

## بررسی فعالیت و پایداری آنزیم لاکاز آزاد تثبیت شده در حضور

### کانی‌های مونتموریلونیت و زئولیت

حدیثه رحمانی، امیر لکزیان<sup>1</sup>، علیرضا کریمی و اکرم حلاج نیا

دانشجوی دکتری گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد؛ ha.rahmani@stu.um.ac.ir

استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد؛ lakzian@um.ac.ir

دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد؛ karimi-a@um.ac.ir

استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد؛ halajnia@ferdowsi.um.ac.ir

دریافت: 94/8/20 و پذیرش: 95/7/12

#### چکیده

آنزیم لاکاز از گروه مهم‌ترین آنزیم‌هایی است که در سال‌های گذشته به سبب توانایی آن در اکسید کردن ترکیب‌های گوناگون و آلانده‌های محیطی پایدار، نگاه بسیاری را در زمینه زیست بهسازی به سوی خود جلب کرده است. با نگاه به پایداری کم و هزینه‌های ساخت و فراوری بالای آنزیم‌ها، بی‌جنب‌سازی آنها بر رویه نگهدارنده‌ها می‌تواند راهی شایسته در راستای افزایش پایداری کارکرد آنزیم باشد. برای بررسی برهم‌کنش لاکاز گرفته شده از قارچ *ترامتس ورسیکالر* (*Trametes versicolor*) با کانی‌های مونتموریلونیت و زئولیت سه آزمایش جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تکرار در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. آزمایش‌ها به ترتیب شامل چهار سطح pH (5، 6، 7 و 8) نه سطح دمایی (4 و 80-10 درجه سانتیگراد) و هفت سطح زمان انکوباسیون (صفر، 1، 2، 5، 10، 20 و 30 روز) بودند. بر پایه آزمایش نخست، بالاترین اندازه جذب آنزیم بر رویه‌های کانی‌های بررسی شده در pH=5 دیده شد و با افزایش pH جذب آنزیمی کاهش یافت. در آزمایش دوم، بالاترین اندازه فعالیت نسبی برای لاکاز آزاد در دمای 20 درجه سانتیگراد، برای لاکاز بی‌جنب‌شده بر مونتموریلونیت در دماهای 80 و 4 درجه سانتیگراد و برای لاکاز بی‌جنب‌شده بر زئولیت در دماهای 4 و 70 درجه سانتیگراد بود. لاکاز بی‌جنب‌شده پایداری خوبی را در برابر دماهای پایین و بالا نشان داد. در آزمایش سوم، بالاترین اندازه فعالیت نسبی (100 درصد) برای لاکاز بی‌جنب‌شده بر مونتموریلونیت و زئولیت در زمان انکوباسیون 20 روز و برای لاکاز آزاد در زمان 5 روز دیده شد. بر پایه این پژوهش، بی‌جنب‌سازی پیامد شایسته‌ای را بر پایداری فعالیت آنزیم لاکاز نشان داد.

واژه‌های کلیدی: پایداری، زئولیت، بی‌جنب‌سازی، فعالیت، لاکاز و مونتموریلونیت

<sup>1</sup> نویسنده مسئول، آدرس: مشهد، میدان آزادی، دانشگاه فردوسی، دانشکده کشاورزی، گروه مهندسی علوم خاک

## مقدمه

خاک محیط پیچیده و پویایی است که رخدادهای شگرفی در هر بخشی از زمان در بخش‌های گوناگون آن روی می‌دهد. در این میان، واکنش‌هایی که میان ترکیب‌های آلی خاک و کانی‌های گوناگون رخ می‌دهد، نگاه بسیاری را به سوی خود کشیده است. آنزیم‌های خاک از مهمترین ترکیب‌های پروتئینی هستند که بسیاری از پژوهشگران به بررسی آنها پرداخته‌اند.

از گروه مهمترین آنزیم‌هایی که در سال‌های گذشته نگاه بسیاری از پژوهشگران را به سوی خود کشیده است، آنزیم لاکاز آزاد و بی‌جنش شده می‌باشد. بیشتر این کارها وابسته به توانایی ویژه این آنزیم‌ها در اکسید کردن ترکیب‌های فنولی و غیر فنولی گوناگون و همچنین آلانده‌های محیطی بسیار پایدار است که آنها را برای کاربرد در فرآیندهای گوناگون بیوتکنولوژیکی بسیار شایسته می‌سازد (رودریگز-کوتو و توکا-هررا، 2006). کارایی بالای آنزیم لاکاز بر گروه گسترده‌ای از بسته‌های گوناگون و توانایی آن برای اکسید کردن بسیاری از آلانده‌ها، نشان داده است که این یک آنزیم ویژه و برتر برای کاربرد در زیست‌بهبودی و پاکسازی خاک از علف‌کش‌ها، آفت‌کش‌ها و مواد زاینباراست (جیا و همکاران، 2012؛ رودریگز-کوتو و توکا-هررا، 2006).

لاکازها (EC 1.10.3.2،  $p$ -دی‌فنل: دی‌اکسیژن اکسیدورداکتاز) (فریر و همکاران، 2001)، از گروه اکسیدازهای آبی و بزرگترین زیرگروه از اکسیدازهای چند مسی هستند (فرناندز-فرناندز و همکاران، 2013). لاکاز یک آنزیم مونومری با وزن مولکولی نزدیک 70kDa (کیلو دالتن) می‌باشد (پیونکت و همکاران، 2002). این آنزیم، اکسیداسیون گروه گسترده‌ای از ترکیب‌های آلی مانند متوکسی‌فنل‌ها، فنل،  $o$ - و  $p$ -دی‌فنل‌ها، آمینوفنل‌ها، پلی‌فنل‌ها، پلی‌آمین‌ها و مولکول‌های لیگنین دارای  $m$ ،  $o$ ،  $p$ -کوئینون‌ها یا گونه‌های رادیکالی را انجام می‌دهد (فریر و همکاران، 2001) بدون اینکه نیاز به پراکسید هیدروژن همانند سوپسترای همراه یا هر گونه کوفاکتوری برای فعالیت کاتالیتیکی خود داشته باشد (آدورسیو و همکاران، 2013). بنابراین آنزیم لاکاز از جایگاه ویژه‌ای در فرآیندهای گوناگون همچون تجزیه لیگنین (کامارو و همکاران، 2002) و یا فرآیندهای محیطی گوناگون دیگر (سرونه و همکاران، 2011، ماجتو و همکاران، 2010) برخوردار باشد. همچنین، توانایی این آنزیم در تجزیه ترکیب‌های فنولی، لاکازها را ابزارهایی شایسته‌ای برای تجزیه ترکیب‌های سخت تجزیه شونده و زیست بیگانه در تیمار فاضلاب‌ها ساخته است (فرناندز-فرناندز و

همکاران، 2013). در این راستا، لاکاز بدست آمده از قارچ *Trametes versicolor*، یکی از پرکاربردترین آنزیم‌ها در فرآیندهای گوناگون می‌باشد (پلاگمن و همکاران، 2011؛ کابنا و همکاران، 2011؛ کورنیواتی و نایسل، 2008؛ گو و همکاران، 2008). گزارش شده است که لاکازهای قارچی سه کارکرد می‌توانند داشته باشند ساخت رنگدانه، تجزیه لیگنین و زهر زدایی (لوئرا و همکاران، 2006). لاکازها، با داشتن فعالیت بالا، گزینش‌پذیری و اختصاصی بودن، که امکان انجام فرآیندهای شیمیایی پیچیده را تحت شرایط آزمایشگاهی و طبیعی برای آنها فراهم می‌آورد، کاتالیزورهای زیستی عالی برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی و محیطی هستند (ماتو و همکاران، 2007). در برابر آنها، بهره‌گیری از این آنزیم‌ها به سبب پایداری پایین آنها و هزینه‌های ساخت و فرآوری بالایی که دارند، همچنان برای کاربردهای عملی اندک است (رکوک و همکاران، 2009؛ هیو و همکاران، 2007) و بهره‌گیری از آنزیم‌ها در مقیاس صنعتی، به سبب برخی کمبودهای ناشی از منشا زیستی آنها، همیشه آسان نیست (آدورسیو و همکاران، 2013).

