع از عملکرد مناسب راکتور می‌شوند. با وجود همه مزایای فرایندی، سامانه تخمیر جامد نسبت به سامانه غوطه‌ور کمتر به‌کار رفته است، زیرا در سامانه کشت جامد به سختی می‌توان پارامترهای مختلفی چون pH، دما، انتقال اکسیژن، هوادهی، رطوبت و دور همزن را کنترل کرد. مورد آخر یعنی دور همزن اثر زیادی در مورد قارچ‌های رشته ای دارد. برای غلبه بر مشکلات سامانه کشت جامد، طراحی‌های اصلاح شده‌ای از راکتور زیستی صورت گرفته است. در سال‌های اخیر طراحی جدیدی از راکتور زیستی به نام راکتور زیستی غوطه‌ور برای تولید آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ لیگنین تحت شرایط کشت جامد ابداع شد (شکل (۶)). در این راکتور زیستی، آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ لیگنینی با فعالیت بالا به‌دست آمد به‌علاوه امکان انجام فرایند در شرایط پیوسته وجود دارد. در یک تحقیق، عملکرد سه نوع راکتور زیستی (غوطه‌ور، بستر گسترده، سینی‌دار) با سه روش همزدن متفاوت (مکانیکی، نیوماتیک (هوای فشرده) و استاتیک) برای تولید لاکاز تحت شرایط کشت جامد با استفاده از بسترهای خالص و غیرخالص مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که در راکتور زیستی سینی‌دار فعالیت لاکازهای تولیدی بیشترین مقدار است [۲۸].



شکل ۶- راکتور زیستی غوطه‌ور توسعه‌یافته ریولا و همکاران[1] برای تولید لاکاز [۲۸]

۴-۳ فرایند فیلم چکنده[2]

چنین فرایندی بیشتر برای تصفیه پساب به کار می‌رود و قابلیت بالایی برای تولید آنزیم‌های قارچی برون سلولی دارد. در این روش یک سیال به‌صورت پیوسته یا متناوب از روی بستر جامد ثابتی که با میکروارگانیسم‌ها پوشیده شده، عبور می‌کند و به این طریق خوراک تحت اختیار میکروارگانیسم‌ها قرار می‌گیرد. این فرایند امکان برداشت نیمه پیوسته آنزیم را به‌وسیله جایگزینی متناوب محیط کشت در حال رشد مایع فراهم می‌کند. به علاوه، امکان افزایش مقیاس این سامانه نیز وجود دارد. برای غلبه بر این مشکلات سامانه‌های غوطه ور و کشت جامد، مزایای هر دو سامانه را ترکیب کردند، تا مشکل رقت و آب زیاد در کشت غوطه ور و افزایش مقیاس کشت جامد را نداشته باشد [۲۹].

۵- کاربردهای آنزیم لاکاز

۵-۱ صنایع غذایی

بسیاری از سوبستراهای لاکاز مانند کربوهیدرات‌ها، اسیدهای چرب سیرنشده، فنول‌ها و پروتئین‌های شامل تیول، اجزای مهم غذاها و نوشیدنی‌های مختلف را تشکیل می‌دهند. اصلاح آنها توسط لاکاز باعث بهبود کیفیت، عملکرد جدید و کاهش قیمت می‌شود. در صنایع غذایی برای بهبود ظاهر، رنگ غذا یا آشامیدنی از لاکاز استفاده می‌شود. به‌طور مثال، یک کاربرد مفید در این زمینه حذف ترکیبات فنولی مضر از آب میوه‌ها است و در نهایت آب میوه شفاف ایجاد می‌شود. برخی مواقع اکسیژن برای کیفیت و یا ذخیره کردن مواد غذایی یا نوشیدنی‌ها به‌دلیل اکسایش ناخواسته مضر است. به منظور حذف اکسیژن برای بسته بندی بهتر مواد غذایی لاکاز به کار می‌رود. کیفیت طعم و مزه روغن‌های گیاهی را می‌توان از طریق حذف اکسیژن حل شده، توسط لاکاز بهبود بخشید. لاکاز برای حذف اکسیژن از مواد غذایی که به‌صورت جزئی یا کامل از مواد گیاهی استخراج می‌شوند نیز کاربرد دارد. کاکائو را در محلول‌هایی شامل لاکاز، خیسانده، سپس خشک کرده و تفت می‌دهند تا طعم و مزه کاکائو و محصولات کاکائویی را بهبود دهند. همچنین لاکاز برای کم کردن بوهای ناخواسته نیز به کار می‌رود [۳۰]. لاکاز همچنین در پخت نان کاربرد دارد. یک نوع لاکاز به‌دست آمده از قارچ

