

لاکاز: پیشرفت‌های اخیر و اهمیت نانوزیست‌فناوری آن

حسین صالحی زاده^{۱*}، مهدیه علیخویی^۱، محمد صالحی زاده^۲

۱- اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده فنی و مهندسی

۲- مونترال، دانشگاه کنکور دیا، گروه مهندسی شیمی

پیام نگار: Salehi633@hotmail.com

چکیده

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

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

۱- مقدمه

اسکومایسیت‌ها^۵، دترومایست‌ها^۶، بازیدیومایسیت‌ها^۷، نروسپورا کراسا^۸، فانروجات فلاویدو-آلبا^۹، ترامتس پوبسنس^{۱۰}، کرلیوس هیرسوتوس^{۱۱}، پیکنوپوروس سانگونوس^{۱۲}، پانوس تیگرینوس^{۱۳}

لاکاز توسط انواع قارچ‌ها، گیاهان و برخی باکتری‌ها تولید می‌شود [۱،۲]. باکتری‌هایی نظیر آزوسپیریلوم لیپوفر^[۳]، باسیلوس سابتیلیس^[۴]، استریتومایسس لوندولا^[۵]، مارینوموناس مدیترانه^۴ قادر به تولید لاکاز هستند. طیف وسیعی از قارچ‌ها نظیر

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

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

لاکاز و گلوکوزاکسیداز و گلیوکسال اکسیداز^۶ ساز و کار منحصر به فردی برای تخریب لیگنین وجود ندارد و بسته به نوع میکروارگانیسم متفاوت است. به‌طور مثال پلوروتوس/استراتوس^۷ متعلق به گروهی از میکروارگانیسم‌های تخریب‌کننده لیگنین است که لاکاز و پراکسیداز منگنز را تولید می‌کند، ولی لیگنین پراکسیداز^۸ تولید نمی‌کند و یا پیکنوپوروس سینابارینوس^۹ لاکاز را به‌عنوان تنها آنزیم تجزیه‌کننده لیگنین تولید می‌کند. گرچه اغلب آنزیم‌های تجزیه‌کننده لیگنین، خارج سلولی می‌باشند، تحقیقات نشان داده است که لاکازهای درون سلولی نیز در قارچ‌های پوسیده سفید وجود دارد که به‌عنوان پیش ساز برای لاکاز خارج سلولی عمل می‌کند. در این مقاله به معرفی لاکاز، ساز و کار عملکرد آن، خصوصیات ساختاری لاکاز، فرایندهای تولید و اثر عوامل مختلف بر پایداری و فعالیت آنزیم و برخی از کاربردهای آن در صنایع می‌پردازد.

۲- ساز و کار عملکرد لاکاز

لاکاز مانند یک باتری عمل می‌کند. الکترون‌های ناشی از واکنش‌های اکسایش منفرد را ذخیره می‌کند تا اکسیژن مولکولی را احیا نماید. اکسایش سوبسترا به‌وسیله لاکاز یک واکنش تک الکترونی است که یک رادیکال آزاد تولید می‌کند. به‌همین دلیل برای کاهش کامل اکسیژن مولکولی به آب، باید چهار مولکول سوبسترا اکسید شوند. در اکسایش سوبسترای خنثی، پیوند بین (کربن آلفا-کربن بتا) و پیوند بین (الکیل-آریل)^{۱۱} می‌شکند (شکل (۱-الف)).

لاکاز شبیه به دیگر آنزیم‌های اکسیدکننده فنول، لیگنین را به‌وسیله کوپل کردن رادیکال‌های فنوکسی تولید شده از اکسایش گروه‌های فنولی لیگنین بسپارش می‌کند. به‌دلیل ویژه بودن لاکاز برای زیر واحدهای فنولی در لیگنین و محدود بودن لیگنین در دسترس در دیواره فیبری، لاکاز برای فرایند سفید کردن خمیر کاغذ، نیاز به واسطه‌هایی نظیر (۲-۲) آزینوبیس ۳-اتینزیتزولین-۶-اسید سولفونیک^{۱۱} (ABTS) دارد (شکل (۱-ب)) [۸].

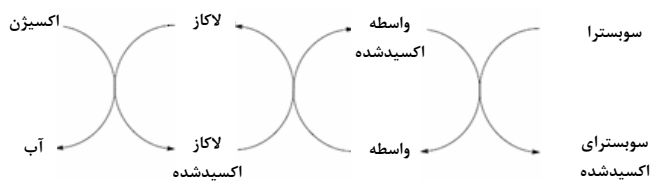
تراژتس چند رنگی دارای لاکاز هستند. همچنین امکان تهیه لاکاز از گیاهانی نظیر کلم، چغندر، شلغم، سیب، گلابی، مارچوبه، سیب زمینی و انواع سبزی‌ها وجود دارد.

