

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

Ahmad Jonidi Jafari¹,
Roshanak Rezaei Kalantary¹,
Emad Dehghanifard^{2,3},
Amir Hossein Mahvi⁴,
Mohammad Ali Faramarzi⁵,
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)

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).

بررسی کارایی آنزیم لکاز تثبیت شده روی سیلیکای متخلخل در حذف آلاینده ۴،۲-دی نیتروفلنل 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: ۴و۲-دی نیتروفلنل 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 ۴و۲-دی نیتروفلنل با استفاده از آنزیم لکاز تثبیت شده روی بستر سیلیکای متخلخل بوده است.

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

یافته‌ها: بیش‌ترین حذف آلاینده ۴و۲-دی نیتروفلنل به میزان ۹۱ درصد و در شرایط دمای ۵۰ درجه، غلظت آلاینده ۱۰ ppm، مدیاتور ۱ mM، pH=۵ و زمان ماند ۱۲ ساعت به دست آمد. آزمون ANOVA نشان داد که موثرترین متغیر در فرآیند حذف، زمان ماند و کم‌تأثیرترین متغیر، pH بود.

استنتاج: آلاینده ۴و۲-دی نیتروفلنل 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.

واژه‌های کلیدی: لکاز، تجزیه زیستی، سیلیکای متخلخل با منافذ نانو، ۴و۲-دی نیتروفلنل، محلول‌های آبی

مقدمه

ترکیبات نیتروفلنل (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 نیتروفلنل‌ها به عنوان مهم‌ترین ترکیب از میان ترکیبات نیتروفلنل می‌باشند که در بین آن‌ها ۴و۲-دی نیتروفلنل (2,4-DNP) سمی‌ترین

E-mail: dehghanifard@yahoo.com

مؤلف مسئول: عماد دهقانی فرد - کرج: دانشگاه علوم پزشکی البرز، مرکز تحقیقات بهداشت ایمنی و محیط (HSE)

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

ترکیب و در دسته ترکیبات سخت تجزیه پذیر می باشد (۱).
 ۴ و ۲- دی نیتروفل به صورت کریستال جامد زرد رنگ بوده که در صنایع تولید حشره کش ها، داروسازی، رنگ نساجی، مواد انفجاری و به عنوان نشان گر وجود یون های پتاسیم و آمونیوم کاربرد دارد. پس از ورود DNP به بدن، جریان خون این آلاینده را به ارگان های مختلف بدن نظیر کبد، کلیه ها و چشم ها می برد. قابلیت تجمع پذیری DNP پایین بوده، با این حال DNP توسط فرآیندهای شیمیایی به متابولیت های واسط تبدیل شده که منجر به بروز اثرات کوتاه مدت و بلند مدت می شود. اثرات کوتاه مدت آن شامل افزایش دمای بدن، افزایش سوخت و ساز بدن، اگرما و حساسیت های پوستی است. مواجهه طولانی مدت با این آلاینده موجب بروز آب مروارید، تورم غدد لنفاوی، کاهش میزان گلبول های سفید، مرگ زودرس جنین، پوکی استخوان، از بین رفتن ناخن ها، آسیب سیستم اعصاب مرکزی، آسیب سیستم قلبی- عروقی و در نهایت مرگ زودرس می گردد. سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا DNP را در ردیف آلاینده های دارای تقدم طبقه بندی و استاندارد آن را در منابع آبی نظیر رودخانه ها و دریاچه ها، کم تر از 0.07 mg/L اعلام نموده است (۲). ورود این ترکیب به محیط زیست ناشی از فاضلاب های صنایع، حوادث یا به عنوان ترکیب واسط ناشی از تجزیه آفت کش های حاوی ۴ و ۲- دی نیتروفل می باشد (۳).