1. Rivela

2. Trickle-Film Processing

www.SID.ir
Archive of SID

ترامتس هیرسوتا[1] مقاومت خمیر را بالا برده و افزایش حجم آن را کاهش می‌دهد. از دیگر کاربردهای لاکاز در صنایع غذایی می‌توان به زیست پالایش، فرایندهای مربوط به آشامیدنی‌ها، تعیین میزان اسید اسکوربیک و حسگرهای زیستی اشاره کرد [۳۱].

۵-۲ صنعت کاغذ

تولید کاغذ به روش صنعتی نیازمند جداسازی و از بین بردن لیگنین در خمیر چوب است. به این منظور از روش‌های حذف لیگنین بر پایه کلر و یا روشهای سفید کردن استفاده می‌شد که یک روش ناسازگار با محیط است. در ابتدا روش‌های حذف توسط اکسیژن و اکسید کننده‌ها مورد استفاده قرار گرفت، ولی چون استفاده از آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ لیگنین امکان انجام فرایند را در شرایط عملیاتی ملایم‌تر و تولید محصول پاک‌تر را فراهم می‌کرد، امروزه جایگزین روش پیشین شده است.

اگر چه مطالعات بسیاری روی گسترش سامانه‌های سفید کردن سازگار با محیط زیست صورت گرفته است، ولی تعداد کمی از آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ لیگنین توانسته اند جایگزین روش‌های مدرن شیمیایی شوند. یکی از سامانه‌های حذف لیگنین، استفاده از لاکاز همراه با مولکول واسطه به ویژه برای تولید خمیرهای کاغذ مربوط به بسته‌بندی است. برتری‌های آنزیم لاکاز بر آنزیم‌های لیگنین پراکسیداز و پراکسیداز وابسته به منگنز را می‌توان در استفاده آسان‌تر و در دسترس‌تر بودن آن دانست. سامانه لاکاز همراه با مولکول واسطه، توانایی حذف محصولات ناشی از لیگنین را دارد و قادر به تولید خمیر پارچه‌های کتان با کیفیت بالا است و می‌تواند جایگزین روش‌هایی شامل کلر برای ساخت این خمیر گران قیمت شود. از آنجا که لاکاز توانایی تشکیل رادیکال‌های فعال در لیگنین را دارد، در ساخت فیبرهای چوبی و ساخت مواد چندسازه بر پایه لیگنوسلولوز مانند تخته‌های فیبری به کار می‌رود. لاکازها باعث فعال شدن لیگنین در طول ساخت چندسازه می‌شوند، بنابراین در نهایت تخته‌هایی ساخته می‌شوند که خواص مکانیکی خوبی دارند. یک امکان دیگر، استفاده از لاکاز برای بهبود خواص فیزیکی و شیمیایی محصولات فیبری است. لاکاز می‌تواند مشتقات فنولی متفاوتی را با فیبرهای خمیر کاغذ بسته بندی، ترکیب کند. این ویژگی امکان اتصال مواد شیمیایی چند کاره را به سطوح فیبری می‌دهد. از این طریق می‌توان مواد فیبری با خواص جدید از نظرخصوصیت سطحی نظیر آب گریزی، آب دوستی و یا بار به‌دست آورد[۳۲].