آنزیم‌ها قابل انحلال هستند و نمی‌توانند به آسانی در چرخه‌های واکنشی دوباره، بکار روند (آدورسیو و همکاران، 2013). همچنین، آنها کاملاً در دهامای بالا، pH بسیار زیاد یا بهره‌گیری از کمک-حلال‌های آلی یا زهری، ناپایدار هستند (آدورسیو و همکاران، 2013). در این میان، بی‌جنش‌سازی لاکازها می‌تواند برخی از دشواری‌های یاد شده را از راه بهبود برخی از ویژگی‌های آنزیم از میان بردارد (کونامنی و همکاران، 2008). بی‌جنش‌سازی یک آنزیم با پیوند آن آنزیم به یک تکیه‌گاه نامحلول انجام می‌شود (آریکا و همکاران، 2009). از برتری‌های بی‌جنش‌سازی لاکاز می‌توان افزایش پایداری دمایی آنزیم و پایداری آن در برابر شرایط افراطی و واکنشگرهای شیمیایی را یاد نمود (فرناندز-فرناندز و همکاران، 2013). افزون بر آن، لاکازهای بی‌جنش شده می‌توانند به آسانی از محصولات واکنش جدا شوند، که این امر به آنزیم‌ها این امکان را می‌دهد تا در فرآیندهای پیوسته در راکتورهای زیستی دوباره به کار گرفته شوند (آریکا و همکاران، 2009؛ گیورگیوا و همکاران، 2008؛ آرویو، 1998). در برابر آنها، فرآیندهای بی‌جنش‌سازی می‌توانند مایه دگرگونی ساختاری آنزیم، غیریکنواختی آنزیم بر روی تکیه‌گاه جاذب و از دست دادن فعالیت آنها شود (آرویو، 1998). به هر گونه، این فرآیند راهی را برای سفارشی کردن ویژگی‌های آنزیم برای کاربردهای ویژه آن می‌تواند باشد (کریجووسکا، 2009).

در آلودگی زدایی از خاک‌های آلوده و محیط‌های آبی داشته باشند (نیجا و همکاران، 2000). با نگاه به آنچه که آمد و نیز پژوهش‌های انجام شده، بی‌جنبش‌سازی آنزیم لاکاز بر روی برخی از رویه‌های جذبی، نه تنها می‌تواند پایداری عملکردی و ماندگاری لاکاز را افزایش دهد، بلکه می‌تواند با دگرگونی برخی ویژگی‌های این آنزیم، پیامد آن را بر تجزیه آلاینده‌ها افزایش دهد. بنابراین، تلاش‌های بسیاری برای بی‌جنبش‌سازی آنزیم لاکاز انجام شده است (وانگ و همکاران، 2013).

بر پایه آنچه که یاد شد و با توجه به پایداری کم آنزیم محلول و نیاز به دستیابی به کاتالیزورهای پایدارتر، فعالیت و پایداری آنزیم لاکاز گرفته شده از قارچ *Trametes versicolor* به صورت آزاد و ورسیکالر (*Trametes versicolor*) به صورت آزاد و بی‌جنبش شده بر روی کانی‌های مونتوریلونیت و زئولیت بررسی شد. همچنین، از مهمترین اهداف این پژوهش، غیرمترجم‌سازی آنزیم لاکاز جهت کاربرد در مصارفی چون پالایش خاک از آلاینده‌های آلی بود.

#### مواد و روش‌ها

فعالیت و پایداری آنزیم لاکاز گرفته شده از قارچ *Trametes versicolor* ورسیکالر (*Trametes versicolor*) آزاد و بی‌جنبش شده بر روی کانی‌های مونتوریلونیت و زئولیت، با بهره‌گیری از آزمایش‌های جداگانه بررسی شد. برای انجام این آزمایش‌ها، آنزیم لاکاز ناب گرفته شده از *T.versicolor* EC. 1.10.3.2، با کارایی ویژه بیش از 10U بر میلی‌گرم جامد (پودری)، 2 و 2-آزینوبیس (3-اتیل بنزوتیازولین-6-سولفونیک اسید)<sup>3</sup> (ABTS) و کانی مونتوریلونیت ناب (پودر شده) با رویه ویژه  $270\text{m}^2/\text{g}$ ، از شرکت سازنده مواد شیمیایی سیگما آلدریچ خریداری گردیدند. کانی زئولیت معدن سمنان تا اندازه‌ای ناب، از شرکت کهربا در شهر تهران خریداری شد و سپس خرد و آسیاب گردید. تصاویر SEM<sup>4</sup> از هر دو کانی بررسی شده در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد آماده شد.

**بی‌جنبش‌سازی آنزیم لاکاز بر روی کانی‌های مونتوریلونیت و زئولیت در pHهای گوناگون**

برای بررسی اثر pHهای گوناگون بر جذب آنزیم لاکاز روی کانی‌های مونتوریلونیت و زئولیت، کمپلکس‌های لاکاز-کانی رسی در pHهای گوناگون آماده گردیدند. بی‌جنبش‌سازی برپایه روش روجیرو و همکاران (1989) و جاینفردا و بولاگ (1994) بر روی کانی‌های

آنزیم لاکاز تاکنون به روش‌های گوناگونی بی‌جنبش شده است. در برخی از این روش‌ها، آنزیم را از راه سیستم‌های گوناگون مانند به دام انداختن در پلی‌مرهای گوناگون همانند آلجینیت (وانگ و همکاران، 2013؛ بازارلی‌اوغلو و همکاران، 2010)، دندریمرها که از پلی (آمیدو آمین)<sup>1</sup> (PAMAM) (کردوزو و همکاران، 2012) یا ژلاتین (اینال و بازارلی‌اوغلو، 2011) بهره‌گیری می‌کنند، آماده‌سازی سیستم‌های گوناگون همانند لیپوزوم‌ها (پرووتو و فوکه، 2012)، میکروکپسول‌ها (ساوولاین و همکاران، 2011) یا توده‌های آنزیمی دارای اتصال عرضی<sup>2</sup> (CLEAs) (ماتجوسیت و همکاران، 2010)، بی‌جنبش نموده‌اند. هرچند، سیستمی که بیشتر بکار رفته است، بهره‌گیری از تکیه‌گاه‌های جذبی گوناگون برای بی‌جنبش‌سازی آنزیم را شامل می‌شود (آدورسیو و همکاران، 2013). گستره وسیعی از تکیه‌گاه‌ها وجود دارند که برای بی‌جنبش‌سازی بهره‌گیری شده‌اند، همانند مهره‌های آمربلیت IR-120H (اسپینلی و همکاران، 2013) غشاهای آنزیمی (چئا و همکاران، 2012)، ریزلوله‌های کربنی اکسیده و اکسیدهای گرافن (پارک و همکاران، 2012؛ تورتولینی و همکاران، 2012)، رزین‌های سولفو پلی‌استر (ویرتان و همکاران، 2012)، رزین‌های تبادل (ژانگ و همکاران، 2012)، نانوذرات مغناطیسی (کالکان و همکاران، 2012؛ بایرام‌اوغلو و همکاران، 2010a,b) و کانی‌های رسی گوناگون (وانگ و همکاران، 2013؛ نیجا و همکاران، 1997؛ لئونوویز و همکاران، 1988؛ شاتل ورث و بولاگ، 1986).