روش های مختلف فیزیکی و شیمیایی که برای تصفیه آلاینده های نیتروفل مورد استفاده قرار گرفته اند شامل فرآیندهای جذب، اکسیداسیون شیمیایی، ترسیب، تبخیر و سوزاندن می باشد که هر کدام از این روش ها دارای محدودیت های اقتصادی و کاربردی می باشد (۴-۶). استفاده از روش های بیولوژیکی جهت تجزیه ترکیبات آلی به دلیل کارایی و قابلیت کاربرد بالا، همواره مورد توجه بوده است (۷، ۸). در این میان استفاده از قارچ های سفید پوسیدگی (White rot) جهت تجزیه طیف گسترده ای از ترکیبات آلی سخت تجزیه پذیر، به خصوص ترکیبات

حاوی فلز مورد توجه بوده است. اساس کار تجزیه ای این قارچ ها، ترشح آنزیم های تغییردهنده لیگنین نظیر آنزیم منگنز (II) پراکسیداز، لیگنین پراکسیداز و لکاز (فلز اکسیداز) می باشد (۹-۱۱). اگرچه کارآیی فرآیندهای بیولوژیکی در غلظت های کم آلاینده ها مورد توجه می باشد، با این حال حساسیت این فرآیندها نسبت به شوک های 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 محدودیت ها در فرآیندهای بر پایه آنزیم، به دلیل قابلیت کاربرد برای طیف گسترده ای از آلاینده های آلی با غلظت های 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 (اکثر آفل ها) از طریق احیای اکسیژن به آب را دارا می باشد (۱۴-۱۶). آنزیم لکاز قادر به اکسیداسیون ترکیبات آروماتیک و به خصوص ترکیبات فنله می باشد. ترکیبات فنله ناشی از صنایع روغن زیتون، پتروشیمی، خمیر و کاغذ و پالایش الکل به خوبی توسط اکسیداسیون به وسیله آنزیم لکاز اکسیده شده اند (۲۰-۱۷). هم چنین نتایج سایر مطالعات درخصوص اکسیداسیون آلاینده های نوترکیب حاوی حلقه های فنله نظیر استامینوفن (۲۱)، دیکلوفناک، استرادیول، استرون، اتینیل استرادیول (۲۲)، تری کلوسان (۲۳)، بیس فنل A و نونیل فنل (۲۴) حاکی از اکسیداسیون این ترکیبات توسط آنزیم لکاز می باشد. هم چنین آنزیم لکاز می تواند به طور غیرمستقیم با سایر ترکیبات آلی سخت تجزیه پذیر نیز واکنش داده و آن ها را اکسید نماید. برای نمونه ترکیب اکسی بنزن به طور مستقیم توسط آنزیم لکاز قادر به اکسید شدن نمی باشد (۲۵). علی رغم مزایای کاربرد این آنزیم نظیر کارایی بالا، غیر فعال شدن در اثر تغییر شرایط محیطی (pH، دما و غیره) و هم چنین عدم قابلیت بازیابی آن از مهم ترین نقاط ضعف کاربرد این آنزیم در

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 پلی‌اکریلونیتریل (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 کلروفل‌ها (۳۱)، رنگ‌ها (۳۲) و پلی‌هیدروکربن‌های آروماتیک (۳۳) صورت پذیرفته است. با این حال تاکنون مطالعه مناسبی در خصوص تجزیه ترکیبات نیتروفل 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 نیتروفل از محیط آبی بوده است.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر یک مطالعه تجربی بوده است.

- مواد شیمیایی

پودر آنزیم لکاز از نوع قارچی *Trametes versicolor* با میزان فعالیت $>10 \text{ u/mg}$ ، سیلیکای متخلخل سیلانیزه شده، محلول گلو تار آلدئید (۲۵ درصد) و مدياتور ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)] از شرکت Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) و ترکیب ۴و۲-دی نیتروفل، 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 ۳۵۵-۶۰۰ mm²/g ۴۲/۱ و قطر منافذ ۳۷/۵ nm)

در محلول ۲/۵ درصد گلو تار 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 ($\approx 2.0 \text{ U/mL}$ in $0.1 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$ at pH 5.0) قرار داده و سپس توسط آب مقطر و محلول بافر فسفات شستشو می‌گردد (۹).