۵-۳ صنایع نساجی

صنایع نساجی حدود دو سوم کل مواد رنگرزی و رنگی را استفاده می‌کنند و حجم زیادی آب و مواد شیمیایی را برای فرآیندهای خود به کار می‌برند. معرف‌های شیمیایی مورد استفاده، از لحاظ ترکیب شیمیایی بسیار گسترده اند. رنگ‌ها به‌دلیل ساختار شیمیایی نسبت به نور، آب و مواد شیمیایی مختلف مقاوم اند و اکثر آنها به‌دلیل منشأ سنتزشان به سختی رنگ زدایی می‌شوند. از آنجا که بسیاری از رنگ‌ها از مواد سرطان‌زا مانند بنزیدین و دیگر ترکیبات آروماتیک ساخته شده‌اند، حذف آنها از خروجی صنایع، امری بسیار مهم است و اکثر فرایندهای رایج موجود، برای تصفیه پساب‌های رنگی غیر مؤثر و غیر اقتصادی هستند. بنابراین، استفاده از لاکازها به‌دلیل توانایی آنها در از بین بردن رنگ از دامنه وسیعی از ساختارهای شیمیایی شامل رنگ‌های سنتزی که به‌طور معمول در صنایع استفاده می‌شوند به‌عنوان یک راه حل مناسب محسوب می‌شود. علاوه بر توانایی فوق در صنعت نساجی از لاکاز می‌توان برای سفید کردن منسوجات و حتی ساخت رنگ نیز استفاده کرد. کاربرد صنعتی جدید دیگر لاکاز در ساخت پارچه‌های کتانی راه راه و زبر است [۳۳].

۵-۴ کاربرد در نانوزیست فناوری

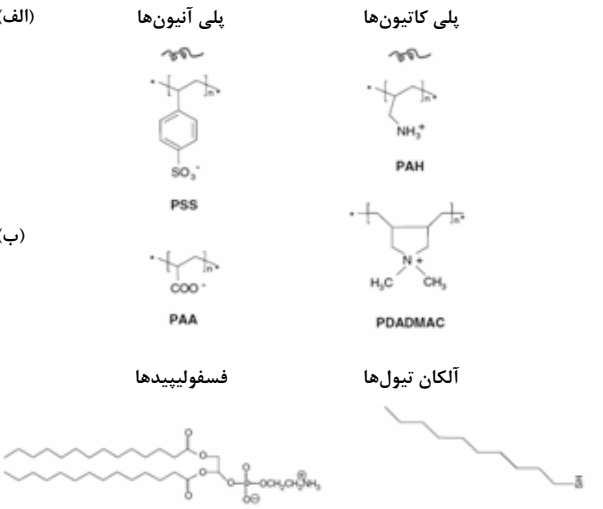
در طول دو دهه گذشته، الکتروشیمی زیستی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. برخی از پیشرفت‌های الکتروشیمی زیستی به‌طور مثال شامل استفاده از لاکاز در طراحی حسگرهای زیستی به‌عنوان آشکارساز در کلینیک‌ها و انجام تحلیل‌های محیطی است [۳۳]. آنجا که لاکازها واکنش‌های انتقال الکترون را بدون هیچ کوفاکتور اضافی کاتالیز می‌کنند، برای آشکارسازی ترکیبات فنولی مختلف و اکسیژن، در چنین حسگرهایی به کار می‌روند. با استفاده از علم نانوفناوری می‌توان حسگرهای فوق را در ابعاد کوچکتر و با بازدهی بیشتر ساخت. که این عمل از طریق رسوب کنترل شده و جذب ویژه مولکول‌های زیستی بر روی انواع مختلف سطوح به منظور به‌دست آوردن ابعاد میکرونی و نانو انجام می‌گیرد. در سال ۱۹۹۵

1. Trametes Hirsuta

Archive of SID

www.

یک روش برای طراحی فیلم‌های چند لایه یونی بسیار نازک با ویژگی‌های در حد میکرون روی سطوح ارائه شد. مولکول‌هایی که به‌طور معمول در این فرایند استفاده می‌شوند، در شکل (۷) آورده شده‌اند [۳۳,۳۴].



