Archive of SID

ORIGINAL ARTICLE

Investigation of Immobilized Laccase Enzyme on Nanoporous Silica Application for Removal of 2,4-Dinitrophenol from Aqueous Solution

Ahmad Jonidi Jafari[1],
Roshanak Rezaei Kalantary[1],
Emad Dehghanifard[2,3],
Amir Hossein Mahvi[4],
Mohammd Ali Faramarzi[5],
Ebrahim Mohammadi Kalhori[2,6]

[1] Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Research Center for Health, Safety and Environment, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[5] Associate Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[6] Instructor, Department of Environmental Health Engineering, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

(Received May 16, 2016 ; Accepted August 21, 2016)

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:25 +0430 on Wednesday May 31st 2017

Abstract

Background and purpose: 2, 4-dinitrophenol (2,4-DNP) is categorized as one of the priority pollutants that is used in pharmaceutical and chemical industries, pesticides, etc. In this study we aimed at investigating the biodegradation of 2,4-DNP by immobilized laccase on nano-porous silica beads.

Materials and methods: An experimental study was conducted in which the enzyme was chemically cross-linked on the nano-porous silica beads. Temperature (40-60 ˚C), contact time (2-12 h), mediator concentration (1-3 mM), pH (4-6) and initial pollutant concentration (10-30 ppm) were considered. The high performance liquid chromatography was applied to measure the degradation of the pollutant.

Results: The maximum removal of 2,4-DNP (91%) was achieved at T=50˚C, 2,4-DNP concentration of 10 ppm, mediator concentration of 1 mM, pH=5 and 12h contact time. ANOVA analysis showed that contact time and pH had the most and lowest effect on the process efficiency, respectively.

Conclusion: 2,4-DNP was effectively degraded by laccase. The reusability and resistibility of the enzyme improved through immobilization. The immobilized laccase on nano-porous silica beads could be applied to remove a wide range of phenolic pollutants.

Keywords: laccase, biodegradation, nano-porous silica, 2,4-DNP, aqueous solution

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26 (144): 301-313 (Persian).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:25 +0430 on Wednesday May 31st 2017

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۴ دی سال ۱۳۹۵ (۳۱۳-۳۰۱)

بررسی کارایی آنزیم لکاز تثبیت شده روی سیلیکای متخلخل در حذف آلاینده ۲،۴-دی نیتروفنل از محیط آبی

احمد جنیدی جعفری[۱]
روشنک رضایی کلانتری[۱]
عماد دهقانی فرد[۲و۳]
امیرحسین محوی[۴]
محمدعلی فرامرزی[۵]
ابراهیم محمدی کلهری[۲و۶]

چکیده

سابقه و هدف: ۲و۴-دی نیتروفنل به عنوان یکی از آلاینده‌های دارای تقدم از لحاظ زیست محیطی مطرح بوده که در صنایع مختلف دارویی، شیمیایی، تولید سموم و غیره مصرف می‌گردد. هدف از این مطالعه بررسی تجزیه زیستی ۲و۴-دی نیتروفنل با استفاده از آنزیم لکاز تثبیت شدهروی بستر سیلیکای متخلخل بوده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی آنزیم موردنظربه روش اتصال مستقیم شیمیایی روی بستر سیلیکای متخلخل تثبیت گردید. دما (۴۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد)، زمان ماند (۲ تا ۱۲ساعت)، غلظت مدیاتور (۱mM-۳)، pH (۴ تا ۶) و غلظت اولیه آلاینده (ppm ۱۰-۳۰) در نظر گرفته شد. از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا جهت سنجش میزان تجزیه آلاینده استفاده گردید.

یافته‌ها: بیش‌ترین حذف آلاینده ۲و۴-دی نیتروفنل به میزان ۹۱درصد و در شرایط دمای ۵۰ درجه، غلظت آلاینده ۱۰ppm، مدیاتور ۱ mM، pH=۵ و زمان ماند۱۲ساعت به دست آمد. آزمون ANOVA نشان داد که موثرترین متغیر در فرآیند حذف، زمان ماند و کم تاثیرترین متغیر، pH بود.

استنتاج: آلاینده ۲و۴-دی نیتروفنل به طور موثری توسط آنزیم لکاز حذف گردید. قابلیت بازیابی و افزایش مقاومت آنزیم در شرایط محیطی با فرآیند تثبیت افزایش یافت. از آنزیم تثبیت شده روی سیلیکای متخلخل می‌توان در حذف طیف گسترده‌ای از آلاینده‌های آلی فنلی موجود در آب استفاده نمود.

واژه های کلیدی: لکاز، تجزیه زیستی، سیلیکای متخلخل با منافذ نانو، ۲و۴-دی نیتروفنل، محلول های آبی

مقدمه

ترکیبات نیتروفنل (DNP)، یکی از متداول‌ترین ترکیبات آلی موجود در پساب خروجی صنایع بوده که در دسته آلاینده‌های دارای تقدم سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا قرار گرفته است. دی نیتروفنل‌ها به عنوان مهم‌ترین ترکیب از میان ترکیبات نیتروفنل می‌باشند که در بین آن‌ها ۲و۴- دی نیتروفنل (2,4-DNP) سمی‌ترین

مولف مسئول: عماد دهقانی فرد- کرج: دانشگاه علوم پزشکی البرز، مرکز تحقیقات بهداشت ایمنی و محیط (HSE) E-mail: dehghanifard@yahoo.com
۱. استاد، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات بهداشت، ایمنی و محیط (HSE)، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
۳. استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
۴. استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۵. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۶. مربی، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۲/۲۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۵/۳/۹ تاریخ تصویب : ۱۳۹۵/۵/۳۱

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:25 +0430 on Wednesday May 31st 2017

ترکیب و در دسته ترکیبات سخت تجزیه‌پذیر می‌باشد(۱). ۲و۴- دی نیتروفنل به صورت کریستال جامد زرد رنگ بوده که در صنایع تولید حشره‌کش‌ها، داروسازی، رنگ نساجی، مواد انفجاری و به عنوان نشان‌گر وجود یون‌های پتاسیم و آمونیوم کاربرد دارد. پس از ورود DNP به بدن، جریان خون این آلاینده را به ارگان‌های مختلف بدن نظیر کبد، کلیه‌ها و چشم‌ها می‌برد. قابلیت تجمع‌پذیری DNP پایین بوده، با این حال DNP توسط فرآیندهای شیمیایی به متابولیت‌های واسط تبدیل شده که منجر به بروز اثرات کوتاه مدت و بلند مدت می‌شود. اثرات کوتاه مدت آن شامل افزایش دمای بدن، افزایش سوخت و ساز بدن، اگزما و حساسیت‌های پوستی است. مواجهه طولانی مدت با این آلاینده موجب بروز آب مروارید، تورم غدد لنفاوی، کاهش میزان گلبول‌های سفید، مرگ زودرس جنین، پوکی استخوان، از بین رفتن ناخن‌ها، آسیب سیستم اعصاب مرکزی، آسیب سیستم قلبی- عروقی و در نهایت مرگ زودرس می‌گردد. سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا DNP را در ردیف آلاینده‌های دارای تقدم طبقه بندی و استاندارد آن را در منابع آبی نظیر رودخانه‌ها و دریاچه‌ها، کم تر از ۰/۰۷ mg/L اعلام نموده است(۲). ورود این ترکیب به محیط زیست ناشی از فاضلاب‌های صنایع، حوادث یا به عنوان ترکیب واسط ناشی از تجزیه آفت‌کش‌های حاوی ۲و۴-دی نیتروفنل می‌باشد(۳).