- سنجش آنزیم

میزان فعالیت آنزیم لکاز از طریق تولید رنگ ناشی از اکسیداسیون ABTS به رادیکال $\text{ABTS}^{\cdot-}$ ، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر CECIL 8600 در طول موج ۴۲۰ nm 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 $1 \mu\text{mol}$ 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 هیچ گونه فعالیت آنزیمی نشان نداد. تصویر شماره ۱ مقادیر جذب نور توسط مدياتور 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):

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

که در آن A برابر میزان جذب نور، ε برابر ضریب خاموشی سوبسترا ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)، L برابر فاصله عبوری نور (cm) و C برابر غلظت ماده جاذب نور (mol/L) می‌باشد. با توجه به این که 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.

شده به میزان $50 \pm 3/8 \text{ U}$ ($1/18 \pm 0/9 \text{ U/m}^2$) در راکتور ناپیوسته (ارلن مایر ۵۰ mL) ریخته شد. فاضلاب سنتتیک حاوی آلاینده ۴۰۲-دی نیتروفل با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ ppm (در بافر فسفات ۰/۱ M، pH=۴-۶) و ABTS (مدیاتور) ۳ mM و ۲، ۱ به راکتور اضافه گردید. متغیر دما در محدوده ۴۰ تا ۶۰ درجه سانتی گراد 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 $0/2 \mu\text{m}$ از جنس PTFE (Polytetrafluoroethylene) فیلتر گردیده و در ظروف شیشه‌ای تیره رنگ و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

- آنالیز نمونه ها

جهت تعیین غلظت آلاینده ۴۰۲-دی نیتروفل 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 MZ-1 PerfectSil ($25 \text{ cm} \times 4/6 \text{ mm}$) بود. حلال مورد استفاده از نوع استونیتریل (خلوص HPLC) و بافر مورد استفاده از نوع محلول استات ۰/۵ درصد بوده که به نسبت (v/v) ۵۰:۵۰ و با دبی ۱ mL/min به داخل دستگاه وارد می‌شد. طول موج دتکتور برای آلاینده ۴۰۲-دی نیتروفل 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،

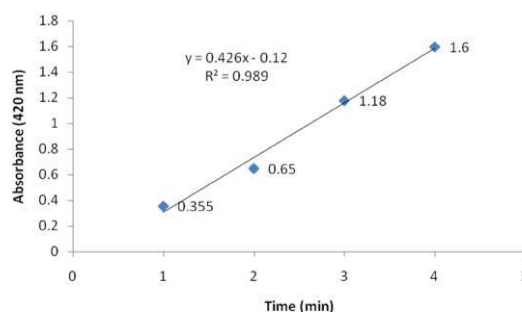
ضریب x در این معادله، جایگزین ضریب A در رابطه قانون بیر-لامبرت شده و مقدار C که برابر غلظت سوبسترای مصرف شده (ABTS- تولید شده) می‌باشد، محاسبه می‌گردد. مطابق نمودار شماره ۱، ضریب x در معادله خط به دست آمده برابر ۰/۴۲ می‌باشد.