برخی نتایج گزارش شده بیان می‌کنند که پایداری پدید آمده در بی‌جنبش‌سازی، نزدیک 10-15 برابر بهتر از آنزیم محلول است (کابنا و همکاران، 2011؛ کاراگوز و همکاران، 2011). در اینمیان، آنزیم‌هاوکانی‌های رسی و برهمکنش‌های آنها، کارکرد ویژه‌ای را در دگرگونی ترکیب‌های آلی طبیعی یا ساخت دست بشر در خاک دارند (نیجا و همکاران، 2000). به هر گونه، سرشت برهم‌کنش‌های آنزیم با بخش‌های خاک همچنان روشن نیست. فعالیت‌های گسترده کشاورزی و صنعتی، می‌تواند به پیدایش مواد گوناگون زیانبار برای جانداران به درون محیط‌های خاک و زیرزمینی شوند که بیشتر آنها ترکیبی از مولکول‌های پایدار می‌باشند (فیلیپوکلووس، 1995). افزون بر کارکرد ریزجانداران در فرآیندهای زیست‌بهبودی، هم آنزیم‌ها و هم کلونیدهای کانی فعال، چه جداگانه و چه در پیوند باهم، می‌توانند کارایی ویژه‌ای را

3. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)

4. Scanning Electron Microscopy

1. Polyamidoamine

2. Cross-linked enzyme aggregates

$\Delta E$  برابر با افزایش جذب در هر دقیقه،  $V_t$  و  $V_s$  به ترتیب برابر با حجم کل و حجم نمونه در کورت (میلی لیتر) و ضریب جذب ( $\epsilon_{420}$ ) برابر با 36000 لیتر بر مول در سانتیمتر می‌باشد.

#### بررسی پایداری آنزیم‌های لاکاز آزاد و جذب شده بر رویه‌های کانی‌ها

برای بررسی پایداری آنزیم‌های لاکاز آزاد و جذب شده، دو آزمایش جداگانه، با در نظر گرفتن شرایط بهینه تعیین شده، در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. بی جنبش‌سازی آنزیم برپایه روش روجیرو و همکاران (1989) و جاینفردا و بولاگ (1994) انجام شد؛ به گونه‌ای که در بخش پیش یاد گردید. پیامد فاکتورهای آزمایشی که به ترتیب شامل نه سطح دمایی (4 و 80-10 درجه سانتیگراد) و هفت سطح زمان انکوباسیون (صفر، 1، 2، 5، 10، 20 و 30 روز) بودند، بر فعالیت آنزیم آزاد و بی جنبش شده در دو کانی مونتموریلونیت و زئولیت، در دو آزمایش جداگانه بررسی شدند. لازم به ذکر است که نمونه‌های آنزیم-رس برای انجام آزمایش‌های ذکر شده، در داخل بافر نگهداری شدند و محل نگهداری آنها در آزمایش سوم (زمان انکوباسیون) داخل یخچال و دمای 4 درجه سانتیگراد بود. برای تمامی آزمایش‌ها، نمونه‌های محتوی آنزیم لاکاز آزاد (فاقد رس) نیز در نظر گرفته شد.

#### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لاکاز

فعالیت لاکاز آزاد و بی جنبش شده در دمای اتاق با بهره‌گیری از بسته ABTS (2-2-آزینوبیس (3-اتیل بنزوتیازولین-6-سولفونیک اسید)) تعیین شد (لو و همکاران، 2007). واکنش با افزودن یک میلی لیتر از ABTS یک میلی مولار به مقدار مناسب از بافر 0/1 مولار فسفات یا استات (با pH بهینه برای لاکاز آزاد یا بی جنبش شده) که خود دارای اندازه ویژه‌ای از لاکاز آزاد یا بی جنبش شده بود، آغاز گردید. مقدار لاکاز آزاد و بی جنبش شده به نحوی انتخاب شد که جذب محصول واکنش در دامنه خطی دستگاه اسپکتروفوتومتر مورد بهره‌گیری در آزمایش (مدل WPA S2000UV/Vis) قرار گیرد. اکسیداسیون ABTS با افزایش جذب در 420 نانومتر دنبال شد. لازم به ذکر است که مدت زمان انجام واکنش آنزیمی 10 دقیقه بود. نمونه شاهد برای هر دو آنزیم آزاد و بی جنبش شده، محتوی مقادیر یکسانی از لاکاز طبع برگشته (دنا توره شده) تحت گرما بود. لاکاز دنا توره شده در گرما، از راه جوشاندن آنزیم آزاد در 100 درجه سانتیگراد برای 10 دقیقه بدست آمد.

مونتموریلونیت و زئولیت انجام شد. در این کار، 200 میلی گرم کانی در دمای 45 درجه سانتیگراد با 5 میلی لیتر از  $HNO_3$  0/5 نرمال به مدت 2 ساعت تکان داده شد و سپس در 13000g سانتریفوژ شده و با آب مقطر شسته شد. پس از رسیدن محلول رویی به pH خنثی، 5 میلی لیتر از 3-آمینو پروپیل تری اتوکسی زیلان 2 درصد ساخته شده در استون ناب به آن افزوده شد و این سوسپانسیون یک شب در دمای 45 درجه سانتیگراد تکان داده شد. سپس نمونه‌ها سانتریفوژ شدند و فاز جامد با 5 میلی لیتر از محلول گلو تار آلدهید 5 درصد در بافر 0/1 مولار (pH معادل با 5 استات سدیم و pH‌های بالاتر از 5 فسفات سدیم) با pH بررسی شده (pH‌های 5، 6، 7 و 8) تیمار شده و برای زدودن حباب‌های هوای به دام افتاده، در دسیکاتور خلا گذاشته شد و در دمای اتاق برای 1 ساعت نگهداری گردید.

گلو تار آلدهید ترکیبی بسیار عالی برای اتصال عرضی معرفی شده است که منجر به حل نشدن و ماندگاری ترکیبات پروتئینی شده و نسبتاً، تثبیت ساختار سلولی بدون تغییر شکل را منجر می‌شود. در عین حال، فعالیت آنزیمی به نحو قابل توجهی حفظ می‌گردد (حبیب و هیراموتو، 1968). گلو تار آلدهید آزاد از طریق 2 بار شستشو با 5 میلی لیتر از هر یک از آب مقطر و بافر فسفات زدوده شد. دو میلی لیتر محلول بافر با pH‌های آزمایشی دارای 1 میلی گرم آنزیم به رس تیمار شده معلق در بافر افزوده شد. این سوسپانسیون برای 24 ساعت در دمای 25 درجه سانتیگراد تکان داده شد و کانی از راه سانتریفوژ بازیافت و با بافر شسته شد تا زمانی که در محلول‌های شستشو، فعالیت لاکاز دیده نشد. دوباره نمونه‌ها در بافر معلق شده و تا زمان بهره‌گیری در دمای 4 درجه سانتیگراد نگهداری شدند (آن و همکاران، 2002). مقدار لاکاز پیوند شده فعال بر رویه‌های کانی‌ها از تفاوت بین مقدار فعالیت اولیه آنزیمی با فعالیت در محلول رویی سوسپانسیون‌ها در هر نمونه آزمایشی به دست آمد (لای و همکاران، 2013). درصد فعالیت نسبی نیز بر اساس فعالیت نسبی اندازه‌گیری شده در تیمارهای مختلف نسبت به فعالیت نسبی پیشینه اندازه‌گیری شده در هر تیمار سنجیده شد. فعالیت نسبی نیز مطابق معادله زیر به دست آمد:

$$A (UL^{-1}) = \frac{\Delta EV_t}{0.036V_s}$$

در این معادله، U (یونیت) برابر با فعالیت آنزیمی (یک یونیت از فعالیت لاکاز عبارت است از اندازه آنزیم لازم برای اکسید کردن یک میکرومول ABTS در دقیقه)،

آنزیم لاکاز (*Trametesversicolor*) اولیه جهت بی‌جنش‌سازی بر روی 200 میلی‌گرم از هر یک از چهار تکیه‌گاه جاذب گلس بیدز<sup>2</sup>، مونتموریلونیت، کائولینیت و خاک در pH=7، مقادیر گوناگون جاذب آنزیم بر رویه نگهدارنده‌ها را گزارش نمودند. بر پایه نتایج آنها به ترتیب 56، 71، 64 و 73 درصد از آنزیم لاکاز بکار برده شده، بر روی جاذب‌های گلس بیدز، مونتموریلونیت، کائولینیت و خاک جذب شد.