گرچه واکنش‌های اکسایش شیمیایی در بسیاری از صنایع رخ می‌دهند، ولی دارای معایبی نظیر غیر ویژه بودن، واکنش‌های جانبی نامطلوب و به مخاطره انداختن محیط زیست با مصرف مواد شیمیایی خطرناک می‌باشند. اکسایش زیستی با استفاده از آنزیم‌ها به‌دلیل ویژه عمل کردن، زیست تخریب پذیر بودن آنزیم‌ها و انجام واکنش در شرایط عملیاتی ملایم، برتری دارد. در حال حاضر واکنش‌های اکسایش زیستی با استفاده از آنزیم‌ها برای طیف وسیعی از فرایندها و صنایع نظیر غذایی، نساجی، کاغذ و خمیر، تصفیه پساب، و غیره به کار می‌رود. آنزیم لاکاز در اکسایش زیستی از اکسیژن مولکولی به‌عنوان پذیرنده الکترون استفاده می‌کند و بسیار مورد توجه است. لاکاز (بنزن دیول: اکسیدو ردوکتازها ۲،۳،۱۰،۱) (EC) متعلق به خانواده اکسیدازهاست و به پروتئین‌های چند مسی آبی رنگ شهرت دارد. ویژگی‌های این پروتئین به واسطه حضور چهار اتم مس کاتالیزوری در ساختار آن است و رنگ آبی متمایل به سبز به واسطه حضور یون مس است [۶،۷]. لاکاز، واکنش اکسایش دی فنل‌ها، آمینو فنول‌ها، پلی‌فنول‌ها، پلی‌آمین‌ها، لیگنین‌ها، آریل دی آمین‌ها^۱ و غیره را کاتالیز می‌کند. قابلیت کاهندگی لاکاز برای ترکیبات غیر فنولی کافی نیست به‌همین دلیل به یک مولکول واسطه برای انتقال الکترون نیاز دارد. از واسطه‌های کاهنده نظیر (۲-۲) آزینوبیس^۲ و (N-هیدروکسی بنزوتریازول) و (۳-هیدروکسی یانتارانلیک اسید)^۴ در سامانه‌های مختلفی چون اکسایش آلایندگی‌های آلی و گسترش حسگرهای زیستی می‌توان استفاده کرد.

تاکنون بیشترین مقدار لاکاز به‌وسیله قارچ پوسیده سفید گزارش شده است. این میکروارگانیسم قادر به تبدیل همه ترکیبات لیگنین به دی اکسید کربن و آب است. بنابراین بازیدیوماست‌های پوسیده سفید^۵ بیش از سایر قارچ‌ها در تجزیه لیگنین مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. برای آنزیم‌هایی نظیر لیگنین پراکسیداز، پراکسیداز منگنز،

6. Glyoxal Oxidase
7. Pleurotus Ostreatus
8. Lignin Peroxidase
9. Pycnoporus Cinnabarinus
10. Aryl-Alkyl Cleavage
11. 2,2'-Azino-Bis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid)

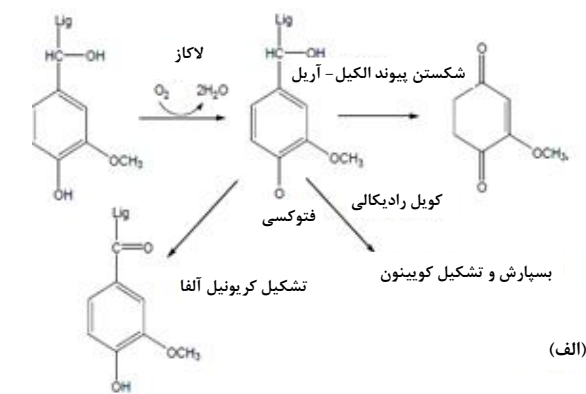
1. Aryl Diamines
2. 2,2'-Azinobis (3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) (ABTS)
3. N-Hydroxybenzotriazole (HBT)
4. 3-Hydroxyanthranilic Acid
5. White-rot Fungi



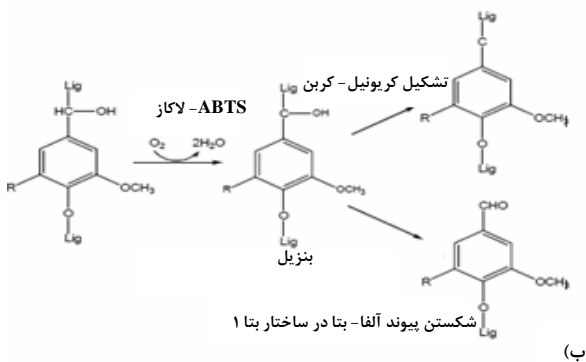
شکل ۲- چرخه کاتالیزگری یک سامانه اکسایش لاکاز همراه با مولکول واسطه [۱۲]

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

HBT متعلق به ترکیبات نیتروژن چند حلقه ای هستند که دارای گروه‌های واسطه‌ای (N-OH) می‌باشد. آنزیم با مصرف اکسیژن، HBT را به یک واسطه فعال تبدیل می‌کند. در یک تحقیق مروری توان کاهش HBT در حدود ۱/۱-۱/۲۲ تخمین زده شده است [۱۶]. سامانه (لاکاز- واسطه)، کاربردهای زیادی در رنگبری و یا سفید کردن در صنعت نساجی [۱۴]، تخریب هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای، تخریب علف کش‌ها و حشره کش‌ها و سنتز مواد آلی دارد. استفاده از مواد واسطه قبلی (ABTS و HBT) مشکلاتی نظیر سمی بودن و گران بودن و غیر فعال شدن لاکاز در غلظت‌های حدود ۱ میلی مولار از این مولکول‌ها می‌باشد، که با استفاده از مولکول‌های واسطه طبیعی چون (p-کوماریک اسید)^۱، (۴-هیدروکسی بنزوتیک اسید)^۲، سیرین گالددید^۳ و غیره می‌توان بر این مشکلات فائق آمد [۱۴].