$$C = \frac{A}{\epsilon L} \quad \text{رابطه (۲)}$$

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

$$C = 11.66 \mu\text{mol/L} \quad \text{رابطه (۴)}$$

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



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

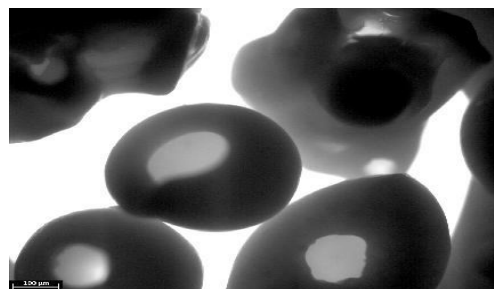
مشاهده می‌شود که در یک دقیقه، $0/116 \mu\text{mol}$ از ABTS- تولید می‌گردد. با توجه به تعریف میزان فعالیت آنزیم و این که مقدار آنزیم مورد استفاده برای تعیین میزان فعالیت آنزیم برابر ۰/۱ mg بود، بنابراین میزان فعالیت آنزیم لکاز تهیه شده برابر ۱۱/۶ u/mg به دست آمد.

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

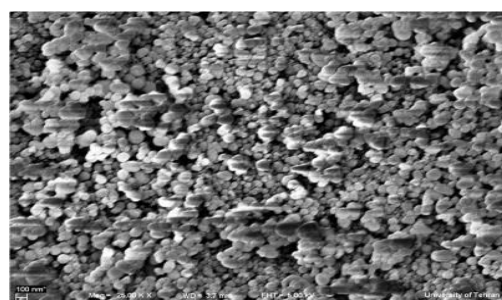
- تجزیه آلاینده ۴۰۲-دی نیتروفل توسط آنزیم تثبیت شده

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 در نظر گرفته شد. جهت تعیین کارایی آنزیم تثبیت شده بر تجزیه آلاینده ۴۰۲-دی نیتروفل، ۰/۵ گرم از سیلیکای متخلخل حاوی آنزیم لکاز تثبیت

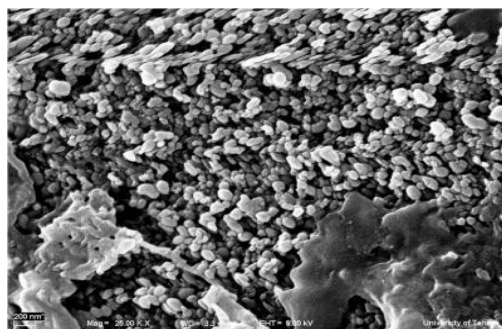
سطح دانه‌ها دارای حفرات بسیاری می‌باشد که قطر اکثر آن‌ها کم‌تر از ۱۰۰ nm است. وجود حفرات نانو روی سطح دانه‌ها، موجب افزایش سطح تماس و در نتیجه افزایش ظرفیت تثبیت آنزیم گردیده است. همان‌طور که در اطلاعات بستر خریداری شده ارائه گردیده است، مساحت سطحی دانه‌های سیلیکا برابر $42/1 \text{ m}^2/\text{g}$ می‌باشد.



الف



ب

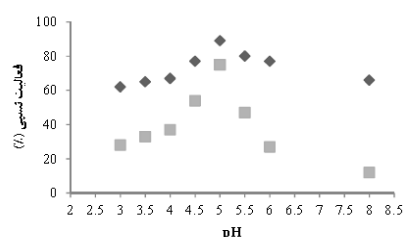


ج

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

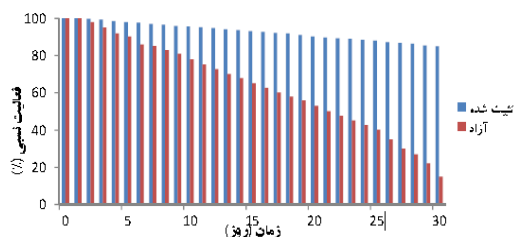
میزان فعالیت آنزیم لکاز در دو شکل آزاد و تثبیت شده در شرایط مختلف pH و دما مقایسه گردید. همان‌طور که در تصویر شماره ۲ نشان داده شده است، بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم لکاز در $\text{pH}=5$ به دست آمد. با این

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 $\text{pH}=4-6$ ، فعالیت نسبی آنزیم لکاز تثبیت شده حدود ۱۴ درصد 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 $\text{pH}=3$ به ترتیب برابر ۲۸ درصد و ۶۲ درصد و در $\text{pH}=8$ 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 0.1 M ، $\text{pH}=5$ حاوی مدیاتور ABTS با غلظت 1 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 ۴۰ درصد کاهش یافته بود.



