



## Evaluation of activity and stability of laccase produced by native *Aspergillus* strain isolated from olive oil waste

Fatemeh Kheirollahi<sup>1</sup>, Masoumeh Anvari<sup>2</sup>, mahdi Shahriarinour<sup>2</sup>, shahab Shariati<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Ph.D Student, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

<sup>2</sup> Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran. <sup>3</sup> Department of Chemistry, School of Basic Sciences, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.

### Abstract

**Background & Objectives:** Laccases are enzymes that belong to the group of oxidases that have different applications in various industries. The aim of this study was to evaluate the activity and stability of the laccase enzyme produced by a native *Aspergillus* spp. isolated from olive oil waste. High inducer phenolic compounds content of these wastes is main reason of their selection as substrate.

**Materials & Methods:** In this study, 12 different fungal strains were isolated from olive oil wastes and the best strains with the highest enzyme activity was selected as the best strain and was identified based on phenotypic and genotypic characterization. Enzyme purification was performed using dialysis and zymographic analysis methods. Finally, the effect of various physic-chemical factors such as incubation time (6-216 h), temperature (20-40 °C) and pH (5, 6, 7 and 8) on the enzyme stability and activity was evaluated.

**Results:** The results showed that the best productive strain belongs to the genus *Aspergillus* spp. The highest enzyme activity was observed at 30 °C (1.57 IU/ml), pH = 6 (1.86 IU/ml) and after 6 days (1.53 IU/ml). Stability studies showed that the enzyme activity was stable for 6 minutes at 30-35 °C and pH = 6-7 and about 90% of the enzyme activity was maintained under the above conditions.

**Conclusion:** The laccase enzyme with significant activity and stability produced by a native strain of *Aspergillus* spp. isolated from olive oil waste due to its high activity and stability can be an acceptable candidate for industrial use.

**Keywords:** Lacasse, enzymatic activity, *Aspergillus* spp, olive oil waste.

Received: 28 February 2021

Revised: 19 May 2021

Accepted: 16 August 2021

Correspondence to: Masoumeh Anvari

Tel: +98 9112323482

E-mail: [anvari@iaurasht.ac.ir](mailto:anvari@iaurasht.ac.ir)

Journal of Microbial World 2021, 14(2): 6-19

DOI: 10.30495/jmw.2021.690453



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



## ارزیابی فعالیت و پایداری آنزیم لاکاز تولید شده توسط یک سویه بومی اسپرژیلوس جداشده از ضایعات روغن کشی زیتون

فاطمه خیراللهی<sup>۱</sup>، معصومه انوری<sup>۲\*</sup>، مهدی شهریاری نور<sup>۲</sup>، شهاب شریعتی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکترا، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران. <sup>۲</sup> گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران. <sup>۳</sup> گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

### چکیده

**سابقه و هدف:** لاکازها آنزیم‌هایی متعلق به گروه اکسیدازها هستند که کاربردهای متنوعی در صنایع مختلف دارند. هدف از این مطالعه، ارزیابی فعالیت و پایداری آنزیم لاکاز تولید شده توسط گونه‌ای از جنس اسپرژیلوس بومی جداشده از ضایعات روغن کشی زیتون می‌باشد. علت اهمیت انتخاب این ضایعات به عنوان ماده اولیه برخورداری ترکیبات فنلی القاء کننده تولید آنزیم لاکاز می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه، ۱۲ سویه مختلف قارچی از ضایعات روغن کشی زیتون جداسازی و سویه برخوردار از بیشترین فعالیت آنزیمی بعنوان بهترین سویه انتخاب بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی شناسایی گردید. تخلیص آنزیم با استفاده از روش‌های دیالیز و آنالیز زایموگرافی انجام شد. در نهایت اثر عوامل مختلف فیزیوشیمیایی مانند زمان گرمخانه‌گذاری (۶ تا ۲۱۶ ساعت)، درجه حرارت (۲۰ تا ۴۰ درجه سلسیوس) و pH (۵، ۶، ۷ و ۸) بر پایداری و فعالیت آنزیم مورد ارزیابی قرار گرفت. **یافته‌ها:** یافته‌ها نشان داد که بهترین سویه مولد به جنس اسپرژیلوس تعلق دارد. بیشترین فعالیت آنزیمی در دمای ۳۰ درجه سلسیوس (1.57 IU/ml) و pH=6 (1.86 IU/ml) و پس از طی مدت زمان ۶ روز (1.53 IU/ml) مشاهده شد. مطالعات پایداری نشان داد فعالیت آنزیمی در دمای ۳۰-۳۵ درجه سلسیوس و pH=6-7 به مدت ۶ دقیقه پایدار بوده و حدود ۹۰ درصد از فعالیت آنزیم تحت شرایط فوق حفظ می‌گردد.