شکل۷- (الف) پلی الکترولیت‌ها که برای ساخت چند لایه‌ها به‌دلیل عملکردهای مختلف شان استفاده می‌شوند. PSS: پلی(استایرن سولفونات)، PAA: پلی(آکریلیک اسید)، PAH: پلی (آلیل آمین هیدروکلرید) و PDADMC: پلی (دی آلیل دی متیل آمونیوم کلراید). (ب) فسفولیپید و آلکان تیول‌ها که دارای توانایی ساخت لایه‌ها ی زیستی و تک لایه‌های خود آرا هستند [۳۳].

فرایند فوق یک روش سودمند برای تثبیت لاکاز بر روی یک سطح جامد به منظور گسترش حسگرهای زیستی چند عملکردی است. همچنین کریستال‌های آنزیمی متقاطع[1] لاکاز که از میکروارگانیسم ترامتس چند رنگی به‌دست می‌آیند، نسبت به آنزیم‌های محلول، مزایا و کاربردهای بیشتری در حسگرهای زیستی دارند [۳۵]. علاوه بر حسگرهای زیستی، لاکاز را می‌توان روی کاتد سلول‌ها با سوخت زیستی تثبیت کرد که از این طریق انرژی تولید می‌شود. به‌طور مثال برای سامانه‌های فرستندهٔ کوچک، نظیر سلول‌های سوختی که بازدهی تبدیل انرژی بالایی دارند و در مقایسه با منابع انرژی موجود دیگر، آلودگی کمتری دارند، منبع انرژی مفیدی به ویژه در مقیاس میکرونی هستند. شکل ((۸)-(الف))، سطوح تخت با عملکردهای متفاوتی را نشان می‌دهد که از بسپارها و تک لایه‌های خودآرا[2] تشکیل شده‌اند و به منظور جذب و تثبیت پروتئین‌ها یا دیگر مولکول‌های زیستی به کار می‌روند [۲۲,۳۳,۳۴]. روش خودآرایی لایه به لایه[3] را می‌توان برای ساخت ساختارهای ماکرومولکولی تا نانومتری به کار برد و از این طریق می‌توان به سطوحی با ضخامت به‌طور کامل تعریف شده، دست یافت (شکل (۸)-(الف)). همچنین این فناوری برای ساخت کپسول‌های پلی الکترولیتی توخالی کاربرد دارد. اغلب برای کپسوله کردن آنزیم، از جذب متوالی پلی الکترولیت‌های باردار با بار مخالف روی الگوهای کریستالی آنزیم استفاده می‌شود [۳۳]. مشخص شده است که کپسوله کردن آنزیم بعد از ۱۰ ساعت گرماگذاری همراه با پروتئاز، باعث حفظ صد در صدی فعالیت آن می‌شود. خواص نفوذپذیری کپسول برای عملکرد صحیح آنزیم‌های کپسوله شده، بسیار مهم است. این خواص را می‌توان به‌صورت تابعی از pH و غلظت نمک در نظر گرفت. در pHهای ۸ و بالاتر دیوارهٔ کپسول بسته می‌شود، ولی در pHهای کمتر از ۶، ماکرومولکول‌ها به درون کپسول نفوذ می‌کنند. در واقع دیوارهٔ کپسول به‌صورت برگشت‌پذیر باز و بسته می‌شود. برای گسترش میکرو رآکتورها از این روش همراه با فن لایه به لایه استفاده می‌شود. همچنین از ذرات کلوئیدی پوشیده شده با پلی الکترولیت‌ها و فسفولیپیدها به منظور فعال کردن ویروس سرخجه استفاده می‌شود. چنین سامانه‌ای در شکل ((۸)-(ب)) آورده شده است [۳۳].