همچنین، از نکات جالب توجه که بر پایه جدول 1 می‌توان از آن یاد کرد، نبود جذب آنزیم لاکاز بر روی جاذب‌ها، در pH=8 می‌باشد. این امر می‌تواند ناشی از دلایل گوناگون باشد. از مهمترین این دلایل می‌توان به بهره‌گیری از گلو تار آلدئید جهت بی‌جنش‌سازی آنزیم اشاره نمود. بی‌جنش‌سازی به وسیله پیوند کوالانس به جاذب نامحلول در آب، با بهره‌گیری از گلو تار آلدئید، ساده‌ترین و ملایم‌ترین روش اتصال آنزیم به این جاذب‌ها می‌باشد و واکنش آنزیم با گلو تار آلدئید جهت بی‌جنش شدن، فرآیندی وابسته به pH است (ویتال، 1974؛ حبیب و هیراموتو، 1968). مطالعات انجام شده در این زمینه نیز موید این مطلب هستند. در این راستا، جانسن و همکاران (1971) طی مطالعه‌ای نشان دادند که مقادیر pH برای نامحلول‌سازی سریع توسط گلو تار آلدئید، برای آنزیم‌های لیزوزیم (EC3.2.1.17) و پاپاین (EC 3.4.22.2)، تقریباً مشابه نقاط ایزوالکتریک<sup>3</sup> این پروتئین‌ها بود؛ درحالی‌که سرعت این فرآیند برای آنزیم کایموتریپسین (EC 3.4.21.1) در pH=6/2 بیشترین اندازه بود که این اندازه زیر نقطه ایزوالکتریک این آنزیم قرار داشت (PI=8/6). با توجه به اینکه نقطه ایزوالکتریک لاکازهای قارچی در گستره 3-7 قرار دارد (مداوی و لهه، 2009)، علت عدم مشاهده جذب آنزیم لاکاز در pH=8 را احتمالاً می‌توان به خارج از محدوده بودن این pH از گستره نقاط ایزوالکتریک آنزیم لاکاز و عدم جذب این آنزیم در pHهای بالا نسبت داد. اینال و کولانکایا (2013) نیز طی مطالعه‌ای به بررسی شرایط بهینه بی‌جنش‌سازی لاکاز (*Trametesversicolor*) با مهره‌های سدیم آلجینیت پرداختند. آنها مشاهده نمودند که فعالیت نسبی آنزیم با افزایش pH در بازه 3-4/5، افزایش یافت و با افزایش pH در بازه 5-10، فعالیت آنزیم و نیز درصد بی‌جنش‌سازی کاهش یافت.

نتایج بدست آمده از آزمایش با بهره‌گیری از نرم افزار آماری MSTATC آنالیز و میانگین داده‌ها با بهره‌گیری از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه گردیدند.

## نتایج و بحث

به دنبال آماده کردن کانی‌های زئولیت و مونتموریلونیت و پس از خرد کردن کانی زئولیت، تصاویر میکروسکوپی نمونه‌های بررسی شده با بهره‌گیری از میکروسکوپ الکترونی روبشی<sup>1</sup> (SEM) آماده گردیدند. شکل‌های 1-A و 1-B به ترتیب تصاویر میکروسکوپی کانی‌های زئولیت و مونتموریلونیت را نشان می‌دهند. پس از آنالیز کانی‌های بررسی شده، بازه اندازه ذرات کانی‌های زئولیت و مونتموریلونیت کمتر از 10 میکرومتر به دست آمد و در این بین، ذرات کانی مونتموریلونیت نسبت به زئولیت، اندکی ریزتر بودند.

از آنجایی که در بسیاری از پژوهش‌ها در بررسی برهم کنش آنزیم و کانی رسی، دانه‌های با اندازه بزرگتر نیز بکار رفته‌اند، بنابراین اندازه دانه کانی‌های بررسی شده در بازه شایسته برای این گونه بررسی‌ها بودند. برای نمونه می‌توان از پژوهش‌های مک بول و اتو (1979) پیرامون برهم کنش فسفاتاز اسیدی با کانی‌های رسی مونتموریلونیت، ایلیت و کائولینیت یاد کرد. آنها بازه اندازه دانه‌های کانی‌های بکار رفته در این بررسی را کوچکتر از 63 میکرومتر گزارش نمودند.

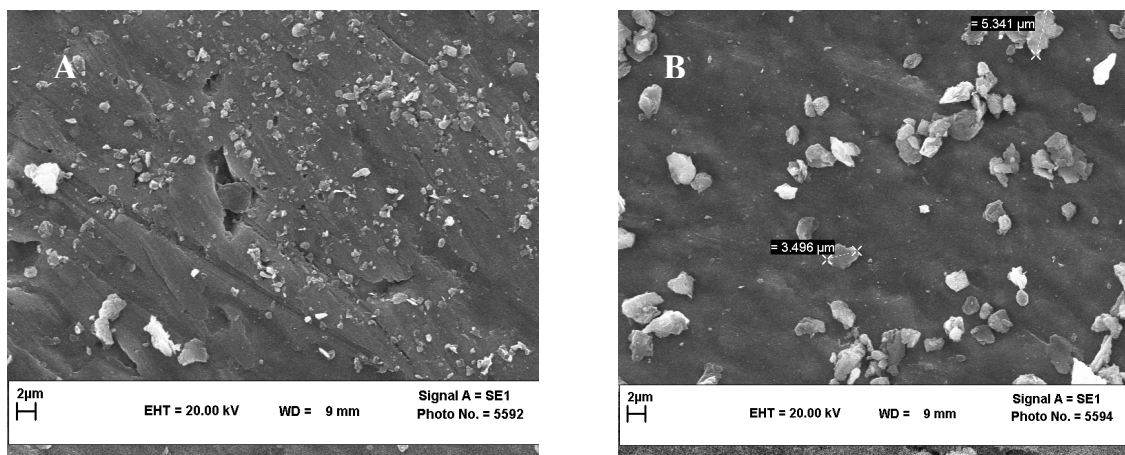
## اثر pH بر اندازه جذب آنزیم لاکاز روی کانی‌های مونتموریلونیت و زئولیت

جدول 1، اندازه جذب آنزیم لاکاز بر رویه‌های کانی‌های زئولیت و مونتموریلونیت را در pHهای گوناگون نشان می‌دهد. بیشترین اندازه جذب آنزیم بر رویه‌های هر دو کانی در pH=5 دیده شد که تفاوت آماری معنی‌داری را با سایر رویه‌های pH نشان داد و بنابراین به عنوان pH بهینه جهت بی‌جنش‌سازی آنزیم در آزمایش‌های دما و زمان انکوباسیون مورد بهره‌گیری قرار گرفت. با مقایسه کانی‌های بررسی شده، کانی مونتموریلونیت با اندازه جذب آنزیمی معادل با 64/61 درصد، بیشترین اندازه جذب را دارا بود که این اندازه نزدیک 27/63 درصد بیشتر از جذب در کانی زئولیت بود. پژوهش‌های مشابه انجام شده در این زمینه نیز مقادیر گوناگون جذب آنزیم، تحت شرایط گوناگون آزمایش، از جمله مقادیر متفاوت pH و یا کاربرد انواع گوناگون جاذب را نشان داده‌اند. در این راستا، جاینفردا و بولاگ (1994) در یک بررسی، پس از کاربرد 0/88 میلی‌گرم

<sup>2</sup> Glass beads

<sup>3</sup> Isoelectric Point (IP)

<sup>1</sup> Scanning Electron Microscope



شکل 1- تصویر SEM از ذرات کانی زئولیت (A) و مونتموریلونیت (B)

جدول 1- بی‌جنبش‌سازی آنزیم لاکاز (*Trametes versicolor*) بر روی کانی‌های مونتموریلونیت و زئولیت