(الف)



(ب)

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

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

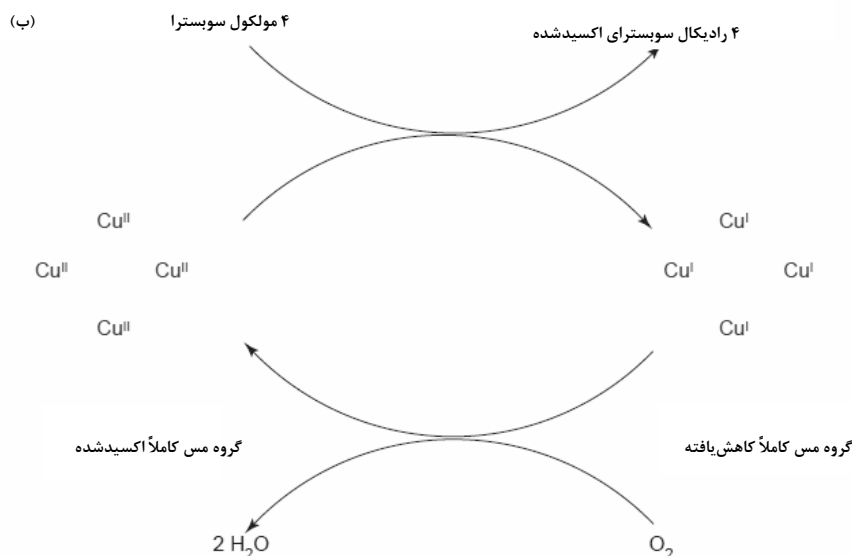
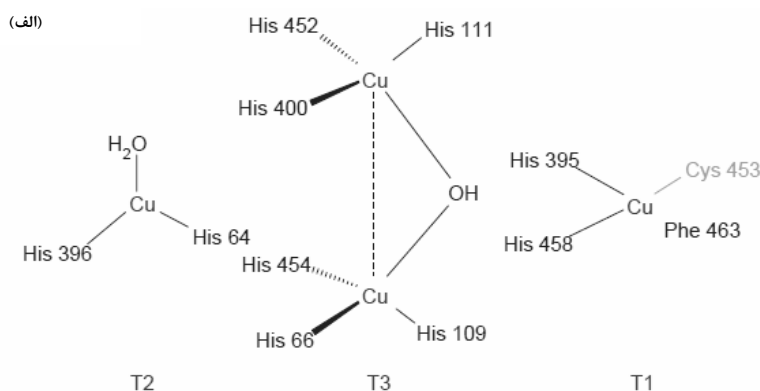
همانطور که در بالا توضیح داده شد در برخی موارد لاکاز قادر نیست تمام بخش‌های یک ترکیب لیگنینی را اکسید کند که در این صورت باید از یک مولکول واسطه مناسب استفاده کرد. یک مولکول واسطه به عنوان یک حامل الکترون عمل می‌کند، وقتی که به وسیله آنزیم اکسید شد یک واسطه اکسیدکننده قوی تولید می‌کند که این ماده از فضای آنزیمی خارج می‌شود و سوبسترای را اکسید می‌کند. این سوبسترا به دلیل اندازه بزرگش نمی‌تواند وارد جایگاه فعال آنزیم شود. چون آنزیم و بسیار به صورت مستقیم برهمکنش نمی‌دهند فقط با استفاده از واسطه‌ها، امکان اکسایش بسیاری وجود دارد (شکل (۲)) [۱۲].

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

۳- خصوصیات ساختاری آنزیم لاکاز

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

نسبت به آنزیم لاکاز کد می‌شوند. تعداد ایزوزیم‌های موجود بسته به نوع گونه و اینکه القاکننده و یا غیر القایی باشد، فرق می‌کند. ساختار جایگاه فعال آنزیم لاکاز و سیکل کاتالیزوری آن در شکل (۳) آورده شده است. مس نوع ۱ (T1) به پروتئین رنگ آبی می‌دهد و جایگاهی است که اکسایش سوپسترا رخ می‌دهد. مس‌های نوع ۲ (T2) و نوع ۳ (T3) یک گروه سه هسته‌ای تشکیل می‌دهند که کاهش اکسیژن مولکولی و رهاسازی آب رخ می‌دهد. (ب) نمایی از جایگزینی یک سیکل کاتالیزوری لاکاز که دو مولکول آب از کاهش و یک مولکول اکسیژن مولکولی به‌دست می‌دهد و همزمان، اکسایش چهار مولکول سوپسترا به رادیکال‌های آزاد مربوطه نیز صورت می‌گیرد [۱۸].