روش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی که برای تصفیه آلاینده‌های نیتروفنل مورد استفاده قرار گرفته‌اند شامل فرآیندهای جذب، اکسیداسیون شیمیایی، ترسیب، تبخیر و سوزاندن می‌باشد که هر کدام از این روش‌ها دارای محدودیت‌های اقتصادی و کاربردی می‌باشد(۴-۶). استفاده از روش‌های بیولوژیکی جهت تجزیه ترکیبات آلی به دلیل کارایی و قابلیت کاربرد بالا، همواره مورد توجه بوده است(۸،۷). در این میان استفاده از قارچ‌های سفید پوسیدگی(White rot) جهت تجزیه طیف گسترده‌ای از ترکیبات آلی سخت تجزیه‌پذیر، به خصوص ترکیبات حاوی فنل مورد توجه بوده است. اساس کار تجزیه‌ای این قارچ‌ها، ترشح آنزیم‌های تغییردهنده لیگنین نظیر آنزیم منگنز (II) پراکسیداز، لیگنین پراکسیداز و لکاز (فنل اکسیداز) می‌باشد(۱۱-۹). اگرچه کارآیی فرآیندهای بیولوژیکی در غلظت‌های کم آلاینده‌ها مورد توجه می‌باشد، با این حال حساسیت این فرآیندها نسبت به شوک‌های بار آلی، نیاز به زمان ماند طولانی و تولید حجم بالای لجن منجر به کاهش تمایل به استفاده از این فرآیندها شده است(۱۲). با این حال بسیاری از این محدودیت‌ها در فرآیندهای بر پایه آنزیم، به دلیل قابلیت کاربرد برای طیف گسترده‌ای از آلاینده‌های آلی با غلظت‌های متفاوت و در محدوده متغیری از pH، دما و شوری مرتفع شده است(۱۳).

لکاز (EC 1.10.3.2)، آنزیم اکسیداز با چند باند مختلف مس، توانایی تسریع اکسیداسیون بسیاری از ترکیبات آلی (اکثراً فنل‌ها) از طریق احیای اکسیژن به آب را دارا می‌باشد(۱۶-۱۴). آنزیم لکاز قادر به اکسیداسیون ترکیبات آروماتیک و به‌خصوص ترکیبات فنله می‌باشد. ترکیبات فنله ناشی از صنایع روغن زیتون، پتروشیمی، خمیر و کاغذ و پالایش الکل به‌خوبی توسط اکسیداسیون به‌وسیله آنزیم لکاز اکسیده شده‌اند(۲۰-۱۷). هم‌چنین نتایج سایر مطالعات درخصوص اکسیداسیون آلاینده‌های نوترکیب حاوی حلقه‌های فنله نظیر استامینوفن(۲۱)، دیکلوفناک، استرادیول، استرون، اتینیل‌استرادیول(۲۲)، تری‌کلوسان(۲۳)، بیس‌فنل A و نونیل‌فنل(۲۴) حاکی از اکسیداسیون این ترکیبات توسط آنزیم لکاز می‌باشد. هم‌چنین آنزیم لکاز می‌تواند به‌طور غیرمستقیم با سایر ترکیبات آلی سخت تجزیه‌پذیر نیز واکنش داده و آن‌ها را اکسید نماید. برای نمونه ترکیب اکسی‌بنزن به طور مستقیم توسط آنزیم لکاز قادر به اکسید شدن نمی‌باشد(۲۵). علی‌رغم مزایای کاربرد این آنزیم نظیر کارایی بالا، غیر فعال شدن در اثر تغییر شرایط محیطی (pH، دما و غیره) و هم‌چنین عدم قابلیت بازیابی آن از مهم‌ترین نقاط ضعف کاربرد این آنزیم در

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:25 +0430 on Wednesday May 31st 2017

مقیاس صنعتی می‌باشد. یکی از روش‌های موثر جهت افزایش مقاومت آنزیم و نیز بازیابی آن، استفاده از بسترهای مختلف جهت تثبیت آنزیم لکاز می‌باشد(۲۶). مطالعات مختلفی روی قابلیت کاربرد بسترهای مختلف نظیر کربن فعال، کیتوزان میکروسفری(۲۷)، بسترهای پلیمری(۲۸)، دانه‌های پلی اکریلونیتریل(۲۹) و نانوذرات مگنتیک کیتوزان(۳۰) صورت پذیرفته است. تاکنون مطالعات مختلفی در خصوص کاربرد آنزیم لکاز تثبیت شده برای حذف آلاینده‌های آلی مختلف نظیر کلروفنل‌ها(۳۱)، رنگ‌ها(۳۲) و پلی هیدروکربن‌های آروماتیک(۳۳) صورت پذیرفته است. با این حال تاکنون مطالعه مناسبی در خصوص تجزیه ترکیبات نیتروفنل توسط آنزیم لکاز تثبیت شده صورت نگرفته است. هدف از این مطالعه بررسی کارایی آنزیم لکاز (قارچ *Trametes versicolor*) تثبیت شده روی سیلیکای متخلخل در حذف آلاینده ۴،۲-دی نیتروفنل از محیط آبی بوده است.

مواد و روش ها

مطالعه حاضر یک مطالعه تجربی بوده است.

- مواد شیمیایی

پودر آنزیم لکاز از نوع قارچی *Trametes versicolor* با میزان فعالیت ۱۰ u/mg<، سیلیکای متخلخل سیلانیزه شده، محلول گلوتار آلدئید (۲۵درصد) و مدیاتور ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] از شرکت Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) و ترکیب ۲و۴- دی نیتروفنل، استونیتریل و متانول (خلوص HPLC) از شرکت Merck (Darmstadt, Germany) تهیه شد.

- تثبیت آنزیم روی بستر سیلیکای متخلخل

روش تثبیت آنزیم لکاز روی بستر سیلیکای متخلخل مطابق روش مطالعه Champagne and Ramsay می‌باشد(۵). ۴ گرم از بستر سیلیکای متخلخل (قطر ۳۵۵ mm-۶۰۰، سطح ۴۲/۱ m^2/g و قطر منافذ ۳۷/۵ nm) در محلول ۲/۵درصد گلوتار آلدئید در محلول بافر فسفات pH 5.0 (تحت فشار خلاء) قرار گرفت تا فرآیند Degasification انجام شود. پس از آن بستر را در محلول آنزیم لکاز (≈ 2.0 U/mL in 0.1 M KH_2PO_4 at pH 5.0) قرار داده و سپس توسط آب مقطر و محلول بافر فسفات شستشو می گردد(۹).