آنزیم جذب شده (درصد) از یک میلی‌گرم آنزیم لاکاز اولیه							نوع کانی
pH=8	SD	pH=7	SD	pH=6	SD	pH=5	
-	0/7	35/33 <sup>c</sup>	0/5	40/30 <sup>b</sup>	0/1	64/61 <sup>a</sup>	مونتموریلونیت
-	1/91	5/47 <sup>c</sup>	0/26	36/72 <sup>b</sup>	1/23	46/76 <sup>a</sup>	زئولیت

\* (حروف بزرگ و کوچک نشان دهنده مقایسه آماری جداگانه بین کانی‌ها می‌باشد) ( $p \leq 0/05$ )

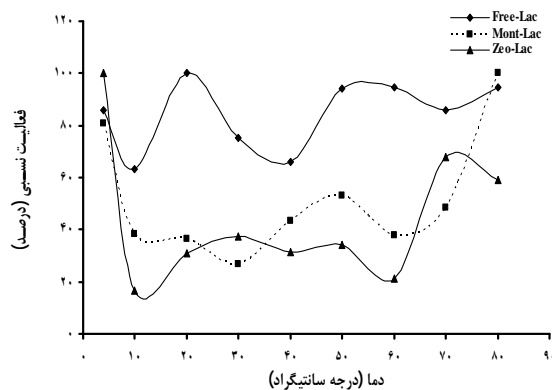
\*\* SD: انحراف معیار داده‌ها

#### اثر دمای انکوباسیون بر فعالیت آنزیم لاکاز آزاد و جذب شده

اثر دماهای گوناگون انکوباسیون بر فعالیت آنزیم لاکاز آزاد و بی‌جنبش شده بر رویه‌های کانی‌های زئولیت و مونتموریلونیت در شکل 2 نشان داده شده است. بر پایه شکل، فعالیت آنزیمی لاکاز آزاد و بی‌جنبش شده، در گستره دمایی بررسی شده (4 و 80-10 درجه سانتیگراد) و در pH بهینه، وابستگی دمایی قابل توجهی را نشان داد. مطابق شکل، بالاترین اندازه فعالیت نسبی دیده شده برای آنزیم لاکاز آزاد متعلق به دمای 20 درجه سانتیگراد (100 درصد) بود. همچنین، بالاترین فعالیت نسبی برای لاکاز بی‌جنبش شده بر کانی مونتموریلونیت، در دماهای 80 و 4 درجه سانتیگراد (به ترتیب 100 و 80/97 درصد) و برای لاکاز بی‌جنبش شده بر زئولیت در دمای 4 و 70 درجه سانتیگراد (100 و 67/96 درصد) مشاهده گردید. با مقایسه نمودارهای در لاکازهای بی‌جنبش شده، به نظر می‌رسد که این آنزیم در ابتدا و انتهای گستره دمایی بررسی شده (دماهای بسیار بالا و پایین) از فعالیت نسبی

بالاتر و بنابراین پایداری خوبی برخوردار بود. اما اینکه چرا دماهای بالاترین فعالیت نسبی برای لاکاز بی‌جنبش شده بر کانی مونتموریلونیت و زئولیت با هم متفاوت بودند، می‌تواند بنابر دلایل گوناگونی باشد. احتمالاً، عواملی همچون نوع کانی، اندازه ذرات، شکل ساختمانی کانی و حتی پاسخ کانی‌ها به پیش تیمارها قبل از اتصال آنزیم، می‌توانند تأثیر گذار باشند.

پژوهش‌های انجام شده نیز حاکی از پایداری‌های دمایی گوناگون آنزیم لاکاز بی‌جنبش شده، بسته به شرایط آزمایش از جمله منبع آنزیم و نوع جاذب می‌باشد. برای نمونه، سینگ و همکاران (2010) با بررسی ویژگی‌های لاکاز (*γ-proteobacterium JB*) بی‌جنبش شده بر غشای نیتروسولوز، دمای بهینه برای فعالیت آنزیم بی‌جنبش شده را 55 درجه سانتیگراد گزارش نمودند. همچنین، پژوهش آنها نشان داد که لاکاز بی‌جنبش شده بر غشاهای نیتروسولوز، در بازه دمایی 30-4 درجه سانتیگراد برای سه ماه، 100 درصد پایدار بود.



شکل 2- اثر دماهای انکوباسیون گوناگون بر فعالیت آنزیم لاکاز آزاد (Free-Lac) و بی‌جنبش شده روی کانی‌های مونتموریلونیت (Mont-Lac) و زئولیت (Zeo-Lac)

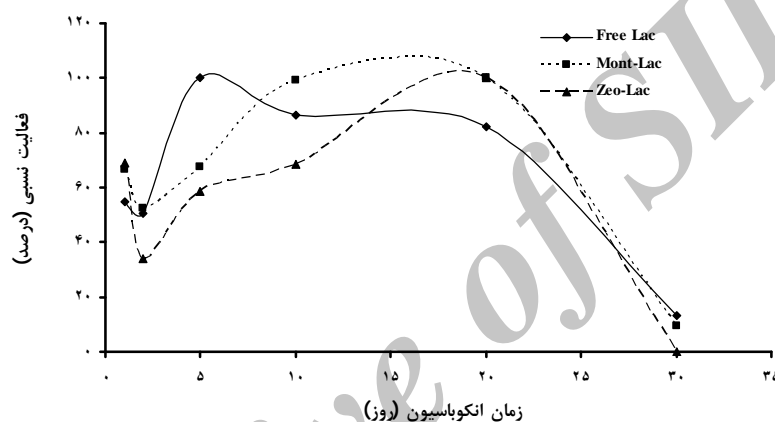
قلیایی و فسفاتاز اسیدی بر رویه کانی‌های رسی، با افزایش دما اشاره نمود (طرفدار و چانکار، 1982). بنابراین، شاید بتوان یکی از عوامل افزایش فعالیت نسبی آنزیم لاکاز جذب شده بر روی جاذب‌ها در دماهای بالا را به وجود مقادیر بیشتر آنزیم فعال در رویه کانی‌ها به سبب افزایش میزان جذب آنزیم در چنین شرایطی نسبت داد. لازم به ذکر است که نوسانات مشاهده شده در شکل 2 می‌تواند امور مختلفی از جمله بهبود یا زوال ساختار آنزیمی (به ویژه در مورد آنزیم لاکاز آزاد) را در محیط دربرگیرنده آن، در دماهای مختلف درگیر نماید. در حقیقت، برهمکنش عواملی چون افزایش پایداری آنزیم در دماهای بالا و پایین، افزایش احتمالی جذب آنزیم بر سطوح کانی‌ها با افزایش دما و نیز تغییر ساختار آنزیمی بسته به دما می‌تواند منجر به این نوسانات گردد. اثر زمان انکوباسیون بر فعالیت آنزیم لاکاز آزاد و جذب شده

شکل 3 اثر زمان‌های گوناگون انکوباسیون را بر فعالیت آنزیم لاکاز آزاد و بی‌جنبش شده بر رویه‌های کانی‌های زئولیت و مونتموریلونیت در دمای 4 درجه سانتیگراد نشان می‌دهد. از نکات جالب توجهی که می‌توان بدان اشاره نمود این است که بیشترین فعالیت آنزیمی دیده شده برای آنزیم لاکاز آزاد در زمان‌های انکوباسیون 5 (100 درصد)، 10 (86/4 درصد) و 20 روز (82/3 درصد)، برای آنزیم‌های بی‌جنبش شده بر رویه کانی مونتموریلونیت در زمان‌های انکوباسیون 10 (99/0 درصد) و 20 روز (100 درصد) و برای آنزیم‌های بی‌جنبش شده بر رویه کانی زئولیت در زمان انکوباسیون 20 روز (100 درصد) بود. در حقیقت، با گذشت زمان، فعالیت آنزیمی افزایش را نشان داد که این افزایش برای