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

۳-۱ ویژه بودن سوپسترای لاکاز

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

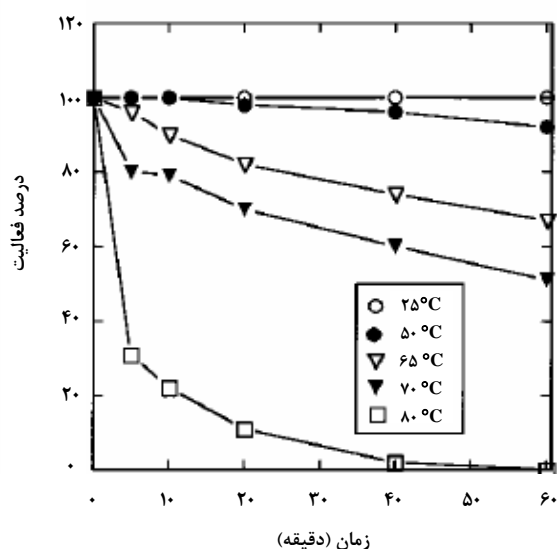
۳-۲ تأثیر pH روی پایداری و فعالیت لاکاز

برای لاکازها pH بهینه به شدت به سوپسترا وابسته است. به طور مثال وقتی که ABTS را به عنوان سوپسترا استفاده می‌کند، pH محیط اسیدی و در دامنه ۳-۵ است. در این حالت pH بهینه در حدود ۴ است. این تغییرات ممکن است ناشی از تغییرات در واکنش باشد که به دلیل آنزیم، اکسیژن یا سوپسترا است. اختلاف در توان احیا بین سوپسترای فنولی و مس در جایگاه T1 می‌تواند اکسایش سوپسترا در pH بالا را افزایش دهد، ولی آنیون هیدروکسید (OH^-) به اتم‌های مس موجود در جایگاه (T2/T3) متصل می‌شود که این اتصال به دلیل بازدارندگی فعالیت لاکاز ناشی از وقفه بین انتقال الکترون داخلی بین مراکز T1 و (T2/T3) می‌باشد. این دو اثر مخالف، نقش مهمی را در تعیین pH بهینه آنزیم‌های لاکاز بازی می‌کند. به طور مثال لاکاز تولید شده توسط *ترامتس مودستا*^۱ در pH=۴ به طور کامل فعال، و در pH=۴/۵ بسیار پایدار می‌باشد ولی نیمه عمر آن به ۱۲۵ دقیقه در pH=۳ کاهش می‌یابد [۱۹].

۳-۳ تأثیر دما بر پایداری و فعالیت لاکاز

دمای بهینه لاکاز از یک گونه به گونه دیگر بسیار متغیر است به طور مثال لاکاز به دست آمده از قارچ *پیکنوپوروس سینابارینوس*^۲ در دماهای کمتر از ۵۰ °C بسیار پایدار است ((۲۴ (u/ml)). در ۷۰ °C نیمه عمر آنزیم فوق ۶۰ دقیقه است، در حالی که در ۸۰ °C آنزیم به طور کامل غیر فعال می‌شود. مشخص شده است که گرماگذاری

آنزیم مذکور قبل از استفاده در ۴۰-۵۰ °C، فعالیت لاکاز را افزایش می‌دهد (شکل (۴)) [۲۰]. روش دیگر که به منظور افزایش پایداری لاکاز استفاده می‌شود، تثبیت آنزیم روی آلومین است که در مواردی که پایداری حرارتی آنزیم اهمیت دارد، نظیر کاربردهای خاص زیست فناوری، می‌توان از روش فوق استفاده کرد [۲۱].



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

۴-۳ تأثیر بازدارنده‌ها بر فعالیت لاکاز

نحوه عملکرد لاکازها در مقابل بازدارنده‌ها در بیشتر موارد مشابه است [۲۲]. بسیاری از یون‌ها نظیر هالیدها، سیانیدها، تیوسیانیدها، فلئوئوریدها و هیدروکسیدها به مس نوع ۳ و ۲ متصل می‌شوند که این اتصال سبب وقفه انتقال الکترون داخلی و باعث بازدارندگی فعالیت آنزیم می‌شود. دیگر بازدارنده‌ها شامل یون‌های فلزی (به طور مثال Hg^{+2})، اسیدهای چرب، عوامل سولفیدریل، هیدروکسی گلیسین و اسید کوچیک^۳ و غیره هستند. برخی ترکیبات باعث شلاته شدن اتم مس می‌شوند. لاکازها به مواد شلاته کننده نظیر EDTA، دی‌متیل گلی کسیم^۴، (N,N' -دی متیل دی تیوکاربامات) و NTA حساسیت بالایی دارند و فعالیت کاتالیزوری آنها کاهش می‌یابد.

3. Kojic Acid
4. Dimethyl Glyoxime
5. N, N'-Dimethyldithiocarbamate

1. Trametes Modesta
2. Pycnoporus Cinnabarinus

۴- تولید لاکاز و فرایندهای آن

داشت و فعالیت لاکاز را تا ۹ برابر افزایش می‌دهد، ولی در غلظت‌های بالاتر به دلیل سمی بودن اثر عکس دارد. غلظت بیش از اندازه گلوکوز به‌عنوان منبع کربنی در محیط کشت، اثر بازدارندگی روی تولید لاکاز قارچی خواهد داشت، زیرا افزایش در مقدار گلوکوز محیط کشت باعث یک تأخیر در تولید لاکاز می‌شود. روش ساده و مؤثر برای غلبه بر این مشکل استفاده از سلولوز به‌عنوان منبع کربن در محیط کشت می‌باشد [۱۱]. جدول (۱) فهرستی از میکروارگانیسم‌های تولیدکننده لاکاز و شرایط تولید آن را نمایش می‌دهد.