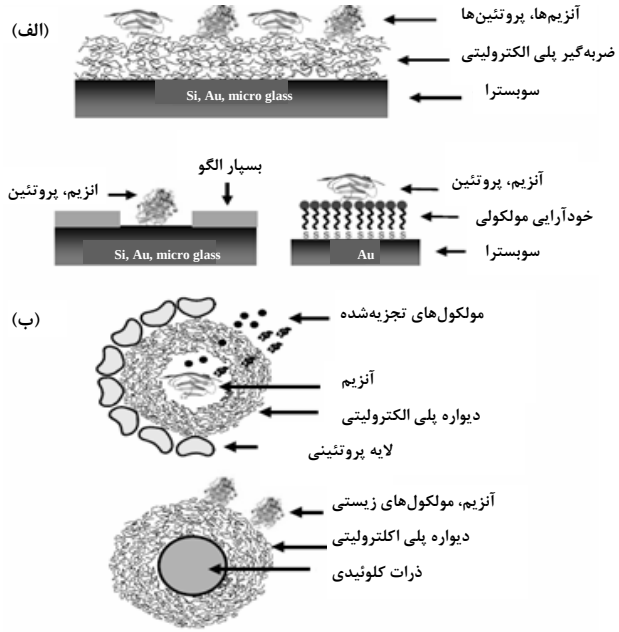
۵-۵ سایر کاربردها

هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای[4] (PAHs) همراه با دیگر مواد مقاوم زیست تخریب‌ناپذیر[5] منبع اصلی آلودگی خاک هستند. بنابراین از بین بردن آنها از اهمیت زیادی برخوردار است. به علاوه، هیدروکربن‌های ناشی از پسماندهای نفتی و مصرف سوخت‌های فسیلی را می‌توان با استفاده از لاکازها تخریب کرد. در سال‌های اخیر، از یک نوع لاکاز خاص، درتثبیت محصولات حاصل از تخریب (۲،۴،۶ تری نیتروتولوئن)[6] استفاده شده است[۳۳].

1. Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC)

2. Self-Assembled Monolayers (SAMs)
3. Layer-by-Layer Technique (LbL)
4. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)
5. Xenobiotics
6. 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT)

www.SID.ir
Archive of SID



شکل ۸- (الف) ساختارهای فوق مولکولی دو بعدی که برای تثبیت مولکول‌های زیستی به‌کار می‌روند: پلی‌الکترولیت‌های چند لایه و تک لایه‌های خود آرایی شونده ریز الگو (SAMs). (ب) ساختارهای فوق مولکولی سه بعدی که از آنها برای ساخت میکروراکتورها و تثبیت مولکول‌های زیستی استفاده می‌شوند [۳۳].

در سال‌های اخیر بیشتر تحقیقات روی کاربرد لاکاز به‌عنوان یک کاتالیزگر زیستی جدید در سنتز مواد آلی متمرکز شده است. با استفاده از لاکاز، فرایند تولید بسپار در هوا بدون استفاده از هیدروکسید هیدروژن انجام می‌شود. لاکاز می‌تواند بسپارش رادیکالی آکریل آمید را بدون حضور واسطه و یا با واسطه تحریک کند. همچنین لاکاز، برای بسپارش ترکیبات فنولی و آمینوی مختلف به کار می‌رود. به‌طور کلی لاکاز را برای سنتز ترکیبات آلی با عملکرد مختلف نظیر تولید بسپارهایی با خواص نوری، الکتریکی، مکانیکی خاص، صنایع رنگ، محصولات آرایشی و حشره کش‌ها و علف کش‌ها به کار می‌برند [۳۳]. بسیاری از محصولات تولید شده توسط لاکازها ضد میکروب و ضد مسمومیت هستند. همچنین لاکاز در سنتز ترکیبات پیچیدهٔ پزشکی مانند داروی بیهوشی، آنتی‌بیوتیک‌ها و مسکن‌ها به کار می‌رود. یکی دیگر از کاربردهای لاکاز در تولید در محل یُد[1] به‌عنوان یک داروی ضدعفونی‌کننده می‌باشد[۳۰].