هیو و همکاران (2007) نیز با انجام مطالعه‌ای مقایسه‌ای پیرامون لاکاز (*Trametes versicolor*) بی‌جنبش شده بر ذرات نانوی سیلیس مزوپور شش ضلعی (*SBA-15*) و کائولینیت، مشاهده نمودند که لاکاز بی‌جنبش شده بر ذرات نانو در مقایسه با آنزیم‌های بی‌جنبش شده بر کائولینیت، فعالیت آنزیمی بالاتری را در دماهای نسبتاً پایین‌تر (35-25 درجه سانتیگراد) نشان دادند، اما به طور کلی، دماهای بهینه جهت فعالیت نسبی بیشینه برای تمامی لاکازهای بی‌جنبش شده در گستره 50-45 درجه سانتیگراد قرار داشت. بر پایه هیو و همکاران (2007)، اتصال کووالانسی منجر به الحاق آنزیم به درون ماتریس رس می‌شود. در این راستا، هر چه ذرات کوچکتر باشند، توانایی آنها برای پیوند با آنزیم و کاهش اثر محدودیت پخشیدگی، بیشتر است (هیو و همکاران، 2007) و این امر می‌تواند بر پایداری دمایی آنها بیفزاید. آنها بر پایه جیانگ و همکاران (2005)، کاهش فعالیت آنزیمی دیده شده متأثر از دما را به عدم پایداری آنزیم بی‌جنبش شده تحت شرایط دمایی اعمال شده و بنابراین کاهش توانایی کاتالیزوری آنزیم نسبت دادند. از طرفی، بر پایه مطالعات ستینوس و اوزتوپ (2003)، پایداری دمایی بالای آنزیم‌های بی‌جنبش شده در برابر آنزیم آزاد می‌تواند ناشی از کاهش انعطاف‌پذیری ساختاری در آنزیم بی‌جنبش شده باشد. گلدستین (1973) نیز با مطالعه آنزیم اوره‌آز، پایداری بالای آنزیم جذب شده در دماهای بالا را ناشی از جلوگیری احتمالی از هضم خود به خودی آنزیم جذب شده دانست (آیتا و همکاران، 1997؛ گلدستین، 1973). از نکات جالب توجه که از مطالعات صورت گرفته در این زمینه قابل دریافت است می‌توان به افزایش احتمالی میزان جذب آنزیم‌ها از جمله اوره‌آز، فسفاتاز

1، 2، 10 و 20 روز بیشتر از آنزیم لاکاز آزاد مشاهده گردید. به نظر می‌رسد که کانی مونتموریلونیت در حفظ فعالیت لاکاز بی‌جنبش‌شده، بهتر از زئولیت عمل کرده است. بر پایه پژوهش‌های انجام شده، پایداری افزایش یافته در لاکاز بی‌جنبش‌شده می‌تواند به دلیل ممانعت از نوآرایی ساختاری و انعطاف پذیری کمتر آنزیم بی‌جنبش‌شده باشد که هر دوی این عوامل ناشی از اتصال چند نقطه‌ای به جاذب می‌باشد (برندی و همکاران، 2006). همچنین، بهره‌گیری از گلوترآلدهید، بهبود در پایداری عملکردی آنزیم و پایداری در برابر عوامل دنا توره کننده (طبع برگشتگی) را سبب می‌شود (ریکاچ و همکاران، 2009).

لاکاز بی‌جنبش شده بر رویه نگهدارنده‌ها در بازه زمانی 20-2 روز کاملاً مشهود بود. لازم به ذکر است که آنزیم لاکاز در هر دو حالت آزاد و بی‌جنبش‌شده، در زمان 30 روز انکوباسیون، با افت شدید فعالیت مواجه گردید به نحوی که اندازه فعالیت نسبی دیده شده در این زمان، برای لاکاز آزاد و بی‌جنبش شده بر رویه‌های کانی‌های مونتموریلونیت و زئولیت به ترتیب 13/0، 9/6 و صفر درصد بود. با مقایسه فعالیت نسبی آنزیم‌های لاکاز آزاد و بی‌جنبش شده در زمان‌های انکوباسیون بررسی شده، اندازه فعالیت آنزیم لاکاز بی‌جنبش‌شده بر زئولیت در زمان‌های انکوباسیون 1 و 20 روز و اندازه فعالیت آنزیم بی‌جنبش شده بر مونتموریلونیت در زمان‌های انکوباسیون



شکل 3- اثر زمان‌های انکوباسیون گوناگون بر فعالیت آنزیم لاکاز آزاد (Free-Lac) و بی‌جنبش‌شده روی کانی‌های مونتموریلونیت (Mont-Lac) و زئولیت (Zeo-Lac) در دمای 4 درجه سانتیگراد

ترتیب 21، 45 و 27 درصد گزارش نمودند. لی و همکاران (2015) نیز با در نظر گرفتن بازه زمانی صفر تا 100 روز، تغییرات فعالیت نسبی لاکاز بی‌جنبش‌شده بر یک جاذب نانو کامپوزیت شده ZnO/SiO<sub>2</sub> جدید را در دمای 25 درجه سانتیگراد مورد بررسی قرار دادند. بر پایه نتایج آنها، بی‌جنبش‌سازی لاکاز بر روی این جاذب، تقریباً 80 درصد فعالیت اولیه آن را پس از سه ماه انکوباسیون حفظ نمود. میسائو و همکاران (2014) نیز طی مطالعه‌ای پیرامون بی‌جنبش‌سازی اینولیناز تجاری بر مهره‌های آلجینیت-کیتوزان، تأثیر زمان انکوباسیون را نیز بر فعالیت نسبی آنزیم بی‌جنبش‌شده مورد بررسی قرار دادند. بر پایه نتایج آنها، آنزیم بی‌جنبش‌شده بیش از 76 درصد از فعالیت خود را برای 6 روز در دمای اتاق حفظ نمود. آنها اظهار کردند که این حفظ فعالیت می‌توانست در دماهای پایین‌تر، برای مثال 5-4 درجه سانتیگراد، بهبود یابد. همچنین، نتایج آنها نشان داد که آنزیم بی‌جنبش‌شده عملاً

پژوهش‌های گوناگونی در این زمینه با در نظر گرفتن شرایط آزمایشی متنوع همچون زمان‌های انکوباسیون متفاوت انجام شده‌اند که نتایج آنها در خور توجه هستند. در این راستا، وانگ و همکاران (2013)، فعالیت لاکاز بی‌جنبش‌شده بر کمپلکس‌های TiO<sub>2</sub>- مونتموریلونیت را مورد بررسی قرار دادند. آنها پایداری آنزیم بی‌جنبش‌شده را در دمای 4 درجه سانتیگراد و pH=4/5، در فواصل زمانی منظم تا 26 روز بررسی شده قرار دادند. بر پایه نتایج آنها، فعالیت نسبی آنزیم لاکاز آزاد و بی‌جنبش‌شده بر جاذب‌های مونتموریلونیت، TiO<sub>2</sub>- مونتموریلونیت و TiO<sub>2</sub>800- مونتموریلونیت (800- TiO<sub>2</sub>) مونتموریلونیت کلسینه شده در دمای 800 درجه سانتیگراد) با افزایش زمان انکوباسیون کاهش یافت. با اینحال، آنها ماندگاری فعالیت آنزیم بی‌جنبش‌شده بر مونتموریلونیت، TiO<sub>2</sub>- مونتموریلونیت و TiO<sub>2</sub>800- مونتموریلونیت را پس از گذشت 20 روز از زمان انکوباسیون و در دمای اتاق، به



4 و 70 درجه سانتیگراد بود. در حقیقت، بی‌جنبش‌سازی منجر به افزایش پایداری آنزیم در برابر دماهای بسیار بالا و پایین گشت. همچنین، آنزیم‌های آزاد و بی‌جنبش‌شده تا زمان 20 روز فعالیت خود را حفظ نمودند و در مورد آنزیم‌های بی‌جنبش‌شده، افزایش فعالیت در بازه زمانی 20-2 روز مشهود بود. با توجه به نتایج این پژوهش و با توجه به اهمیت آنزیم لاکاز در زیست‌بهبودی، بی‌جنبش‌سازی می‌تواند چشم‌انداز خوبی را بر بهره‌گیری از این آنزیم در آلودگی‌زدایی، با صرفه اقتصادی بگشاید که این خود یکی از اهداف اصلی انجام این پژوهش بود.