آنزیم لاکاز اغلب توسط قارچ‌ها به‌صورت برون سلولی در محیط کشت تراوش می‌شود. تولید لاکاز به شدت به شرایط محیط کشت قارچی وابسته است. اغلب در حالت عادی، قارچ‌ها لاکاز را در غلظت پایین تولید می‌کنند ولی با افزودن مکمل‌های مختلف به محیط می‌توان به غلظت بالاتری دست یافت. به‌طور مثال اضافه کردن ترکیبات آروماتیک مانند ۵،۲ زایلیدین و لیگنین باعث افزایش فعالیت لاکاز می‌شود، که ۵،۲ زایلیدین به‌عنوان القاکننده بیشترین تأثیر را دارد. اضافه کردن ۱۰ میلی مولار از این ماده بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری بیشترین القاکنندگی را روی فعالیت لاکاز خواهد

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

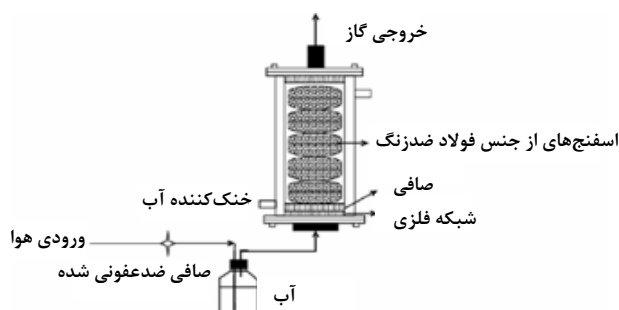
نوع قارچ	نوع راکتور	نوع کشت	القاکننده	بیشینه فعالیت آنزیم (U/L)
نروسپورا کراسا ^۱	غشایی مؤئینه ای	کشت غوطه ور، تثبیت شده روی تکیه گاه	۱ میکرو مولار سیکلوهگزان	۱۰۰۰۰
ترامتس پوبسنس ^۲	همزن دار ۲۰ لیتری	کشت غوطه ور، سلول‌های آزاد خوراک دهی نیمه پیوسته	۲ میلی مولار Cu ²⁺	۷۴۰۰۰
کریلوس هیرسوتوس ^۳	جار تخمیرکننده ۱۰ لیتری	کشت غوطه ور، سلول‌های آزاد	۰/۲۵ گرم بر لیتر Cu ²⁺	۸۳۸۳۰
پیکنوپروس سانگونوس ^۴	بیو استات ۱۵ لیتری	کشت غوطه ور، سلول‌های آزاد	۱۶ میلی مولار وراتریل الکل	۸۱۳۱
پانوس تیگرینوس ^۵	همزن دار ۳ لیتری	کشت غوطه ور، سلول‌های آزاد	پساب کارخانه زیتون	۴۶۰۰
ترامتس چند رنگی ^۶	بستر ضربانی ۰/۵ لیتری	کشت غوطه ور (دانه ای)	-	۱۶۰۰۰
پلوروتوس استراتوس ^۷	خوراک جامد	فرایند لایه ریزان	نیشکر	۳۵۰۰
پیکنوپروس سینابارینوس ^۸	راکتور زیستی فاز بخار	حالت جامد	بخار اتانول	۱۰۰۰۰
پلوروتوس استراتوس ^۹	راکتور حلقوی هوا بالابر ۵ لیتری	کشت غوطه ور دانه‌ای	پساب کارخانه زیتون	۱۲۰۰
فونالیا تروجی ^{۱۱}	همزن دار ۲ لیتری	تثبیت شده روی دانه‌های سدیم-آلژینات	-	۱۰۰۰
ترامتس هیرسوتا ^{۱۲}	راکتور حلقوی هوا بالابر	کشت غوطه ور	گلیسرین، Cu ²⁺	۱۹۴۰۰

1. *Neurospora crassa*
5. *Panus tigrinus*
9. *Pleurotus ostreatus*

2. *Trametes pubescens*
6. *Trametes versicolor*
10. Air Lift

3. *Coriolushirsutus*
7. *Pleurotus ostreatus*
11. *Funalia trogii*

4. *Pycnoporus sanguineus*
8. *Pycnoporus cinnabarinus*
12. *Trametes hirsute*



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

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

۴-۲ فرایند تخمیر حالت جامد

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

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

۴-۱ فرایند تخمیر غوطه ور^۱

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

1. Submerged Fermentation

۴-۳ فرایند فیلم چکنده^۲

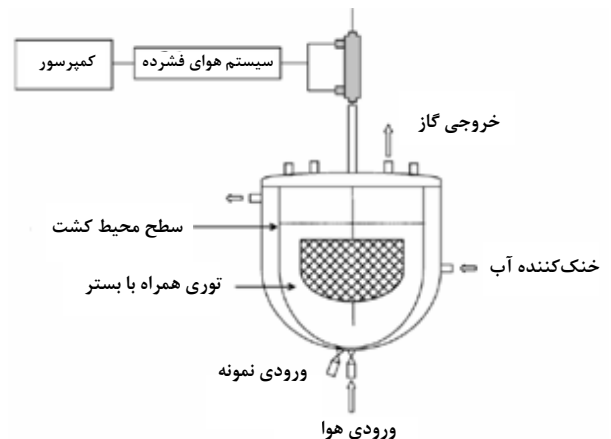
چنین فرایندی بیشتر برای تصفیه پساب به کار می‌رود و قابلیت بالایی برای تولید آنزیم‌های قارچی برون سلولی دارد. در این روش یک سیال به‌صورت پیوسته یا متناوب از روی بستر جامد ثابتی که با میکروارگانیسم‌ها پوشیده شده، عبور می‌کند و به این طریق خوراک تحت اختیار میکروارگانیسم‌ها قرار می‌گیرد. این فرایند امکان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

۵- کاربردهای آنزیم لاکاز

۵-۱ صنایع غذایی

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

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



شکل ۶- راکتور زیستی غوطه‌ور توسعه‌یافته ریولا و همکاران^۱ برای تولید لاکاز [۲۸]

2. Trickle-Film Processing

1. Rivela

می‌دهد. از این طریق می‌توان مواد فیبری با خواص جدید از نظر خصوصیت سطحی نظیر آب‌گریزی، آب‌دوستی و یا بار به‌دست آورد [۳۲].