نمودار شماره ۲: فعالیت نسبی آنزیم لکاز آزاد و تثبیت شده در مقادیر مختلف pH، $\text{ABTS}=1 \text{ mM}$ ؛ 25°C دما

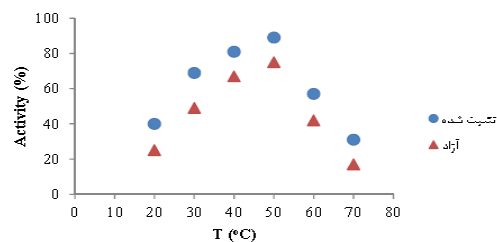
دستگاه اسپکتروفوتومتر و تغییر رنگ ناشی از مدياتور ABTS اندازه گیری شد. همان طور که در نمودار شماره ۵ نشان داده شده است، در طی دوه ۳۰ روزه آنزیم لکاز تثبیت شده روی سیلیکای متخلخل توانسته تا ۸۵ درصد فعالیت اولیه خود را حفظ نماید. در حالی که این مقدار برای آنزیم لکاز آزاد تنها ۱۵ درصد بود. بنابراین می توان نتیجه گیری 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؛ ۵۰ °C؛ دما

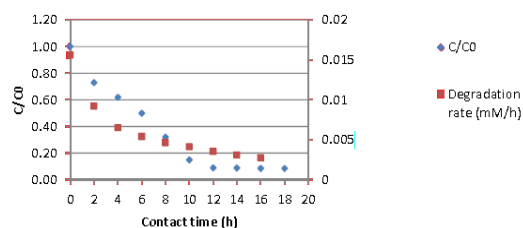
بحث

زمان تماس نقش بسیار مهمی در تجزیه آلایندہ بازی می کند. Banerjee و Bhattacharya تاثیر مثبت افزایش زمان تماس را در حذف آلایندہ ۴و۲-دی کلروفل نشان دادند (۳۵). اما با افزایش غلظت آلایندہ ۴و۲-دی نیتروفل از ۱۰ به ۳۰ میلی گرم در لیتر، سرعت تجزیه آنزیمی از ۰/۰۱۵ mM/h به ۰/۰۰۲ mM/h کاهش یافت که می تواند به دلیل غیرفعال شدن آنزیم و یا افزایش غلظت ترکیبات آلی واسط ناشی از تجزیه آلایندہ ۴و۲-دی نیتروفل و در نتیجه مصرف شدن مقداری از توان سیستم آنزیمی جهت تجزیه این ترکیبات باشد (۲۹). همان طور که در نمودار شماره ۶ نشان داده شده است، روند تجزیه آنزیمی آلایندہ ۴و۲-دی نیتروفل منطبق با روند تغییر فعالیت آنزیم لکاز در شرایط مختلف pH می باشد که این نتایج مطابق یافته های سایر مطالعات می باشد (۳۷، ۳۶). نتایج مطالعه نشان داد که عملکرد بهینه سیستم آنزیمی در تجزیه آلایندہ ۴و۲-دی نیتروفل در pH=۵ بوده که مشابه نتایج سایر مطالعات بود (۳۸، ۳۶). اما Okazaki و



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

تجزیه آنزیمی آلایندہ ۴و۲-دی نیتروفل 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 آلایندہ ۴و۲-دی نیتروفل می باشد (نمودار شماره ۴). حداکثر راندمان تجزیه آلایندہ ۴و۲-دی نیتروفل در مدت ۱۲ ساعت تماس و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد (ABTS=۱ mM، pH=۵)، به میزان ۹۱ درصد به دست آمد که غلظت باقیمانده آلایندہ 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 آلایندہ ۴و۲-دی نیتروفل کاهش معنی داری نداشت ($p < 0.05$).