**نتیجه‌گیری:** آنزیم لاکاز با فعالیت و پایداری قابل ملاحظه تولیدی توسط سویه بومی از جنس اسپرژیلوس جدا شده از ضایعات روغن کشی زیتون بدلیل فعالیت و پایداری بالا می‌تواند کاندید قابل قبولی برای مصارف صنعتی باشد. **واژگان کلیدی:** لاکاز، فعالیت آنزیمی، اسپرژیلوس، ضایعات روغن کشی زیتون.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۵/۲۵

ویرایش مقاله: ۱۴۰۰/۲/۲۹

دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۱۲/۱۰

### مقدمه

ترکیبات آروماتیک و غیر آروماتیک استفاده می‌کند (۱). این آنزیم فرایند اکسیداسیون بسیاری از سوبستراهای آلی از جمله مونو، دی، پلی و آمینو فنول‌ها، اسیدهای کربوکسیلیک و نیز سوبستراهای غیرفنولی و غیر آلی را تسریع کرده و برخلاف دیگر آنزیم‌های اکسیدکننده که نیاز به افزودنی‌هایی برای ادامه

آنزیم لاکاز یا (EC 1.10.3.2) از جمله آنزیم‌های اکتیووردوکتاز حاوی مس است که اکسیژن مولکولی را برای اکسید کردن

\* آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران.  
تلفن: ۰۹۱۱۲۳۳۴۸۲  
پست الکترونیک: [anvari@iaurasht.ac.ir](mailto:anvari@iaurasht.ac.ir)



کلرید کلسیم، سولفات آهن، سولفات منگنز، سولفات مس، سولفات روی از شرکت Merck (آلمان)، ABTS و گایاکل، کیسه دیالیز، ژل سفادکس، بافرهای لازم جهت الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید از شرکت HiMedia (هند) تهیه شدند.

*الف) غربالگری قارچ‌های مولد آنزیم:* بدین منظور از پساب کارخانجات روغن کشی زیتون شهرستان رودبار، در شرایط آسپتیک چند نمونه مختلف تهیه و نمونه‌ها به محیط کشت مایع PDB منتقل و به مدت ۷ روز تحت شیکر (120 rpm) در دمای محیط قرار گرفته و پس از آن از به محیط PDA انتقال و تک کلنی قارچ‌های رشته‌ای بطور جداگانه خالص سازی گردیدند (۷). جهت جلوگیری از رشد باکتری‌ها، آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل ۰/۰۱٪ به محیط کشت اضافه گردید. تولید آنزیم توسط هر یک از جدایه‌ها بطور مستقل مورد بررسی قرار گرفت.

بمنظور غربالگری سویه‌های تولید کننده لاکاز، ابتدا محیط‌های کشت جامد حاوی آگار و پساب روغن کشی زیتون و ۰/۰۳ درصد گایاکول تهیه و استریل گردید و قارچ‌های جداسازی شده فوق الذکر در این محیط کشت بصورت نقطه‌ای کشت داده شدند. پس از طی ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در صورت مشاهده هاله قهوه‌ای رنگ پیرامون کلنی‌ها، تولید آنزیم مثبت در نظر گرفته شد (۸).