۵-۳ صنایع نساجی

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

۵-۴ کاربرد در نانوزیست فناوری

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

ترامتس هیرسوتا^۱ مقاومت خمیر را بالا برده و افزایش حجم آن را کاهش می‌دهد. از دیگر کاربردهای لاکاز در صنایع غذایی می‌توان به زیست پالایش، فرآیندهای مربوط به آشامیدنی‌ها، تعیین میزان اسید اسکوربیک و حسگرهای زیستی اشاره کرد [۳۱].

۵-۲ صنعت کاغذ

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

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

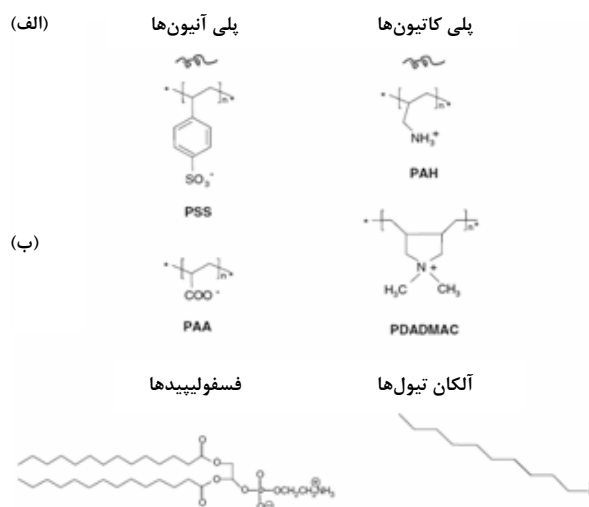
1. Trametes Hirsuta

متفاوتی را نشان می‌دهد که از بسپارها و تک لایه‌های خودآرا^۲ تشکیل شده‌اند و به منظور جذب و تثبیت پروتئین‌ها یا دیگر مولکول‌های زیستی به کار می‌روند [۲۲،۳۳،۳۴]. روش خودآرایی لایه به لایه^۳ را می‌توان برای ساخت ساختارهای ماکرومولکولی تا نانومتری به کار برد و از این طریق می‌توان به سطوحی با ضخامت به‌طور کامل تعریف شده، دست یافت (شکل (۸)-(الف)). همچنین این فناوری برای ساخت کپسول‌های پلی‌الکترولیتی توخالی کاربرد دارد. اغلب برای کپسوله کردن آنزیم، از جذب متوالی پلی‌الکترولیت‌های باردار با بار مخالف روی الگوهای کریستالی آنزیم استفاده می‌شود [۳۳]. مشخص شده است که کپسوله کردن آنزیم بعد از ۱۰ ساعت گرماگذاری همراه با پروتاز، باعث حفظ صد در صدی فعالیت آن می‌شود. خواص نفوذپذیری کپسول برای عملکرد صحیح آنزیم‌های کپسوله شده، بسیار مهم است. این خواص را می‌توان به‌صورت تابعی از pH و غلظت نمک در نظر گرفت. در pHهای ۸ و بالاتر دیواره کپسول بسته می‌شود، ولی در pHهای کمتر از ۶، ماکرومولکول‌ها به درون کپسول نفوذ می‌کنند. در واقع دیواره کپسول به‌صورت برگشت‌پذیر باز و بسته می‌شود. برای گسترش میکرو راکتورها از این روش همراه با فن لایه به لایه استفاده می‌شود. همچنین از ذرات کلئیدی پوشیده شده با پلی‌الکترولیت‌ها و فسفولیپیدها به منظور فعال کردن ویروس سرخجه استفاده می‌شود. چنین سامانه‌ای در شکل (۸)-(ب)) آورده شده است [۳۳].

۵-۵ سایر کاربردها

هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای^۴ (PAHs) همراه با دیگر مواد مقاوم زیست تخریب‌ناپذیر^۵ منبع اصلی آلودگی خاک هستند. بنابراین از بین بردن آنها از اهمیت زیادی برخوردار است. به علاوه، هیدروکربن‌های ناشی از پسماندهای نفتی و مصرف سوخت‌های فسیلی را می‌توان با استفاده از لاکازها تخریب کرد. در سال‌های اخیر، از یک نوع لاکاز خاص، در تثبیت محصولات حاصل از تخریب (۲،۴،۶ تری نیتروتولون)^۶ استفاده شده است [۳۳].

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



شکل ۷- (الف) پلی‌الکترولیت‌ها که برای ساخت چند لایه‌ها به‌دلیل عملکردهای مختلف شان استفاده می‌شوند. PSS: پلی(استایرن سولفونات)، PAA: پلی(آکریلیک اسید)، PAH: پلی (آلیل آمین هیدروکلرید) و PDADMC: پلی (دی آلیل دی متیل آمونیوم کلراید). (ب) فسفولیپید و آلکان تیول‌ها که دارای توانایی ساخت لایه‌های زیستی و تک لایه‌های خود آرا هستند [۳۳].