#### سپاسگزاری

از حمایت‌های دانشگاه فردوسی مشهد سپاسگزاری می‌گردد.

تمام فعالیت خود را پس از 20 روز در دمای اتاق از دست داد و فعالیت نسبی آن تنها 20 درصد بود.

#### نتیجه‌گیری

بر پایه نتایج بدست آمده از این پژوهش، عوامل گوناگون همچون اندازه pH در حین بی‌جنبش‌سازی یک پروتئین از جمله آنزیم می‌توانند بر اندازه جذب آن بر رویه‌های گوناگون اثر بگذارند. مشاهدات مبتنی بر این پژوهش حاکی از جذب حداکثری آنزیم لاکاز بر رویه‌های دو کانی مونتموریلونیت و زئولیت در pH=5 بود. نتایج بدست آمده از این پژوهش، رفتارهای گوناگون آنزیم لاکاز پس از جذب شدن بر رویه‌های مونتموریلونیت و زئولیت را نیز تحت شرایط آزمایشی نشان دادند. بالاترین اندازه فعالیت آنزیم آزاد در دمای 20 درجه سانتیگراد دیده شد درحالی‌که دمای فعالیت بیشینه برای آنزیم جذب شده بر رویه کانی مونتموریلونیت 80 و 4 برای زئولیت

#### فهرست منابع:

1. Addorisio, V., Sannino, F., Mateoa, C. and Guisan, J.M. 2013. Oxidation of phenyl compounds using strongly stable immobilized-stabilized laccase from *Trametes versicolor*. *Process Biochemistry* 48:1174–1180.
2. Ahn, M.Y. Dec, J. Kim, J. E. and Bollag, J. M. 2002. Bioremediation and Biodegradation, Treatment of 2,4-Dichlorophenol Polluted Soil with Free and Immobilized Laccase. *Journal of Environmental Quality* 31:1509-1515.
3. Anita, A., Sastry, C.A. and Hashim, M.A. 1997. Immobilization of urease on vermiculite. *Bioprocess Engineering* 16:375-380.
4. Arica, M.Y., Altintas, B. and Bayramoglu, G. 2009. Immobilization of laccase onto spacer-arm attached non-porous poly(GMA/EGDMA) beads: application for textile dye degradation. *Bioresource Technology* 100:665–9.
5. Arroyo, M. 1998. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica* 39:23–39.
6. Bayramoglu, G., Yilmaz, M. and Arica, M.Y. 2010a. Preparation and characterization of epoxyfunctionalized magnetic chitosan beads: laccase immobilized for degradation of reactive dyes. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 33:439–48.
7. Bayramoglu, G., Yilmaz, M. and Arica, M.Y. 2010b. Reversible immobilization of laccase to poly(4-vinylpyridine) grafted and Cu(II) chelated magnetic beads: biodegradation of reactive dyes. *Bioresource Technology* 101:6615–21.
8. Brandi, P., Annibale, A.D., Galli, C., Gentili, P. and Pontes, A.S.N. 2006. In search for practical advantages from the immobilisation of an enzyme: the case of laccase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 41:61–69.
9. Cabana, H., Ahamed, A. and Leduc, R. 2011. Conjugation of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor* to chitosan and its utilization for the elimination of triclosan. *Bioresource Technology* 102:1656–62.
10. Camarero, S., García, O., Vidal, T., Colom, J., Del Río, J.C., Gutiérrez, A., Martínez, M.J. and Martínez, A.T. 2002. Flax pulp bleaching and residual lignin modification by laccasemediator systems. *Progress in Biotechnology* 21:213–22.

11. Cardoso, F.P., Neto, S.A., Ciancaglini, P. and De Andrade, A.R. 2012. The use of PAMAM dendrimers as a platform for laccase immobilization: kinetic characterization of the enzyme. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167:1854–64.
12. Cerrone, F., Barghini, P., Pesciaroli, C. and Fenice, M. 2011. Efficient removal of pollutants from olive washing wastewater in bubble-column bioreactor by *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 84:254–9.
13. Cetinus, S.A. and Oztop, H.N. 2003. Immobilization of catalase into chemically cross-linked chitosan beads. *Enzyme and Microbial Technology* 32:889–894.
14. Chea, V., Paolucci-Jeanjean, D., Belleville, M.P. and Sanchez, J. 2012. Optimization and characterization of an enzymatic membrane for the degradation of phenolic compounds. *Catalysis Today* 193:49–56.
15. Fernández-Fernández, M., Sanromán, M.A. and Moldes, D. 2013. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnology Advances* 31:1808–1825.
16. Flip, H. and Claus, Z. K. 1995. Effects of soil minerals on the microbial formation of enzymes and their possible use in remediation of chemically polluted sites. p. 409-419. In: P. M. Huang et al. (ed.) *Environmental impact of soil component interactions*. Vol. 1. Natural and anthropogenic organics. CRC Press/Lewis Publ., Boca Raton, FL.
17. Freire, R.S., Durán, N. and Kubota, L.T. 2001. Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. *Talanta* 54:681–6.
18. Georgieva, S., Godjevargova, T., Portaccio, M., Lepore, M. and Mita, D.G. 2008. Advantages in using non-isothermal bioreactors in bioremediation of water polluted by phenol by means of immobilized laccase from *Rhus vernicifera*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 55:177–84.
19. Gianfreda, L. and Bollag, J. M. 1994. Effect of Soils on the Behavior of Immobilized Enzymes. *Soil Science Society of America Journal* 58:1672-1681.
20. Gianfreda, L. and Bollag, J.M. 1994. Effect of soils on the behavior of immobilized enzymes. *Soil Science Society of America Journal* 58:1672–1681.
21. Goldstein, L. 1973. A new polymine carrier for immobilization of proteins of water insoluble derivatives of pepsin and trypsin. *Biochimica et Biophysica Acta* 327:132-137.
22. Guo, M., Lu, F., Liu, M., Li, T., Pu, J., Wang, N., et al. 2008. Purification of recombinant laccase from *Trametes versicolor* in *Pichia methanolica* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Biotechnology Letters* 30:2091–6.
23. Habeeb, A.F.S.A. and Hiramoto. R. 1968. Reaction of proteins with glutaraldehyde. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 126:16-26.
24. Hu, X., Zhao, X. and Hwang, H. 2007. Comparative study of immobilized *Trametes versicolor* laccase on nanoparticles and kaolinite. *Chemosphere* 66:1618–26.
25. Hu, X., Zhao, X. and Hwang, H.M. 2007. Comparative study of immobilized *Trametes versicolor* laccase on nanoparticles and kaolinite. *Chemosphere* 66:1618–1626.
26. Jansen, E.F., Tomimatsu, Y. and Olson, A.C. 1971. Cross-linking of  $\alpha$ -chymotrypsin and other proteins by reaction with glutaraldehyde. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 144:394-400.
27. Jia, J.B., Zhang, S.P., Wang, P. and Wang, H.J. 2012. Degradation of high concentration 2,4-dichlorophenol by simultaneous photocatalytic-enzymatic process using  $\text{TiO}_2/\text{UV}$  and laccase. *Journal of Hazardous Materials* 205:150–155.
28. Jiang, D.S., Long, S.Y., Huang, J., Xiao, H.Y. and Zhou, J.Y. 2005. Immobilization of *Pucnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres. *Biochemical Engineering Journal* 25:15–23.