- سنجش آنزیم

میزان فعالیت آنزیم لکاز از طریق تولید رنگ ناشی از اکسیداسیون ABTS به رادیکال $ABTS^{\cdot-}$، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر CECIL 8600 درطول موج ۴۲۰nm تعیین گردید. محلول سنجش حاوی ترکیب ABTS با غلظت ۰/۲ mM، بافر سدیم استات ۰/۱ mM (pH =۵) و مقدار مشخصی از آنزیم بود(۲۹). فعالیت آنزیم به میزان یک واحد برابر با مقداری از آنزیم است که بتواند ۱ µmol از ABTS را در یک دقیقه اکسید نماید(۹).

جهت تعیین راندمان تثبیت آنزیم روی بستر سیلیکای متخلخل پس از طی مدت زمان لازم جهت تثبیت (حداقل ۳۶ ساعت)، بستر حاوی آنزیم استخراج گردیده و میزان فعالیت آن سنجیده شد(۹) که نتایج نشان داد تمامی آنزیم محلول در بافر روی بستر، تثبیت گردیده و محلول ثانویه هیچ‌گونه فعالیت آنزیمی نشان نداد . تصویر شماره ۱ مقادیر جذب نور توسط مدیاتور ABTS اکسید شده ناشی از واکنش با آنزیم لکاز تثبیت شده را نشان می‌دهد. محاسبات میزان فعالیت آنزیم لکاز بر مبنای رابطه بیر-لامبرت به صورت زیر است(۳۴):

$$A=\varepsilon CL \qquad \text{رابطه (۱)}$$

که در آن A برابر میزان جذب نور، ε برابر ضریب خاموشی سوبسترا ($M^{-1}\ cm^{-1}$)، L برابر فاصله عبوری نور (cm) و C برابر غلظت ماده جاذب نور (mol/L) می‌باشد. با توجه به این‌که میزان جذب نور در زمان‌های مختلف از دقیقه ۱ تا ۴ تماس سوبسترا با آنزیم اندازه‌گیری گردید، نمودار و معادله خط برای آن رسم شده که نوع معادله خط از نوع درجه یک می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:25 +0430 on Wednesday May 31st 2017

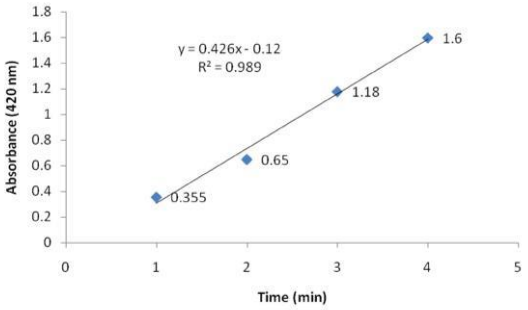
ضریب x در این معادله، جایگزین ضریب A در رابطه قانون بیر-لامبرت شده و مقدار C که برابر غلظت سوبسترای مصرف شده (ABTS- تولید شده) می‌باشد، محاسبه می‌گردد. مطابق نمودار شماره ۱، ضریب x در معادله خط به دست آمده برابر ۰/۴۲ می‌باشد.

رابطه (۲) $$C = \frac{A}{\varepsilon L}$$

رابطه (۳) $$C = \frac{0.42}{36000 \times 1} \times 10^6$$

رابطه (۴) $$C = 11.66\ \mu mol/L$$

رابطه(۵) $$C = \frac{11.66\ \mu mol/L \times 10mL}{1000mL/L} = 0.116 \mu mol$$



نمودار شماره ۱: مقادیر جذب نور توسط ABTS اکسید شده ناشی از واکنش با آنزیم

مشاهده می‌شود که در یک دقیقه، ۰/۱۱۶ µmol از ABTS- تولید می‌گردد. با توجه به تعریف میزان فعالیت آنزیم و این‌که مقدار آنزیم مورد استفاده برای تعیین میزان فعالیت آنزیم برابر ۰/۰۱ mg بود، بنابراین میزان فعالیت آنزیم لکاز تهیه شده برابر ۱۱/۶ u/mg به دست آمد.

رابطه (۵) $$Activity = \frac{0.116}{0.01} = 11.6\ u/mg$$

- تجزیه آلاینده ۲و۴-دی نیتروفنل توسط آنزیم تثبیت شده

در این مطالعه از روش یک فاکتور در زمان برای تعیین میزان حجم نمونه استفاده شد که حجم نمونه با احتساب تعیین قابلیت بازیابی و پایداری آنزیم تثبیت شده برابر ۳۸۰ نمونه درنظر گرفته شد. جهت تعیین کارایی آنزیم تثبیت شده بر تجزیه آلاینده ۲و۴-دی نیتروفنل، ۰/۵ گرم از سیلیکای متخلخل حاوی آنزیم لکاز تثبیت شده به میزان ۵۰±۳/۸ U (۱/۱۸±۰/۰۹ U/m^2) در راکتور ناپیوسته (ارلن مایر ۵۰ mL) ریخته شد. فاضلاب سنتتیک حاوی آلاینده ۲و۴-دی نیتروفنل با غلظت‌های ۳۰ ppm و ۲۰، ۱۰ (در بافر فسفات ۰/۱ M، ۶-۴=pH) و ABTS (مدیاتور) ۳ mM و ۲، ۱ به راکتور اضافه گردید. متغیر دما در حدوده ۴۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم و راکتور در انکوباتور شیکردار (۱۵۰ rpm) قرار داده شد. مرحله نمونه برداری شامل برداشت ۱ mL از محلول داخل راکتور (در فاصله زمانی ۲ تا ۱۲ ساعت) بود. سپس نمونه‌ها توسط فیلترهای ۰/۲ µm از جنس PTFE (Polytetrafluoroethylene) فیلتر گردیده و در ظروف شیشه‌ای تیره رنگ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

- آنالیز نمونه ها

جهت تعیین غلظت آلاینده ۲و۴-دی نیتروفنل موجود در محلول واکنش از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مدل CECIL 4100 مجهز به آشکارساز UV/VIS استفاده گردید. ستون مورد استفاده جهت جداسازی ترکیبات آلی ورودی به دستگاه از نوع PerfectSil MZ-1 (۲۵ cm*۴/۶ mm) بود. حلال مورد استفاده از نوع استونیتریل (خلوص HPLC) و بافر مورد استفاده از نوع محلول استات ۰/۵درصد بوده که به نسبت (v/v)۵۰:۵۰ و با دبی ۱ mL/min به داخل دستگاه وارد می‌شد. طول‌موج دتکتور برای آلاینده ۲و۴-دی نیتروفنل برابر ۲۶۰ nm بوده که زمان خروج آلاینده حدود دقیقه ۶ بود.