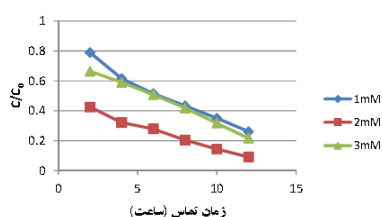


نمودار شماره ۴: غلظت باقیمانده و نرخ تجزیه آلایندہ ۴و۲-دی نیتروفل در مقادیر مختلف زمان ماند، 2,4-DNP=۱۰ ppm؛ ABTS=۱ mM؛ pH=۵؛ دما=۵۰ °C

میزان پایداری آنزیم تثبیت شده روی بستر به عنوان یکی از شاخصه های مهم سیستم های تجزیه آنزیمی می باشد. نتایج مطالعه نشان داد که آنزیم لکاز تثبیت شده روی سیلیکای متخلخل دارای قابلیت کاربرد تا ۳۰ روز را دارا می باشد. میزان فعالیت آنزیم به صورت روزانه توسط

۰/۲ به ۲ mM (غلظت آنزیم ۷ g/L، pH=۴/۵، دمای °C ۴۵)، راندمان حذف به ترتیب ۵/۸ درصد (۹۱/۴ درصد به ۸۵/۶ درصد) و ۶ درصد (۹۸ درصد به ۹۲ درصد) کاهش یافت (۴۰).

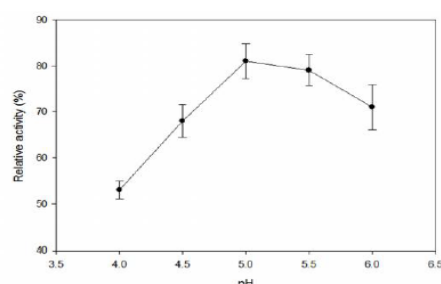
آنزیم لکاز معمولاً دارای پتانسیل ردوکس پایینی بوده (۰/۸ V - ۰/۶ V) که کاربرد آن را برای تجزیه طیف گسترده‌ای از آلاینده‌های آلی محدود می‌سازد (۴۱-۴۳). با این وجود استفاده از ترکیبات با وزن مولکولی کم که معمولاً به عنوان مدیاتور شناخته می‌شوند، می‌تواند سرعت اکسیداسیون ترکیب آلی را افزایش داده و بنابراین 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 ۴،۲-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 می‌گردد (۳۹).



نمودار شماره ۷: تاثیر غلظت مدیاتور بر تجزیه آلاینده ۴،۲-دی نیتروفنل توسط سیستم آنزیمی لکاز تثبیت شده، pH=۵، 2,4-DNP = ۱۰ ppm، دما=۵۰ °C

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

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 بیش تر 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، 2,4-DNP = ۱۰ ppm، ABTS=۱ mM، دما=۵۰ °C

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 ۴،۲-دی نیتروفنل از ۱۰ mg/L به ۳۰ mg/L موجب کاهش راندمان اکسیداسیون از ۹۱ درصد به ۵۶/۶ درصد در شرایط بهینه (pH=۵، مدیاتور=۱ mM، دما=۵۰ °C) 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 دی کلروفل و تری کلروفل توسط آنزیم لکاز تثبیت شده روی سیلیکای متخلخل تهیه شده به روش Sol-gel انجام گردید، مشخص شد که با افزایش غلظت آلاینده‌های دی کلروفل و تری کلروفل از mM