فرایند فوق یک روش سودمند برای تثبیت لاکاز بر روی یک سطح جامد به منظور گسترش حسگرهای زیستی چند عملکردی است. همچنین کریستال‌های آنزیمی متقاطع^۱ لاکاز که از میکروارگانیسم تراپتس چند رنگی به‌دست می‌آیند، نسبت به آنزیم‌های محلول، مزایا و کاربردهای بیشتری در حسگرهای زیستی دارند [۳۵]. علاوه بر حسگرهای زیستی، لاکاز را می‌توان روی کاتد سلول‌ها با سوخت زیستی تثبیت کرد که از این طریق انرژی تولید می‌شود. به‌طور مثال برای سامانه‌های فرستنده کوچک، نظیر سلول‌های سوختی که بازدهی تبدیل انرژی بالایی دارند و در مقایسه با منابع انرژی موجود دیگر، آلودگی کمتری دارند، منبع انرژی مفیدی به ویژه در مقیاس میکرونی هستند. شکل (۸)-(الف))، سطوح تخت با عملکردهای

1. Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC)

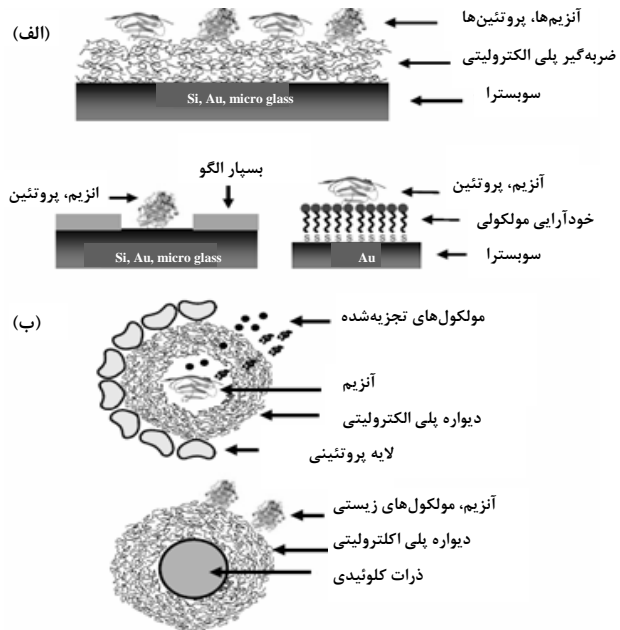
2. Self-Assembled Monolayers (SAMs)
3. Layer-by-Layer Technique (LbL)
4. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)
5. Xenobiotics
6. 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT)

۶- نتیجه گیری

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

مراجع

- [1] Rodriguz Couto S., Toca-Herrera J.L., "Laccase production at reactor scale by filamentous fungi", *Biotechnology Advances*, 25, 558-569, (2007).
- [2] Kiiskinen L.L., Palonen H., Linder M., Viikari L., Kruus K., "Characterization and heterologous production of a novel laccase from *Melanocarpus albomyces*", *FEBS Letters* 576, 251-255, (2004).
- [3] Diamantidis G., Effosse A., Potier P., Bally R., "Purification and characterization of first bacterial laccase in the rhizospheric bacterium *Azospirillum lipoferum*", *Soil Biology and Biochemistry*, 342, 919-927, (2000).
- [4] Martins L.O., Soares C.M., Pereira M.M., Teixeira M., Costa T., Jones G.H., Henriques A.O., "Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat", *J. Biological Chemistry*, 277, 18849-18859, (2002).



شکل ۸- (الف) ساختارهای فوق مولکولی دو بعدی که برای تثبیت مولکول های زیستی به کار می روند: پلی الکترولیت های چند لایه و تک لایه های خود آرایی شونده ریز الکو (SAMS). (ب) ساختارهای فوق مولکولی سه بعدی که از آنها برای ساخت میکروراکتورها و تثبیت مولکول های زیستی استفاده می شوند [۳۳].

در سال های اخیر بیشتر تحقیقات روی کاربرد لاکاز به عنوان یک کاتالیزگر زیستی جدید در سنتز مواد آلی متمرکز شده است. با استفاده از لاکاز، فرایند تولید بسیار در هوا بدون استفاده از هیدروکسید هیدروژن انجام می شود. لاکاز می تواند بسپارش رادیکالی آکریل آمید را بدون حضور واسطه و یا با واسطه تحریک کند. همچنین لاکاز، برای بسپارش ترکیبات فنولی و آمینوی مختلف به کار می رود. به طور کلی لاکاز را برای سنتز ترکیبات آلی با عملکرد مختلف نظیر تولید بسپارهایی با خواص نوری، الکتریکی، مکانیکی خاص، صنایع رنگ، محصولات آرایشی و حشره کش ها و علف کش ها به کار می برند [۳۳]. بسیاری از محصولات تولید شده توسط لاکازها ضد میکروب و ضد مسمومیت هستند. همچنین لاکاز در سنتز ترکیبات پیچیده پزشکی مانند داروی بیهوشی، آنتی بیوتیک ها و مسکن ها به کار می رود. یکی دیگر از کاربردهای لاکاز در تولید در محل ید^۱ به عنوان یک داروی ضد عفونی کننده می باشد [۳۰].