یافته ها

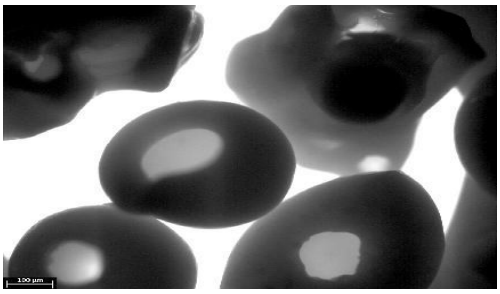
مورفولوژی بستر سیلیکای متخلخل با منافذ نانو با استفاده از میکروسکوپ SEM در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که مشخص است، اکثر دانه‌های سیلیکا (در مقیاس میکرون) به صورت کروی با سطوح یکنواخت می‌باشد. با این حال در مقیاس نانو،

www.SID.ir

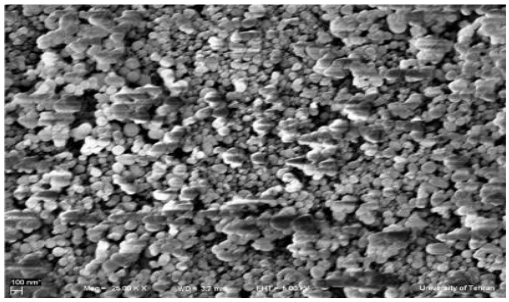
Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:25 +0430 on Wednesday May 31st 2017

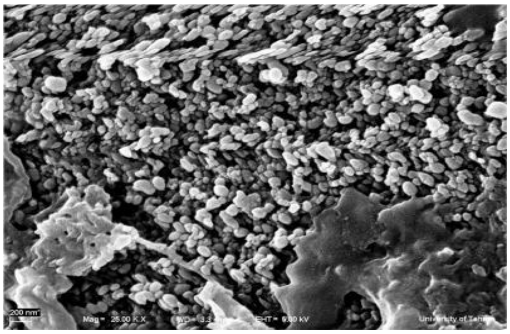
سطح دانه‌ها دارای حفرات بسیاری می‌باشد که قطر اکثر آن‌ها کم‌تر از ۱۰۰ nm است. وجود حفرات نانو روی سطح دانه‌ها، موجب افزایش سطح تماس و در نتیجه افزایش ظرفیت تثبیت آنزیم گردیده است. همان‌طور که در اطلاعات بستر خریداری شده ارائه گردیده است، مساحت سطحی دانه‌های سیلیکا برابر ۴۲/۱ m2/g می‌باشد.



الف



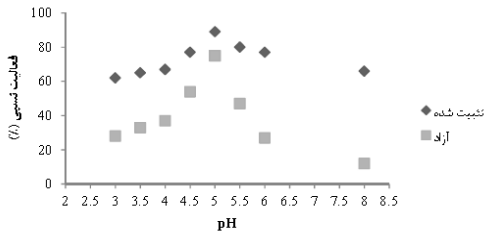
ب



ج

تصویر شماره ۱: تصویر میکروسکوپی دانه‌های بستر سیلیکای متخلخل با منافذ نانو: الف) نمای کلی دانه‌ها در مقیاس میکرون، ب) سطح دانه‌ها در حالت خام، ج) سطح دانه‌ها به همراه آنزیم تثبیت شده

میزان فعالیت آنزیم لکاز در دو شکل آزاد و تثبیت شده در شرایط مختلف pH و دما مقایسه گردید. همان‌طور که در تصویر شماره ۲ نشان داده شده است، بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم لکاز در pH=۵ به دست آمد. با این حال روند تغییرات میزان فعالیت آنزیم لکاز در دو شکل آزاد و تثبیت شده با هم تفاوت داشته به‌طوری که فعالیت آنزیم تثبیت شده در مقابل تغییرات pH کم‌تر از حالت آزاد آن بود که نشان از مقاومت بیش‌تر آنزیم تثبیت شده نسبت به شرایط محیطی را دارد. در محدوده pH=۴-۶، فعالیت نسبی آنزیم لکاز تثبیت شده حدود ۱۴درصد تغییر یافت در حالی که این میزان برای آنزیم آزاد حدود ۶۴ درصد بود. به علاوه آزمایشات اولیه نشان دادند که میزان فعالیت نسبی آنزیم آزاد و تثبیت شده لکاز در pH=۳ به ترتیب برابر ۲۸درصد و ۶۲درصد و در pH=۸ میزان فعالیت نسبی آنزیم تثبیت شده بین ۶۰ تا ۷۰ درصد بوده که در این شرایط آنزیم آزاد غیر فعال گردید. جهت تعیین تاثیر متغیر دما بر عملکرد آنزیم لکاز، میزان فعالیت آنزیم لکاز آزاد و تثبیت شده در محلول بافر فسفات ۰/۱ M، pH=۵ حاوی مدیاتور ABTS با غلظت ۱ mM در دمای ۲۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد بررسی گردید. همان‌طور که در تصویر شماره ۳ نشان داده شده است، حداکثر میزان فعالیت آنزیم لکاز آزاد و تثبیت شده در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به ثبت رسید. هم‌چنین میزان فعالیت آنزیم لکاز تثبیت شده در دماهای بالاتر (۵۰ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد) بیش‌تر از نوع آزاد آن بود. نتایج مطالعات مختلفی حاکی از مقاومت آنزیم تثبیت شده در برابر تغییرات دمایی در مقایسه با نوع آزاد آن می‌باشد(۲۹). نتایج مطالعه نشان داد که میزان فعالیت نسبی آنزیم لکاز آزاد در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد متوقف گردید در حالی که میزان فعالیت نسبی نوع تثبیت شده آن تنها ۴۰درصد کاهش یافته بود.

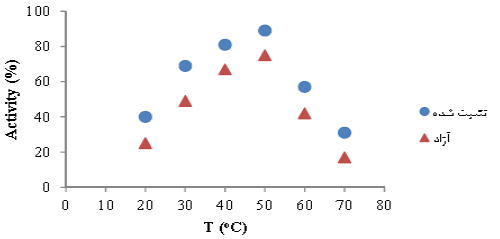


نمودار شماره ۲: فعالیت نسبی آنزیم لکاز آزاد و تثبیت شده در مقادیر مختلف pH، ABTS=۱ mM؛ دما=۲۵ °C

www.SID.ir

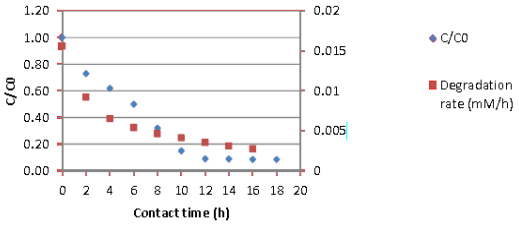
Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:25 +0430 on Wednesday May 31st 2017



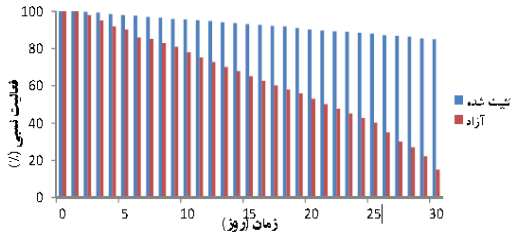
نمودار شماره ۳: مقایسه تاثیر متغیر دما بر عملکرد آنزیم لکاز آزاد و تثبیت شده، ABTS=۱ mM؛ pH=۵

تجزیه آنزیمی آلاینده ۲و۴-دی نیتروفنل در راکتور جریان ناپیوسته حاوی فاضلاب سنتتیک و آنزیم لکاز تثبیت شده روی سیلیکای متخلخل بررسی شد. نتایج مطالعه نشان داد که سیستم آنزیمی قادر به تجزیه آلاینده ۲و۴-دی نیتروفنل می‌باشد (نمودار شماره ۴). حداکثر راندمان تجزیه آلاینده ۲و۴-دی نیتروفنل در مدت ۱۲ ساعت تماس و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد (pH=۵، ABTS=۱ mM)، به میزان ۹۱درصد به دست آمد که غلظت باقیمانده آلاینده به کم تر از ۰/۹ میلی گرم در لیتر رسید. لازم به ذکر است که با افزایش زمان تماس بیش از ۱۲ ساعت، راندمان حذف آلاینده ۲و۴-دی نیتروفنل کاهش معنی‌داری نداشت ($p > ۰/۰۵$).