*ب) شناسایی قارچ جداسازی شده:* علاوه بر روش‌های ماکروسکوپی مانند بررسی خصوصیات و رنگ رو و پشت کلنی و خصوصیات میکروسکوپی، شناسایی بر اساس توالی‌های ناحیه‌ی ITS (شامل ژن rRNA 5.8S) نیز انجام گردید (۹ و ۱۰) (به منظور رسم درخت فیلوژنتیکی و نیز ارزیابی بیشترین رابطه خویشاوندی (Maximum likelihood) از نسخه ۷ نرم افزار MEGA استفاده گردید.

*ج) فرآیند تخمیر و تولید آنزیم:* بدین منظور از ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی گلوکز (۱۰ گرم بر لیتر)، پپتون (۳ گرم بر لیتر)،  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.6 گرم بر لیتر،  $\text{ZnSO}_4$  0.001 گرم بر لیتر،  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.4 گرم بر لیتر،  $\text{FeSO}_4$  0.0005 گرم بر لیتر،  $\text{MnSO}_4$  0.05 گرم بر لیتر،  $\text{MgSO}_4$  0.5 گرم بر لیتر) استفاده شد. پس از

فعالیت دارند، این آنزیم فقط نیاز به اکسیژن دارد تا فعالیت کاتالیکی خود را حفظ نماید (۲). لاکازها، گلیکوپروتئین‌های دایمر یا تترامری هستند که چهار اتم مس به ازای هر مونومر دارند. آنزیم لاکاز در بسیاری از صنایع از جمله سمیت زدایی از پساب‌های صنعتی، رنگ‌زدایی رنگ‌های صنعتی در پساب‌ها و اکسیداسیون و زیست تخریب پذیری ترکیبات فنولی و زئوبیوتیک‌ها کاربرد دارد (۳). این آنزیم به دلیل داشتن قابلیت اکسیدکنندگی ترکیبات فنولی و غیرفنولی ترکیبات لیگنین می‌تواند ترکیبات مشابه که در طبیعت بسیار سخت تجزیه پذیر هستند را نیز تجزیه کرده و به این ترتیب در حذف آلاینده‌ها نقش داشته باشد (۴). با توجه به خواص کاتالیتیک قابل توجه این آنزیم، از آن در صنایع مختلف با اهداف متفاوت استفاده می‌شود (۵). از کاربردهای مهم آن می‌توان به رنگبری پساب کارخانجات نساجی و تجزیه بیولوژیک آلاینده‌های فنلی اشاره کرد. به تازگی، کاربرد لاکاز به عنوان کاتالیزور زیستی در سنتز ترکیبات آلی، مورد توجه بسیار واقع شده است و این آنزیم با داشتن توانایی پلیمریزه کردن مواد در صنایع غذایی نیز کاربرد پیدا کرده است. نخستین بار یوشیدا در سال ۱۸۸۳ میلادی، لاکاز را در شیرابه درختان لاکای چینی یا ژاپنی کشف کرد. شناسایی و خالص سازی لاکاز از عصاره گیاهی خام دشوار است و بنابراین لاکازهای گیاهی کمتر شناخته شده و مورد استفاده قرار گرفته‌اند. لاکازها در انواع قارچها از جمله در آسکومیست‌ها، دترومیست‌ها و به ویژه در تعدادی از بازیدیومیست‌ها تحت عنوان قارچ‌های پوسنده سفید به وفور یافت می‌شوند (۶). هدف از این مطالعه، تولید آنزیم توسط قارچ‌های رشته‌ای جدا شده از پساب کارخانجات روغن کشی زیتون، تخلیص نسبی و بررسی پایداری و فعالیت آنزیم تحت شرایط فیزیوشیمیایی مختلف می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

محیط‌های کشت شامل PDA، PDB، نشاسته، عصاره مخمر، املاح معدنی شامل اسید فسفریک، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، دی پتاسیم منو هیدروژن فسفات، سولفات منیزیم،