1. Iodine

- [5] Suzuki T., Endo K., Ito M., Tsujibo H., Miyamoto J., Inamori Y., "A thermostable laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: purification, characterization, nucleotide sequence, and expression", *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 67, 2167, (2003).
- [6] Thurston C.F., "Molecular analysis of a laccase gene from the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*", *Microbiology*, 140, 19-26, (1994).
- [7] Alcalde M., "Laccases: biological functions, molecular structure and industrial applications. In: *Industrial Enzymes*", Edited by J. Polaina, A.P. MacCabe, Springer Press, Heidelberg, pp.461-476, (2007).
- [8] Bourbonnais R., Paice M.G., "Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator", *Tappi J.*, 79, 199, (1996).
- [9] Kersten P.J., Kalyanaraman B., Hammel K.E., Reinhammar B., Kirk Y.K., "Comparison of lignin peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes", *Biochemical J.*, 268, 475, (1990).
- [10] Evans C.S., Hedger J.N., "Degradation of plant cell wall polymers, fungi in bioremediation", *British Mycological Society. Cambridge Univ. Press., UK*, (2001).
- [11] Eggert C., Temp U., Erikson K.E.L., "The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnopotus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase", *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1151, (1996).
- [12] Banci L., Ciofi-Baffoni S., Tien M., "Lignin and Mn peroxidase-catalyzed oxidation of phenolic lignin oligomers", *Biochemistry*, 38, 3205, (1999).
- [13] Hildén L., Johansson G., Pettersson G., Li J., Ljungquist P., Henriksson G., "Do the extracellular enzyme cellobiose dehydrogenase and manganese peroxidase form a pathway in lignin biodegradation?", *FEBS letters*, 477, 79-83, (2000).
- [14] Camarero S., Ibarra D., Martinez M.J., Martinez A.T., "Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes", *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1775, (2005).
- [15] Scott S.L., Chen W.J., Bakac A., Espenson J.H., "Spectroscopic parameters, electrodes potentials, acid ionization constants, and electron exchange rate of the 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) radicals and ions", *J. Physical Chemistry*, 97, 6710, (1993).
- [16] Call H.P., Mucke I., "History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems", *J. Biotechnology*, 53, 163, (1997).
- [17] Li K., Xu F., Erikssen K. E. L., "Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound", *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2654, (1999).
- [18] Rivo S., "Laccases: blue enzymes for green chemistry", *Trends in Biotechnology*, 24, 2-8, (2006).
- [19] Nyanhongo G.S., Gomes J., Gubitz G., Zvauya R., Read J.S., Steiner W., "Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*", *Bioresource Technology*, 84, 259, (2002).
- [20] Chefetz B., Chien Y., Hadar, T., "Purification and characterization of laccase from *Chaetomium thermophilum* and its role in humification", *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3177, (1998).
- [21] M.Mayer A., C.Staples R., "Laccase: new functions for an old enzyme", *Phytochemistry*, 60, 551-565, (2002).
- [22] Bollag J.M., Leonowicz A., "Comparative studies of extracellular fungal laccases", *Applied Environmental Microbiology*, 48, 849, (1984).
- [23] Couto S.R., Toca-Herrera J.L., "Laccase production at reactor scale by filamentous fungi", *Biotechnology Advances*, 25, 558-569, (2007).
- [24] Blánquez P., Casas N., Font X., Gabarrell M., Sarrá M., Caminal G., "Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*", *Water Research* 38, 2166-72, (2005).
- [25] Caunt P., Impoolsup A., Greenfield P.F., "Stability of recombinant plasmids in yeast", *J. Biotechnology*, 8, 173-192, (1988).
- [26] Rodriguez C.S., Sanroman MA., Hofer D., Gubitz GM., "A novel carrier for the immobilization of the white-rot fungus *trametes hirsute* for decolourisation of textile dyes", *Bioresource Technology*, 95, 67-72, (2004).
- [27] Galhaup C., Wagner H., Hinterstoiaer B., Haltrich D., "Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens* enzyme", *Microbiology Technology*, 30, 520-536, (2002).
- [28] Rodriguz C.S., Moldes D., Liebanas A., Sanroman A., "Investigation of several bioreactor configurations for laccase production by *Trametes versicolor* operating in solid-state conditions", *Biochemistry Engineering J.*, 15, 21-26, (2003).
- [29] Lenz J., Holker U., "Trickle-film processing: an alternative for producing fungal enzymes", *Biofourm Europe*, 6, 55-57, (2004).
- [30] Kunamneni A., Plou F., Ballesteros A., Alcalde M., "Laccase and their applications: a patent review", *Recent patents on biotechnology*, 2, 10-24, (2008).
- [31] Minussi R.C., Pastore G.M., Durin N., "Potential applications of laccase in the food industry", *Trends Food Science Technology*, 13, 205-216, (2002).

- [32] Lund M., Ragauskas A.J., "Enzymatic modification of Kraft lignin through oxidative coupling with water-soluble phenols", *Applied Microbiology Biotechnology*, 55, 699-703, (2001).
- [33] Couto S.R., Touca-Herrera J.L., "Industrial and biotechnological applications of laccases", *Biotechnology Advances*, 4, 500-513, (2006).
- [34] Hammond P.T., Whitesides G.M., "Formation of polymer microstructures by selective deposition of polyion multilayers using patterned self-assembled monolayers as a template", *Macromolecules*, 28, 7569-7571, (1995).
- [35] Gupta G., Rajendran V., Atanassov P., "Laccase biosensor on monolayer-modified gold electrode", *Electroanalysis*, 15, 2-4, (2003).
- [36] Chhaya U., Gupte A., "Optimization of media components for laccase production by litter dwelling fungal isolate *Fusarium incarnatum* LD-3", *J. Basic Microbiology*, 50, 43-51, (2010).