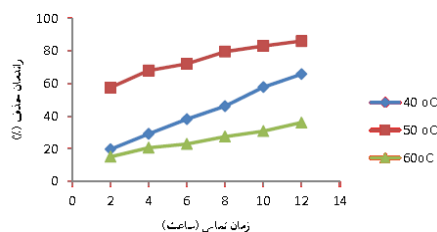
کم تر باشد، دسترسی آنزیم به سوبسترا نیز کم تر بوده و در نتیجه راندمان حذف سوبسترا کاهش می یابد. از سوی دیگر نسبت آنزیم به سوبسترا نیز حائز اهمیت می باشد. هرچه این نسبت بالاتر باشد، به معنای اکسیداسیون بیش تر سوبسترا بوده که البته در غلظت های بالای آنزیم، اکسیداسیون سوبسترا تقریباً ثابت می ماند (۳۹). در این مطالعه با توجه به این که در سیستم آنزیمی مورد استفاده جهت حذف آلاینده ۴ و ۲-دی نیتروفلنل از مدياتور ABTS به عنوان ماده واسط جهت اکسیداسیون آلاینده استفاده گردید و در نتیجه اکسیداسیون مدياتور ABTS توسط آنزیم لکاز و سپس اکسیداسیون آلاینده توسط مدياتور اکسید شده، می توان نتیجه گرفت که مدياتور به عنوان عامل اکسیدکننده آلاینده مطرح بوده و در نتیجه نسبت غلظت مدياتور به سوبسترا (آلاینده) دارای اهمیت می باشد. نتایج مطالعه نشان داد که نسبت غلظت مدياتور به سوبسترا در شرایط بهینه حذف (pH=5، غلظت مدياتور ۳ mM، غلظت آلاینده ۱۰ mg/L) برابر ۲۰:۱ به دست آمد. با افزایش غلظت آلاینده (۲۰ mg/L و ۳۰) نسبت غلظت مدياتور به سوبسترا به ترتیب به ۱۰:۱ و ۶/۷:۱ کاهش یافته و از آن جا راندمان حذف آلاینده از ۹۱ درصد به ۵۶/۶ درصد کاهش یافت. پیدایش این امر را می توان به ثابت بودن نسبت آنزیم به مدياتور و در عین حال کاهش نسبت مدياتور به سوبسترا نسبت داد. Catapane و همکاران با استفاده از آنزیم لکاز تثبیت شده روی بستر polyacrylonitrile جهت حذف آلاینده های alkylphenols از محیط آبی نشان دادند که با افزایش غلظت آلاینده از ۰/۱ mM تا ۲ mM، راندمان حذف از حدود ۱۰۰ درصد به نزدیک ۵۰ درصد کاهش می یابد که به دلیل کاهش نسبت مدياتور (ABTS) به سوبسترا از ۲۰:۱ به ۱۰:۱ بود (۴۶).

دما به عنوان یکی از متغیرهای مهم در سیستم های تجزیه آنزیمی در نظر گرفته شده و معمولاً دارای نقش دوگانه ای روی سیستم های آنزیمی می باشد. اکثر آنزیم ها در دماهای متوسط تا بالا (۶۰-۷۰ °C) و برخی نیز در

دماهای کم تر از ۱۰ °C غیرفعال می شوند. غیرفعال شدن گرمایی اغلب به دلیل تغییر شکل ساختار سه بعدی آنزیم از طریق گسسته شدن یا تخریب سایت های فعال آنزیم رخ می دهد. از طرف دیگر با افزایش دما سرعت واکنش آنزیمی بر اساس نظریه آرنیوس، افزایش می یابد (۴۷). بنابراین دما دارای دو اثر مستقل از هم بر عملکرد سیستم آنزیمی تجزیه آلاینده می باشد که شامل تغییر در سرعت واکنش (طی زمان) به دلیل غیرفعال شدن آنزیم و تغییر در سرعت واکنش می باشد (۳۹).