نمودار شماره ۴: غلظت باقیمانده و نرخ تجزیه آلاینده ۲و۴-دی نیتروفنل در مقادیر مختلف زمان ماند، 2,4-DNP =۱۰ ppm؛ ABTS=۱ mM؛ pH=۵ ؛دما=۵۰ °C

میزان پایداری آنزیم تثبیت شده روی بستر به عنوان یکی از شاخصه‌های مهم سیستم‌های تجزیه آنزیمی می‌باشد. نتایج مطالعه نشان داد که آنزیم لکاز تثبیت شده روی سیلیکای متخلخل دارای قابلیت کاربرد تا ۳۰ روز را دارا می‌باشد. میزان فعالیت آنزیم به صورت روزانه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و تغییر رنگ ناشی از مدیاتور ABTS اندازه‌گیری شد. همان‌طورکه در نمودار شماره ۵ نشان داده شده است، در طی دوره ۳۰ روزه آنزیم لکاز تثبیت شده روی سیلیکای متخلخل توانسته تا ۸۵ درصد فعالیت اولیه خود را حفظ نماید. در حالی که این مقدار برای آنزیم لکاز آزاد تنها ۱۵ درصد بود. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که فرآیند تثبیت آنزیم منجر به افزایش پایداری و حفظ فعالیت آنزیم لکاز شده است.



نمودار شماره ۵: مقایسه میزان پایداری آنزیم لکاز آزاد و تثبیت شده، ABTS=۱ mM؛ pH=۵ ؛دما=۵۰ °C

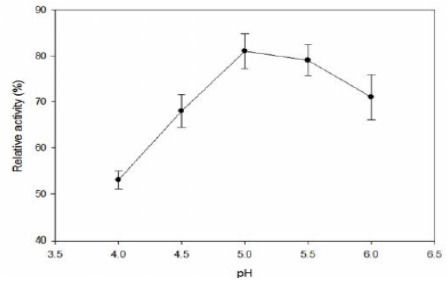
بحث

زمان تماس نقش بسیار مهمی در تجزیه آلاینده بازی می‌کند. Bhattacharya و Banerjee تاثیر مثبت افزایش زمان تماس را در حذف آلاینده ۲و۴- دی کلروفنل نشان دادند(۳۵). اما با افزایش غلظت آلاینده ۲و۴-دی نیتروفنل از ۱۰ به ۳۰ میلی‌گرم در لیتر، سرعت تجزیه آنزیمی از ۰/۰۱۵ mM/h به ۰/۰۰۲ mM/h کاهش یافت که می‌تواند به دلیل غیرفعال شدن آنزیم و یا افزایش غلظت ترکیبات آلی واسط ناشی از تجزیه آلاینده ۲و۴-دی نیتروفنل و در نتیجه مصرف شدن مقداری از توان سیستم آنزیمی جهت تجزیه این ترکیبات باشد(۲۹). همان‌طور که در نمودار شماره ۶ نشان داده شده است، روند تجزیه آنزیمی آلاینده ۲و۴-دی نیتروفنل منطبق با روند تغییر فعالیت آنزیم لکاز در شرایط مختلف pH می‌باشد که این نتایج مطابق یافته‌های سایر مطالعات می‌باشد(۳۷،۳۶). نتایج مطالعه نشان داد که عملکرد بهینه سیستم آنزیمی در تجزیه آلاینده ۲و۴-دی نیتروفنل در pH=۵ بوده که مشابه نتایج سایر مطالعات بود(۳۸،۳۶). اما Okazaki و

www.SID.ir

Archive of SID

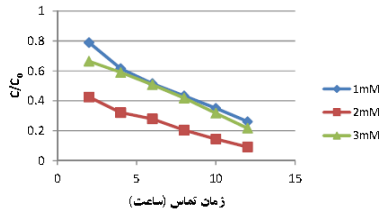
همکاران pH=۳ را به عنوان pH بهینه برای تجزیه آنزیمی آلاینده α-phenylenediamine توسط آنزیم لکاز ناشی از قارچ *Carialus versicalar* نشان دادند که این تفاوت را می‌توان به دلیل بافر، نوع و خلوص آنزیم مورد استفاده توجیه نمود(۳۹). Nicolucci و همکاران نشان دادند که میزان فعالیت آنزیم لکاز در pH اسیدی بیش‌تر از محیط قلیایی می‌باشد(۲۹). به علاوه میزان فعالیت آنزیم لکاز تثبیت شده در محدوده pH=۴-۶/۲ تقریباً ثابت بود(۳۹).



نمودار شماره ۶: فعالیت نسبی آنزیم لکاز تثبیت شده در مقادیر مختلف pH، ۱۰ =2,4-DNP ppm؛ ABTS=۱ mM؛ دما=۵۰ oC

غلظت آلاینده (سوبسترا) یکی از پارامترهای مهم در ارزیابی عملکرد سیستم‌های بیولوژیکی می‌باشد. غلظت سوبسترا می‌تواند به عنوان یک عامل دو جانبه روی عملکرد سیستم‌های بیولوژیکی تاثیر بگذارد. همان‌طور که نتایج مطالعه نشان داد، افزایش غلظت آلاینده ۲و۴-دی نیتروفنل از ۱۰ mg/L به ۳۰ mg/L موجب کاهش راندمان اکسیداسیون از ۹۱درصد به ۵۶/۶ درصد در شرایط بهینه (pH=۵، مدیاتور= ۱ mM، دما ۵۰ درجه سلسیوس) گردید که آزمون ANOVA نشان از تاثیر معنی‌دار افزایش غلظت آلاینده بر کاهش راندمان عملکرد سیستم آنزیمی داشت (p<۰/۰۵). در مطالعه‌ای که توسط Qiu و همکاران در سال ۲۰۱۰ روی حذف آلاینده‌های دی‌کلروفنل و تری‌کلروفنل توسط آنزیم لکاز تثبیت شده روی سیلیکای متخلخل تهیه شده به روش Sol-gel انجام گردید، مشخص شد که با افزایش غلظت آلاینده‌های دی کلروفنل و تری‌کلروفنل از mM ۰/۲ به mM ۲ (غلظت آنزیم g/L ۷، pH=۴/۵، دمای °C ۴۵)، راندمان حذف به ترتیب ۵/۸درصد (۹۱/۴ درصد به ۸۵/۶ درصد) و ۶ درصد (۹۸ درصد به ۹۲ درصد) کاهش یافت(۴۰).