مقادیر بالای پروتین از سوسپانسیون کشت معمولاً اولین مرحله، رسوب دهی پروتین ها با سولفات آمونیوم است. پس از رسوب دهی، سولفات آمونیوم را می توان از طریق کیسه دیالیز (کاتاف 14KD و قطر ۱/۵ سانتی متر) حذف کرد. در رسوب دهی، گروه های آبگریز پروتین ها در معرض قرار گرفته و با گروه های آبگریز پروتین های دیگر تجمع پیدا می کنند. رسوب پروتینی به حدی است که می توان آن را دید. از مزایای روش رسوب دهی آن است که می توان با هزینه ای کم، مقادیر بالای پروتین را رسوب داد. پس از رسوب دهی با سولفات آمونیوم، محتوای پروتینی با استفاده از سانتریفیوژ جدا می شود. ابتدا محلول های اشباع ۰/۴۰، ۰/۵۰، ۰/۶۰، ۰/۷۰، ۰/۸۰ از سولفات آمونیوم تهیه شد. ۲ میلی لیتر عصاره خام نمونه آنزیمی آماده در یک ارلن کوچک همراه با مگنت در یک بشر حاوی یخ بر روی دستگاه استیرر مغناطیسی قرار داده شد و بطور جداگانه محلول های سولفات آمونیوم کم کم به آن اضافه گردید تا کاملاً حل شود. این کار تا زمانی انجام شد که سولفات آمونیوم اشباع شده و رسوب داد. سپس ارلن به مدت ۲۴ ساعت داخل یخچال قرار داده شد. در مرحله ی بعد نمونه با سرعت 1000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی را دور ریخته و رسوب جمع آوری شد. ۱۰ میلی لیتر از بافر Tris به رسوب اضافه شد تا کاملاً حل شود. آنزیم خام در یخچال قرار داده شد (۱۲).

فعال سازی کیسه دیالیز با جوشاندن آن به مدت ۱ دقیقه در آب دو بار تقطیر انجام گردید و سپس انتقال آن به محلول 1% SDS و جوشاندن آن دو مرتبه به مدت ۱ دقیقه، سپس دوباره آن را در آب مقطر به مدت ۱ دقیقه جوشانده و در نهایت به آب مقطر منتقل شد. سپس، آنزیم خام به کیسه منتقل و درب آن محکم بسته شد. کیسه در ۱۰۰ میلی مول بافر Tris با pH=7 به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۴ درجه نگه داشته و بعد از آن دوباره بافر تازه ریخته و یک شب در یخچال نگهداری شد. سپس بافر دوباره تعویض و به مدت ۹۰ دقیقه در بافر تازه نگه داشته شد.

بمنظور آماده سازی ژل آکریل آمید و قرار دادن آن در دستگاه

تلقیح سوسپانسیون اسپورهای قارچی (۵ درصد حجمی به حجمی جای ۱۰۵ اسپور در هر میلی لیتر) به محیط تخمیر ارلن ها در ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۲ روز تحت شیکر (۱۵۰ دور در دقیقه) گرمخانه گذاری گردیدند. جهت تهیه محلول آنزیمی نمونه در ۴۰۰۰ دور به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ و محلول رویی به عنوان محلول آنزیمی در نظر گرفته شد.

(د) ارزیابی تولید آنزیم به روش سنجش گایاکل: بدین منظور از روش Kalra و همکاران (۲۰۱۳) استفاده گردید (۷). در این روش که نوعی رنگ سنجی در طول موج nm450 محسوب می گردد، رنگ قهوه ای متمایل به قرمز ناشی از اکسیداسیون گایاکل توسط آنزیم لاکاز ایجاد و فعالیت آنزیمی بر اساس روش رنگ سنجی به روش زیر ارزیابی گردید.

مخلوط واکنش شامل اجزای ذیل می باشد:

(a) گایاکل (۲ میلی مولار) به میزان یک میلی لیتر

(b) بافر استات سدیم (۱۰ میلی مولار) به میزان سه میلی لیتر

(c) محلول آنزیمی (محلول رویی حاصل از سانتریفوژ محیط کشت تخمیر) به میزان یک میلی لیتر

محلول بلانک (به جای محلول آنزیمی مستخرج شده از محیط) یک میلی لیتر آب مقطر در نظر گرفته شد. مخلوط فوق به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شد و سپس جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. فعالیت آنزیم بر اساس پروتکل منصف و همکاران (۲۰۱۶) بر اساس فرمول زیر تعریف گردید (۱۱):

$$EA = A.V/t.e.v$$

که در آن:

A = جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر

V = حجم کلی مخلوط واکنش بر حسب میلی لیتر

v = مقدار محلول آنزیمی مورد استفاده (۱ میلی لیتر)

t = زمان واکنش

e = ضریب گایاکل (۰/۶۷۴۰ میکرومول بر سانتی متر) است.