29. Kalkan, N.A., Aksoy, S., Aksoy, E.A. and Hasirci, N. 2012. Preparation of chitosan-coated magnetite nanoparticles and application for immobilization of laccase. *Journal of Applied Polymer Science* 123:707–16.
30. Karagoz, B., Bayramoglu, G., Altintas, B., Bicak, N. and Arica, M.Y. 2011. Amine functional monodisperse microbeads via precipitation polymerization of N-vinyl formamide: immobilized laccase for benzidine based dyes degradation. *Bioresource Technology* 102:6783–90.
31. Krajewska, B. 2009. Ureases. II. Properties and their customizing by enzyme immobilizations: A review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 59:22–40.
32. Kunamneni, A., Ghazi, I., Camarero, S., Ballesteros, A., Plou, F.J. and Alcalde, M. 2008. Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers. *Process Biochemistry* 43:169–78.
33. Kurniawati, S. and Nicell, J.A. 2008. Characterization of *Trametes versicolor* laccase for the transformation of aqueous phenol. *Bioresource Technology* 99:7825–34.
34. Lai, C., Zeng, G.M., Huang, D.L., Zhao, M.H., Huang, H.L., Huang, C., Wei, Z., Li, N.J., Xu, P., Zhang, C. and Xie, G.X. 2013. Effect of ABTS on the adsorption of *Trametes versicolor* laccase on alkali lignin. *International Biodeterioration and Biodegradation* 82: 180-186.
35. Leonowicz, A., Sarkar, J.M. and Bollag, J.M. 1988. Improvement in stability of an immobilized fungal laccase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 29:129–135.
36. Li, W.X., Sun, H.Y. and Zhang, R.F. 2015. Immobilization of laccase on a novel ZnO/SiO<sub>2</sub> nano-composited support for dye decolorization. 2015 Global Conference on Polymer and Composite Materials (PCM 2015). IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering 87 (2015) 012033.
37. Loera, O., Pérez Pérez, M., Cristina, I., Barbosa Rodríguez, J.R. and Villaseñor Ortega, F. 2006. Laccases. Anonymous *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*. Research Signpost p. 323–40.
38. Lu, L., Zhao, M. and Wang, Y. 2007. Immobilization of laccase by alginate–chitosan microcapsules and its use in dye decolorization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23:159-166.
39. Madhavi, V. and Lele, S. S. 2009. Laccase: Properties and Applications. *BioResources* 4:1694-1717.
40. Majeau, J.A., Brar, S.K. and Tyagi, R.D. 2010. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology* 101:2331–50.
41. Makboul, H. E. and Ottow, J. C. G. 1979. Michaelis Constant (Km) of Acid Phosphatase as Affected by Montmorillonite, Illite, and Kaolinite Clay Minerals. *Journal of Microbial Ecology* 5:207-213.
42. Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M. and Fernandez-Lafuente, R. 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* 40:1451–63.
43. Matijevic, I., Arends, I.W.C.E., de Vries, S. and Sheldon, R.A. 2010. Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzyme* 62:142–8.
44. Missau, J., Scheid, A. J., Foletto, E. L., Jahn, S. L., Mazutti, M. A. and Kuhn, R. C. 2014. Immobilization of commercial inulinase on alginate–chitosan beads. *Sustainable Chemical Processes*. 2:13.
45. Naidja, A., Huang, P.M. and Bollag, J.M. 1997. Activity of tyrosinase immobilized on hydroxyaluminum–montmorillonite complexes. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 115: 305–316.

46. Naidja, A., Huang, P.M. and Bollag, J.M. 2000. Enzyme-Clay Interactions and Their Impact on Transformations of Natural and Anthropogenic Organic Compounds in Soil. *Journal of Environmental Quality* 29:677-691.
47. Park, J.H., Xue, H., Jung, J.S. and Ryu, K. 2012. Immobilization of laccase on carbon nanomaterials. *Korean Journal of Chemical Engineering* 29:1409-12.
48. Pazarlioglu, N.K., Akkaya, A., Akdogan, H.A. and Gungor, B. 2010. Biodegradation of direct blue 15 by free and immobilized *Trametes versicolor*. *Water Environment Research* 82:579-85.
49. Piontek, K., Antorini, M. and Choinowski, T. 2002. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90° A resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry* 277:37663-9.
50. Plagemann, R., Jonas, L. and Kragl, U. 2011. Ceramic honeycomb as support for covalent immobilization of laccase from *Trametes versicolor* and transformation of nuclear fast red. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90:313-20.
51. PrévotEAU, A. and Faure, C. 2012. Effect of onion-type multilamellar liposomes on *Trametes versicolor* laccase activity and stability. *Biochimie* 94:59-65.
52. Rekuć, A., Jastrzemska, B., Liesiene, J. and Bryjak, J. 2009. Comparative studies on immobilized laccase behaviour in packed-bed and batch reactors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 57:216-223.
53. Rekuć, A., Jastrzemska, B., Liesiene, J. and Bryjak, J. 2009. Comparative studies on immobilized laccase behaviour in packed-bed and batch reactors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 57:216-23.
54. Rodriguez -Couto, S. and Toca -Herrera, J.L. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances* 24:500-513.
55. Ruggiero, P., Sarkar, J.M. and Bollag, J.M. 1989. Detoxification of 2,4-dichlorophenol by a laccase immobilized on soil or clay. *Soil Science* 147:361-370.
56. Savolainen, A., Zhang, Y., Rochefort, D., Holopainen, U., Erho, T., Virtanen, J. et al. 2011. Printing of polymer microcapsules for enzyme immobilization on paper substrate. *Biomacromolecules* 12:2008-15.
57. Shuttleworth, K.L. and Bollag, J-M. 1986. Soluble and immobilized laccase as catalysts for the transformation of substituted phenols. *Enzyme and Microbial Technology* 8:171-177.
58. Singh, G., Bhalla, A., Capalash, N. and Sharma, P. 2010. Characterization of immobilized laccase from  $\gamma$ -proteobacterium JB: Approach towards the development of biosensor for the detection of phenolic compounds. *Indian Journal of Science and Technology* 3:48-53.
59. Spinelli, D., Fatarella, E., Di Michele, A., Pogni, R. 2013. Immobilization of fungal (*Trametes versicolor*) laccase onto Amberlite IR-120 H beads: optimization and characterization. *Process Biochemistry* 48:218-23.
60. Tarafdar, J.C. and Chhonkar, P.K. 1982. Urease Clay Interactions: I – adsorption of urease on clays saturated with different cations. *Indian Society of Soil Science* 30: 27-32.
61. Tortolini, C., Rea, S., Carota, E., Cannistraro, S. and Mazzei, F. 2012. Influence of the immobilization procedures on the electroanalytical performances of *Trametes versicolor* laccase based bioelectrode. *Microchemical Journal* 100:8-13.
62. Unal, A. and Kolankaya, N. 2013. Determination of Optimum Immobilization Conditions of *Trametes versicolor* Laccase with Sodium Alginate Beads. *IUFS Journal of Biology* 72:15-21.
63. Unal, Y.D. and Pazarlioglu, N.K. 2011. Production and gelatin entrapment of laccase from *Trametes versicolor* and its application to quantitative determination of phenolic contents of commercial fruit juices. *Food Biotechnology* 25:351-68.

64. Virtanen, H., Orelma, H., Erho, T. and Smolander, M. 2012. Development of printable bioactive paper containing laccase. *Process Biochemistry* 47:1496–502.
65. Wang, F., Guo, C. and Liu, C.Z. 2013. Immobilization of *Trametes versicolor* cultures for improving laccase production in bubble column reactor intensified by sonication. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 40:141–50.
66. Wang, Q., Peng, L., Li, G., Zhang, P., Li, D., Huang, F. and Wei, Q. 2013. Activity of Laccase Immobilized on TiO<sub>2</sub>-Montmorillonite Complexes. *International Journal of Molecular Sciences* 14:12520-12532.
67. Wang, Q., Peng, L., Li, G., Zhang, P., Li, D., Huang, F. and Wei, Q. 2013. Activity of Laccase Immobilized on TiO<sub>2</sub>-Montmorillonite Complexes. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 12520-12532.
68. Weetall, H.H. 1974. Immobilized enzymes: analytical applications. *Analytical Chemistry* 46:602A-604A.
69. Zhang, X., Zhang, S., Pan, B., Hua, M. and Zhao, X. 2012. Simple fabrication of polymer-based *Trametes versicolor* laccase for decolorization of malachite green. *Bioresource Technology* 115:16–20.

Archive of SID