1. Iodine

۶- نتیجه‌گیری

لاکازها داری خواص گسترده ای هستند و توسط طیف وسیعی از گیاهان، قارچ‌ها و باکتری‌ها تولید می‌شوند. فعالیت‌های آنزیمی لاکازها در میکروارگانیسم‌های مختلف با یکدیگر فرق می‌کند. لاکاز اکسایش ترکیبات فنولی را کاتالیز می‌کند، ضمن اینکه به‌صورت همزمان اکسیژن مولکولی را به آب احیا می‌کند. توانایی کاتالیزوری لاکاز، کاربردهای زیادی شامل صنایع کاغذ و خمیر، تصفیه پساب‌های صنعتی مختلف، رنگ بری آنزیمی مواد و زیست پالایش را سبب شده است. به‌طور کلی شرایط محیطی (القا کننده‌های مناسب، ترکیب محیط خوراک، هوادهی، همزدن و غیره)، روش‌های کشت و طراحی راکتور زیستی باید برای تولید بیشتر لاکاز مدنظر قرار گیرد. فرآیند نیمه مداوم، هوادهی ملایم و اضافه کردن مس به محیط کشت باعث تولید بهتر لاکاز در مقیاس صنعتی می‌شود. در هر مورد، انتخاب شرایط بهینه به‌گونه و هدف مورد نظر بستگی دارد. از طرف دیگر، با وجود مزایای فرایند کشت حالت جامد، باید مطالعات بیشتری بر روی طراحی صنعتی این سامانه صورت گیرد تا بتواند با روش تخمیر غوطه ور رقابت کند. اگرچه در این مقاله بحث نشده است، ولی بیان بیش از حد لاکاز نوترکیب در سامانه‌های ناهمگن برای تولید بیشتر لاکازهای قارچی همچنین بهبود فعالیت کاتالیزوری و پایداری آن در سال‌های گذشته بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است[۳۶].

مراجع

[1] Rodriguz Couto S., Toca-Herrera J.L., "Laccase production at reactor scale by filamentous fungi", Biotechnology Advances, 25, 558-569, (2007).

[2] Kiiskinen L.L., Palonen H., Linder M., Viikari L., Kruus K., "Characterization and heterologous production of a novel laccase from Melanocarpus albomyces", FEBS Letters 576, 251-255, (2004).

[3] Diamantidis G., Effosse A., Potier P., Bally R., "Purification and characterization of first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium Azospirillum lipeferum", Soil Biology and Biochemistry, 342, 919-927, (2000).

[4] Martins L.O., Soares C.M., Pereira M.M., Teixera M., Costa T., Jones G.H., Henriques A.O., "Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the Bacillus subtilis endospore coat", J. Biological Chemistry, 277, 18849-18859, (2002).

Archive of SID

[5] Suzuki T., Endo K., Ito M., Tsujibo H., Miyamoto J., Inamori Y., "A thermostable laccase from Streptomyces lavendulae REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression", Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 67, 2167, (2003).

[6] Thurston C.F., "Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus Pycnoporus cinnabarinus", Microbiology, 140, 19-26, (1994).

[7] Alcalde M., "Laccases: biological functions, molecular structure and industrial applications. In: Industial Enzymes", Edited by J. Polaina, A.P. MacCabe, Springer Press, Heidelberg, pp.461-476, (2007).

[8] Bourbonnais R., Paice M.G., "Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator", Tappi J., 79, 199, (1996).

[9] Kersten P.J., Kalyanaraman B., Hammel K.E., Reinhammar B., Kirk Y.K., "Comparison of lignin peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes", Biochemical J., 268, 475, (1990).

[10] Evans C.S., Hedger J.N., "Degradation of plant cell wall polymers, fungi in bioremediation", British Mycological Society. Cambridge Univ. Press., UK, (2001).

[11] Eggert C., Temp U., Erikson K.E.L., "The ligninolytic system of the white rot fungus Pycnopotus cinnabarinus: purification and characterization of the laccase", Applied and Environmental Microbiology, 62, 1151, (1996).

[12] Banci L., Ciofi-Baffoni S., Tien M., "Lignin and Mn peroxidase-catalyzed oxidation of phenolic lignin oligomers", Biochemistry, 38, 3205, (1999).

[13] Hildén L., Johansson G., Pettersson G., Li J., Ljungquist P., Henriksson G., "Do the extracellular enzyme cellobiose dehydrogenase and manganese peroxidase form a pathway in lignin biodegradation?", FEBS letters, 477, 79-83, (2000).

[14] Camarero S., Ibarra D., Martinez M.J., Martinez A.T., "Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes", Applied and Environmental Microbiology, 71, 1775, (2005).