آنزیم لکاز معمولاً دارای پتانسیل ردوکس پایینی بوده (۰/۸ V-۰/۶) که کاربرد آن را برای تجزیه طیف گسترده‌ای از آلاینده‌های آلی محدود می‌سازد (۴۱-۴۳). با این وجود استفاده از ترکیبات با وزن مولکولی کم که معمولاً به عنوان مدیاتور شناخته می‌شوند، می‌تواند سرعت اکسیداسیون ترکیب آلی را افزایش داده و بنابراین دامنه کاربرد این آنزیم را افزایش دهد. نقش مدیاتور به عنوان یک انتقال دهنده الکترون بین آنزیم و ماده آلی می‌باشد(۴۴). مدیاتور اکسید شده توسط آنزیم لکاز می‌تواند آلاینده آلی را به دلیل بالا بودن پتانسیل ردوکس (۱/۸ V برای ABTS) به راحتی اکسید نماید(۴۵). نتایج مطالعه نشان داد که افزایش غلظت مدیاتور ABTS از ۱ mM به ۳ mM منجر به افزایش راندمان حذف آلاینده ۲و۴-دی نیتروفنل گردید (تصویر شماره ۷). در طی فرآیند تجزیه، رنگ محلول از آبی مایل به سبز به زرد کم رنگ تغییر یافت که نشان از حضور ترکیب $ABTS^{++}$ در محیط داشت. Liu نشان داد که افزایش غلظت ABTS از ۱۰ تا ۲۰۰ میکرومول منجر به افزایش تجزیه آلاینده Bisphenol A می گردد(۳۹).



نمودار شماره۷: تاثیر غلظت مدیاتور بر تجزیه آلاینده ۲و۴-دی نیتروفنل توسط سیستم آنزیمی لکاز تثبیت شده، ۱۰ =2,4-DNP ppm؛ pH=۵؛ دما=۵۰ oC

در سیستم‌های آنزیمی راکتوری، مسئله دسترسی آنزیم به سوبسترا بسیار مهم است. هرچه غلظت سوبسترا

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:25 +0430 on Wednesday May 31st 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:25 +0430 on Wednesday May 31st 2017

کم تر باشد، دسترسی آنزیم به سوبسترا نیز کم‌تر بوده و در نتیجه راندمان حذف سوبسترا کاهش می‌یابد. از سوی دیگر نسبت آنزیم به سوبسترا نیز حائز اهمیت می‌باشد. هرچه این نسبت بالاتر باشد، به معنای اکسیداسیون بیش تر سوبسترا بوده که البته در غلظت‌های بالای آنزیم، اکسیداسیون سوبسترا تقریباً ثابت می‌ماند(۳۹). در این مطالعه با توجه به این‌که در سیستم آنزیمی مورد استفاده جهت حذف آلاینده ۲و۴-دی نیتروفنل از مدیاتور ABTS به عنوان ماده واسط جهت اکسیداسیون آلاینده استفاده گردید و در نتیجه اکسیداسیون مدیاتور ABTS توسط آنزیم لکاز و سپس اکسیداسیون آلاینده توسط مدیاتور اکسید شده، می‌توان نتیجه گرفت که مدیاتور به عنوان عامل اکسیدکننده آلاینده مطرح بوده و در نتیجه نسبت غلظت مدیاتور به سوبسترا (آلاینده) دارای اهمیت می‌باشد. نتایج مطالعه نشان داد که نسبت غلظت مدیاتور به سوبسترا در شرایط بهینه حذف (pH=۵، غلظت مدیاتور ۳ mM، غلظت آلاینده ۱۰ mg/L) برابر ۲۰:۱ به‌دست آمد. با افزایش غلظت آلاینده (۲۰ mg/L و ۳۰) نسبت غلظت مدیاتور به سوبسترا به ترتیب به ۱۰:۱ و ۱: ۶/۷ کاهش یافته و از آن جا راندمان حذف آلاینده از ۹۱ درصد به ۵۶/۶ درصد کاهش یافت. پیدایش این امر را می‌توان به ثابت بودن نسبت آنزیم به مدیاتور و در عین حال کاهش نسبت مدیاتور به سوبسترا نسبت داد. Catapane و همکاران با استفاده از آنزیم لکاز تثبیت شده روی بستر polyacrylonitrile جهت حذف آلاینده‌های alkylphenols از محیط آبی نشان دادند که با افزایش غلظت آلاینده از ۰/۱ mM تا ۲ mM، راندمان حذف از حدود ۱۰۰درصد به نزدیک ۵۰درصد کاهش می یابد که به دلیل کاهش نسبت مدیاتور (ABTS) به سوبسترا از ۲۰:۱ به۱۰:۱ بود(۴۶).

دما به عنوان یکی از متغیرهای مهم در سیستم‌های تجزیه آنزیمی در نظر گرفته شده و معمولاً دارای نقش دوگانه‌ای روی سیستم‌های آنزیمی می‌باشد. اکثر آنزیم‌ها در دماهای متوسط تا بالا (°C ۷۰-۶۰) و برخی نیز در دماهای کم‌تر از °C ۱۰ غیرفعال می‌شوند. غیرفعال شدن گرمایی اغلب به دلیل تغییر شکل ساختار سه بعدی آنزیم از طریق گسسته شدن یا تخریب سایت‌های فعال آنزیم رخ می‌دهد. از طرف دیگر با افزایش دما سرعت واکنش آنزیمی بر اساس نظریه آرنیوس، افزایش می‌یابد(۴۷). بنابراین دما دارای دو اثر مستقل از هم بر عملکرد سیستم آنزیمی تجزیه آلاینده می‌باشد که شامل تغییر در سرعت واکنش (طی زمان) به دلیل غیر فعال شدن آنزیم و تغییر در سرعت واکنش می‌باشد(۳۹).

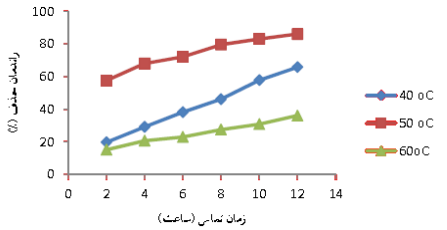
به طورکلی با افزایش دمای محیط تا مرز °C ۷۰، روند غیر فعال‌سازی آنزیم تشدید می‌یابد که این امر به دلیل حساسیت مولکول‌های پروتئینی آنزیم نسبت به تغییرات دمایی و دناتوره شدن و تغییر شکل یافتن مولکول‌ها می‌باشد. البته لازم به ذکر است که آنزیم‌ها در حالت تثبیت شده نسبت به افزایش درجه حرارت مقاومت بیش‌تری داشته و فعالیت خود را در دماهای بالاتر حفظ می‌کنند. این امر به دلیل محافظت آنزیم باند شده توسط بستر تثبیت شده در برابر تغییرات دمایی می‌باشد(۴۸). نتایج مطالعه نشان داد که افزایش دما از ۴۰ به ۶۰ درجه سانتی‌گراد (با ثابت نگه‌داشتن سایر متغیرها)، راندمان حذف آلاینده ۲و۴-دی نیتروفنل از ۹۱ درصد به ۳۳ درصد کاهش یافت. همان‌طورکه در نمودار شماره ۸ نشان داده شده است، میزان فعالیت نسبی آنزیم لکاز تثبیت شده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد بر خلاف آنزیم آزاد که غیرفعال شده است تا حدودی حفظ شده است که به دلیل فرآیند تثبیت آنزیم می‌باشد(۴۹). نتایج این مطالعه مشابه نتایج سایر مطالعات می‌باشد که میزان فعالیت آنزیم لکاز تثبیت شده را حتی تا دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد هم گزارش نموده‌اند(۳۹). Tavares و همکاران با بررسی کارایی آنزیم لکاز تثبیت شده روی بستر سیلیکای متخلخل در حذف آلاینده 1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate نشان دادند که مقاومت دمایی آنزیم لکاز در دمای °C ۵۵ بعد از گذشت زمان ۶ ساعت به‌طور معنی‌داری تغییر