به طور کلی با افزایش دمای محیط تا مرز ۷۰ °C، روند غیرفعال سازی آنزیم تشدید می یابد که این امر به دلیل حساسیت مولکول های پروتئینی آنزیم نسبت به تغییرات دمایی و دناتوره شدن و تغییر شکل یافتن مولکول ها می باشد. البته لازم به ذکر است که آنزیم ها در حالت تثبیت شده نسبت به افزایش درجه حرارت مقاومت بیش تری داشته و فعالیت خود را در دماهای بالاتر حفظ می کنند. این امر به دلیل محافظت آنزیم باند شده توسط بستر تثبیت شده در برابر تغییرات دمایی می باشد (۴۸). نتایج مطالعه نشان داد که افزایش دما از ۴۰ به ۶۰ درجه سانتی گراد (با ثابت نگه داشتن سایر متغیرها)، راندمان حذف آلاینده ۴ و ۲-دی نیتروفلنل از ۹۱ درصد به ۳۳ درصد کاهش یافت. همان طور که در نمودار شماره ۸ نشان داده شده است، میزان فعالیت نسبی آنزیم لکاز تثبیت شده در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد بر خلاف آنزیم آزاد که غیرفعال شده است تا حدودی حفظ شده است که به دلیل فرآیند تثبیت آنزیم می باشد (۴۹). نتایج این مطالعه مشابه نتایج سایر مطالعات می باشد که میزان فعالیت آنزیم لکاز تثبیت شده را حتی تا دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد هم گزارش نموده اند (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 ۵۵ °C بعد از گذشت زمان ۶ ساعت به طور معنی داری تغییر

نمی‌کند در حالی که در دمای 75°C و بعد از گذشت زمان حدود ۲/۵ ساعت، آنزیم لکاز تثبیت شده تقریباً غیرفعال می‌شود (۳۴).



نمودار شماره ۸: میزان تجزیه آلاینده ۴,۲-دی نیتروفنل توسط سیستم آنزیمی لکاز تثبیت شده در شرایط مختلف دمایی، $\text{pH}=5$ ؛ $\text{ABTS}=1 \text{ mM}$ ؛ $2,4\text{-DNP}=10 \text{ ppm}$

در این مطالعه عملکرد سیستم آنزیمی لکاز تثبیت شده روی سیلیکای متفلفل جهت حذف آلاینده ۴,۲-دی نیتروفنل از محیط آبی مورد بررسی قرار

گرفت. نتایج نشان داد که سیستم آنزیمی مورد استفاده دارای کارایی بالایی در حذف آلاینده ۴,۲-دی نیتروفنل از محیط آبی را دارد. شرایط بهینه برای رسیدن به حداکثر حذف آلاینده (۹۱ درصد) شامل زمان ماند ۱۲ ساعت، دمای 50°C درجه سانتی گراد و $\text{pH}=5$ بود. مطالعه نشان داد که آنزیم تثبیت شده نسبت به تغییرات محیطی دارای مقاومت بسیار بیش‌تری در مقایسه با آنزیم آزاد می‌باشد. با ارتقای ویژگی‌های پایداری و قابلیت استفاده مجدد آنزیم لکاز تثبیت شده روی سیلیکای متفلفل می‌توان از این سیستم به عنوان یک سیستم موثر در تصفیه فاضلاب‌های صنعتی استفاده نمود.

سپاسگزاری

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

References

- Shukla S, Dorris K, Chikkaveeraiah B. Photocatalytic degradation of 2, 4-dinitrophenol. J Hazard Mater 2009; 164(1): 310-314.
- ATSDR. Toxicological Profile for Dinitrophenols. Atlanta. U.S. Department of Health and Human Services (ATSDR), 1995.
- Ahmadimoghaddam M, Mesdaghinia AR, Naddafi K, Nasser S. Degradation of 2,4-Dinitrophenol by Photo Fenton Process. Asian J Chem 2010; 22(2): 1009-1016.
- 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).
- 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).
- 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).
- 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.
- 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.
- Champagne PP, Ramsay JA. Dye decolorization and detoxification by laccase immobilized on

- 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, Jastrzemska 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

- 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.

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. Frascioni 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, Atanasov 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. Catapano 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.