[15] Scott S.L., Chen W.J., Bakac A., Espenson J.H., "Spectroscopic parameters, electrodes potentials, acid ionization contants, and electron exchange rate of the 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radicals and ions", J. Physical Chemistry, 97, 6710, (1993).

[16] Call H.P., Mucke I., "History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems", J. Biotechnology, 53, 163, (1997).

[17] Li K., Xu F., Erikssen K. E. L., "Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound", Applied and Environmental Microbiology, 65, 2654, (1999).

[18] Rivo S., "Laccases: blue enzymes for green chemistry", Trends in Biotechnology, 24, 2-8, (2006).

[19] Nyanhongo G.S., Gomes J., Gubitz G., Zvauya R., Read J.S., Steiner W., "Production of laccase by a newly isolated strain of Trametes modesta", Bioresource Technology, 84, 259, (2002).

[20] Chefetz B., Chien Y., Hadar, T., "Purification and characterization of laccase from Chaetomium thermophilium and its role in humification", Applied and Environmental Microbiology, 64, 3177, (1998).

[21] M.Mayer A., C.Staples R., "Laccase: new functions for an old enzyme", Phytochemistry, 60, 551-565,(2002).

[22] Bollag J.M., Leonowicz A., "Comparative studies of extracellular fungal laccases", Applied Environmental Microbiology, 48, 849, (1984).

[23] Couto S.R., Toca-Herrera J.L., "Laccase production at reactor scale by filamentous fungi", Biotechnology Advances, 25, 558–569, (2007).

[24] Blánquez P., Casas N., Font X., Gabarrell M., Sarrá M., Caminal G., "Mechanism of textile metal dye biotransformation by Trametes versicolor", Water Research 38, 2166–72, (2005).

[25] Caunt P., Impoolsup A., Greenfield P.F., "Stability of recombinant plasmids in yeast", J. Biotechnology, 8, 173-192, (1988).

[26] Rodriguez C.S., Sanroman MA., Hofer D., Gubitz GM., " A novel carrier for the immobilization of the white-rot fungus trametes hirsute for decolourisation of textile dyes", Bioresource Technology, 95, 67-72, (2004).

[27] Galhaup C., Wagner H., Hinterstoiaaer B., Haltrich D., "Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete Trametes pubescens enzyme", Microbiology Technology, 30, 520-536, (2002).

[28] Rodriguz C.S., Moldes D., Liebanas A., Sanroman A., "Investigation of several bioreactor configurations for laccase production by Trametes versicolor operating in solid-state conditions", Biochemistry Engineering J., 15, 21-26, (2003).

[29] Lenz J., Holker U., "Trickle-film processing: an alternative for producing fungal enzymes", Biofourm Europe, 6, 55-57,(2004).

[30] Kunamneni A., Plou F., Ballesteros A., Alcalde M., "Laccase and their applications: a patent review", Recent patents on biotechnology. 2, 10-24, (2008).

[31] Minussi R.C., Pastore G.M., Durin N., "Potential applications of laccase in the food industry", Trends Food Science Technology,13, 205-216,(2002).

Archive of SID

www.SID.ir

[32] Lund M., Ragauskas A.J., "Enzymatic modification of Kraft lignin through oxidative coupling with water-soluble phenols", Applied Microbiology Biotechnology, 55, 699-703, (2001).

[33] Couto S.R., Touca-Herrera J.L., "Industrial and biotechnological applications of laccases", Biotechnology Advances, 4, 500-513, (2006).

[34] Hammond P.T., Whitesides G.M., "Formation of polymer microstructures by selective deposition of polyion multilayers using patterned self-assembled monolayers as a template", Macromolecules, 28, 7569-7571, (1995).

[35] Gupta G., Rajendran V., Atanassov P., "Laccase biosensor on monolayer-modified gold electrode", Electroanalysis, 15, 2-4, (2003).

[36] Chhaya U., Gupte A., "Optimization of media components for laccase production by litter dwelling fungal isolate Fusarium incarnatum LD-3", J. Basic Microbiology, 50, 43-51, (2010).

Archive of SID