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:25 +0430 on Wednesday May 31st 2017

نمی‌کند در حالی که در دمای ۷۵ °C و بعد از گذشت زمان حدود ۲/۵ ساعت، آنزیم لکاز تثبیت شده تقریباً غیرفعال می‌شود(۳۴).



نمودار شماره ۸: میزان تجزیه آلاینده ۲و۴-دی نیتروفنل توسط سیستم آنزیمی لکاز تثبیت شده در شرایط مختلف دمایی، pH=۵ ؛ABTS=۱ mM ؛2,4-DNP =۱۰ ppm

در این مطالعه عملکرد سیستم آنزیمی لکاز تثبیت شده روی سیلیکای متخلخل جهت حذف آلاینده ۲و۴-دی نیتروفنل از محیط آبی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سیستم آنزیمی مورد استفاده دارای کارایی بالایی در حذف آلاینده ۲و۴-دی نیتروفنل از محیط آبی را دارد. شرایط بهینه برای رسیدن به حداکثر حذف آلاینده (۹۱ درصد) شامل زمان ماند ۱۲ ساعت، دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و pH=۵ بود. مطالعه نشان داد که آنزیم تثبیت شده نسبت به تغییرات محیطی دارای مقاومت بسیار بیش‌تری در مقایسه با آنزیم آزاد می باشد. با ارتقای ویژگی‌های پایداری و قابلیت استفاده مجدد آنزیم لکاز تثبیت شده روی سیلیکای متخلخل می‌توان از این سیستم به عنوان یک سیستم موثر در تصفیه فاضلاب های صنعتی استفاده نمود.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از دانشگاه علوم پزشکی تهران بابت حمایت‌های مالی این مقاله، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Shukla S, Dorris K, Chikkaveeraiah B. Photocatalytic degradation of 2, 4-dinitrophenol. J Hazard Mater 2009; 164(1): 310-314.
2. ATSDR. Toxicological Profile for Dinitrophenols. Atlanta. U.S. Department of Health and Human Services (ATSDR), 1995.
3. Ahmadimoghaddam M, Mesdaghinia AR, Naddafi K, Nasseri S. Degradation of 2,4-Dinitrophenol by Photo Fenton Process. Asian J Chem 2010; 22(2): 1009-1016.
4. Dadban Shahamat Y, Zazouli MA, Asgharnia H, Dehghanifard E. Evaluation of Rapid Purification of High Concentrations of 2, 4-Dinitrophenol in Wastewater Using Catalytic Ozonation with Carboneus Nanocomposite. J Mazandaran U Med Sci 2016; 25(133): 138-49 (Persian).
5. Ghaneian MT, Ghanizadeh G. Application of Enzymatic Polymerization Process for the Removal of Phenol from Synthetic Wastewater. Iran J Health Environ 2009; 2(1): 46-55 (Persian).
6. Rahimzadeh Barzoki H, Rahmani A, Dadban Shahamat Y, Beirami S. Adsorption of 2, 4 dinitrophenol from Aqueous Solutions Using Ordered Mesoporous Carbon CMK-3. J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(135): 119-129 (Persian).
7. Dai R, Chen J, Lin J, Xiao S, Chen S, Deng Y. Reduction of nitro phenols using nitroreductase from E. coli in the presence of NADH. J Hazard Mater 2009; 170(1): 141-143.
8. She ZL, Li LL, Zhu YJ, Xie T, Jiang LN, Gao MC. Degradation of 3-Nitrophenol with Sodium Acetate as Co-Substrate in an Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor. Adv Mater Res 2012; 393: 1153-1156.
9. Champagne PP, Ramsay JA. Dye decolorization and detoxification by laccase immobilized on

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:25 +0430 on Wednesday May 31st 2017

porous glass beads. Bioresource Technol 2010; 101(7): 2230-2235.

10. Hibi M, Hatahira S, Nakatani M, Yokozeki K, Shimizu S, Ogawa J. Extracellular oxidases of Cerrena sp. complementarily functioning in artificial dye decolorization including laccase, manganese peroxidase, and novel versatile peroxidases. Biocatal Agric Biotechnol 2012; 1(3): 220-225.
11. Kunamneni A, Ghazi I, Camarero S, Ballesteros A, Plou FJ, Alcalde M. Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers. Process Biochem 2008; 43(2): 169-178.
12. Peralta-Zamora P, Pereira CM, Tiburtius ERL, Moraes SG, Rosa MA, Minussi RC, et al. Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase. Appl Catal B-Environ 2003; 42(2): 131-144.
13. Gholami-Borujeni F, Mahvi AH, Naseri S, Faramarzi MA, Nabizadeh R, Alimohammadi M. Application of immobilized horseradish peroxidase for removal and detoxification of azo dye from aqueous solution. Res J Chem Environ 2011; 15(2): 217-222.
14. Aghaie-Khouzani M, Forootanfar H, Moshfegh M, Khoshayand M, Faramarzi M. Decolorization of some synthetic dyes using optimized culture broth of laccase producing ascomycete Paraconiothyrium variabile. Biochem Eng J 2011; 60: 9-15.
15. Forootanfar H, Movahednia MM, Yaghmaei S, Tabatabaei-Samani M, Rastegar H, Sadighi A, et al. Removal of chlorophenolic derivatives by soil isolated ascomycete of Paraconiothyrium variabile and studying the role of its extracellular laccase. J Hazard Mater 2012; 209-210: 199-203.
16. Rekuc A, Jastrzembska B, Liesiene J, Bryjak J. Comparative studies on immobilized laccase behaviour in packed-bed and batch reactors. J Mol Catal B-Enzym 2009; 57(1-4): 216-223.
17. Berrio J, Plou FJ, Ballesteros A, Martínez ÁT, Martínez MJ. Immobilization of pycnoporus coccineus laccase on Eupergit C: Stabilization and treatment of olive oil mill wastewaters. Biocatal Biotransformation 2007; 25(2-4): 130-134.
18. Ko CH, Fan C. Enhanced chemical oxygen demand removal and flux reduction in pulp and paper wastewater treatment using laccase-polymerized membrane filtration. J Hazard Mater 2010; 181(1-3): 763-770.
19. Steevensz A, Al-Ansari MM, Taylor KE, Bewtra JK, Biswas N. Comparison of soybean peroxidase with laccase in the removal of phenol from synthetic and refinery wastewater samples. J Chem Technol Biotechnol 2009; 84(5): 761-769.
20. Strong PJ, Burgess JE. Bioremediation of a wine distillery wastewater using white rot fungi and the subsequent production of laccase. Water Sci Technol 2007; 56(2): 179-186.
21. Lu J, Huang Q, Mao L. Removal of acetaminophen using enzymemediated oxidative coupling processes: I. Reaction rates and pathways. Environ Sci Technol 2009; 43(18): 7062-7067.
22. Lloret L, Eibes G, Lú-Chau TA, Moreira MT, Feijoo G, Lema JM. Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens. Biochem Eng J 2010; 51(3): 124-131.
23. Kim YJ, Nicell JA. Laccase-catalyzed oxidation of aqueous triclosan. J Chem Technol Biotechnol 2006; 81(8): 1344-1352.
24. Cabana H, Habib-Jiwan JL, Rozenberg R, Elisashvili V, Penninckx M, Agathos SN, et al. Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:25 +0430 on Wednesday May 31st 2017

personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus Coriolopsis polyzona. Chemosphere 2007; 67(4): 770-778.

25. Camarero S, Cañas AI, Nousiainen P, Record E, Lomascolo A, Martínez MJ, et al. P-hydroxycinnamic acids as natural mediators for laccase oxidation of recalcitrant compounds. Environ Sci Technol 2008; 42(17): 6703-6709.
26. Wang P, Fan X, Cui L, Wang Q, Zhou A. Decolorization of reactive dyes by laccase immobilized in alginate/gelatin blent with PEG. J Environ Sci 2008; 20(12): 1519-1522.
27. Jiang D-S, Long S-Y, Huang J, Xiao H-Y, Zhou J-Y. Immobilization of Pycnoporus sanguineus laccase on magnetic chitosan microspheres. Biochem Eng J 2005; 25(1): 15-23.
28. Stanescu MD, Gavrilas S, Ludwig R, Haltrich D, Lozinsky VI. Preparation of immobilized Trametes pubescens laccase on a cryogel-type polymeric carrier and application of the biocatalyst to apple juice phenolic compounds oxidation. Eur Food Res Technol 2012; 234(4): 655-662.
29. Nicolucci C, Rossi S, Menale C, Godjevargova T, Ivanov Y, Bianco M, et al. Biodegradation of bisphenols with immobilized laccase or tyrosinase on polyacrylonitrile beads. Biodegradation 2011; 22(3): 673-683.
30. Kalkan NA, Aksoy S, Aksoy EA, Hasirci N. Preparation of chitosancoated magnetite nanoparticles and application for immobilization of laccase. J Appl Polymer Sci 2012; 123(2): 707-716.
31. Gaitan IJ, Medina SC, González JC, Rodríguez A, Espejo ÁJ, Osma JF, et al. Evaluation of toxicity and degradation of a chlorophenol mixture by the laccase produced by Trametes pubescens. Bioresource Technol 2011; 102(3): 3632-3635.
32. Mogharabi M, Nassiri-Koopaei N, Bozorgi-Koushalshahi M, Nafissi-Varcheh N, Bagherzadeh G, Faramarzi MA. Immobilization of laccase in alginate-gelatin mixed gel and decolorization of synthetic dyes. Bioinor Chem Appl 2012; 2012.
33. Dai Y, Yin L, Niu J. Laccase-carrying electrospun fibrous membranes for adsorption and degradation of PAHs in shoal soils. Environ Sci Technol 2011; 45(24): 10611-1068.
34. Tavares AP, Rodríguez O, Fernández MF, Domínguez A, Moldes D, Sanromán MA, et al. Immobilization of laccase on modified silica: stabilization, thermal inactivation and kinetic behaviour in 1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate ionic liquid. Bioresource Technol 2013; 131: 405-412.
35. Bhattacharya S, Banerjee R. Laccase mediated biodegradation of 2, 4-dichlorophenol using response surface methodology. Chemosphere 2008; 73(1): 81-85.
36. Aktaş N, Tanyolaç A. Reaction conditions for laccase catalyzed polymerization of catechol. Bioresour Technol 2003; 87(3): 209-214.
37. Okazaki S, Michizoe J, Goto M, Furusaki S, Wariishi H, Tanaka H. Oxidation of bisphenol A catalyzed by laccase hosted in reversed micelles in organic media. Enzyme Microb Technol 2002; 31(3): 227-232.
38. Rancano G, Lorenzo M, Molares N, Rodríguez Couto S, Sanromán MÁ. Production of laccase by Trametes versicolor in an airlift fermentor. Process Biochem 2003; 39(4): 467-473.
39. Liu Y. Laccase-Catalyzed Oxidation of Bisphenol A in a Non-Aqueous Liquid Using Reverse Micelles. Montreal: McGill; 2004.

www.SID.ir

Archive of SID

40. Qiu L, Huang Z. The treatment of chlorophenols with laccase immobilized on sol–gel-derived silica. World J Microbio Biotechnol 2010; 26(5): 775-781.
41. Frasconi M, Favero G, Boer H, Koivula A, Mazzei F. Kinetic and biochemical properties of high and low redox potential laccases from fungal and plant origin. Biochim Biophys Acta 2010; 1804(4): 899-908.
42. Hong G, Ivnitski DM, Johnson GR, Atanassov P, Pachter R. Design parameters for tuning the type 1 Cu multicopper oxidase redox potential: insight from a combination of first principles and empirical molecular dynamics simulations. J Am Chem Soc 2011; 133(13): 4802-4809.
43. Sadhasivam S, Savitha S, Swaminathan K, Lin F-H. Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated Trichoderma harzianum WL1. Process Biochem 2008; 43(7): 736-742.
44. Fabbrini M, Galli C, Gentili P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. J Mol Catal B-Enzym 2002; 16(5): 231-240.
45. D'Acunzo F, Galli C, Masci B. Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems. Eur J Biochem 2002; 269(21): 5330-5335.
46. Catapane M, Nicolucci C, Menale C, Mita L, Rossi S, Mita DG, et al. Enzymatic removal of estrogenic activity of Nonylphenol and Octylphenol aqueous solutions by immobilized laccase from Trametes versicolor. J Hazard Mater 2013; 248-249: 337-346.
47. Kurniawati S, Nicell JA. A comprehensive kinetic model of laccase catalyzed oxidation of aqueous phenol. Biotechnol Progr 2009; 25(3): 763-773.
48. Illanes A. Enzyme biocatalysis: principles and applications: Netherlands, Springer; 2008.
49. Kunamneni A, Camarero S, García-Burgos C, Plou FJ, Ballesteros A, Alcalde M. Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. Microb Cell Factor 2008; 7(1): 32.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:25 +0430 on Wednesday May 31st 2017

www.SID.ir