(ه) خلص سازی آنزیم و آزمون زایموگرافی: به منظور دستیابی به

پس از خارج کردن شیشه‌ها از دستگاه الکتروفورز روی سطح صاف گذاشته شد و فاصله گذاری‌های کناری شیشه‌ها جدا شد و به آرامی شیشه‌ها از هم جدا و ژل متصل به یکی از شیشه‌ها توسط اسکالپل جدا و داخل تشت رنگ آمیزی قرار گرفت. جهت رنگ آمیزی ژل و ظهور باند آنزیم از ۲۰۰ میکرولیتر محلول ABTS 3 میلی‌مولار که شناساگر آنزیم لاکاز است در بافر استات سدیم  $\text{pH}=8.4$  استفاده شد و ژل به مدت یک شب در این محلول قرار گرفت تا باندها بر روی ژل ظاهر شوند.

(و اثر عوامل مختلف فیزیکی و شیمیایی بر فعالیت آنزیم:

اثر زمان گرمخانه‌گذاری: بدین منظور فعالیت آنزیم در درجه حرارت  $30^\circ\text{C}$  و  $\text{pH}=7$  در بازه‌های زمانی مشخص (۶ تا ۲۱۶ ساعت) مورد آزمایش قرار گرفت.

اثر درجه حرارت: بدین منظور فعالیت آنزیم در حرارت‌های (۲۰ تا ۴۰ درجه سلسیوس) در  $\text{pH}=7$  مورد آزمایش قرار گرفت.

اثر Ph: بمنظور بررسی اثر انواع pH مختلف بر عملکرد آنزیم پنج محیط مختلف تخمیر با pH اولیه متفاوت ۵، ۶، ۷ و ۸ تهیه و پس از استخراج آنزیم، فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری شد. در تمامی موارد آزمایشات فوق بطور متوسط هر ۱۰ ساعت یکبار نمونه‌گیری جهت آنالیزهای مربوطه انجام شد.

از ارزیابی پایداری آنزیم: پایداری آنزیم در درجه حرارت‌ها و انواع pH مختلف اندازه‌گیری گردید. به این منظور چهار درجه حرارت ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۵ و  $\text{pH}=5,6,7,8$  شد. پس از استخراج محلول‌های آنزیمی، ابتدا آن را به مدت ۱۵ دقیقه بطور جداگانه تحت دماها و در انواع pH فوق قرار داده و سپس اثر آن بر اکسیداسیون گایاکل ارزیابی گردید تا بهترین درجه حرارت و pH جهت پایداری آنزیم تعیین گردد. نتایج بر حسب درصد فعالیت باقی مانده آنزیمی گزارش گردید.

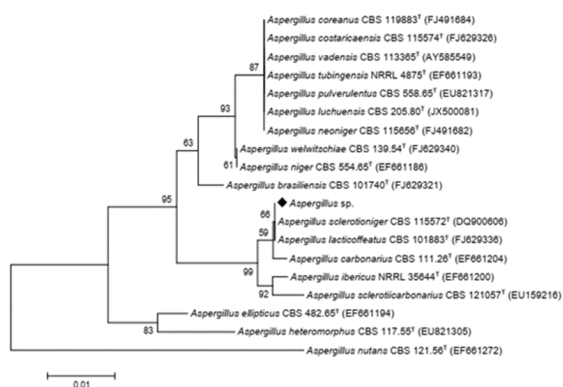
#### یافته‌ها

دوازده ایزوله فارچی طی جداسازی در محیط کشت حاصل گردید. خصوصیات مرفولوژیک تمامی جدایه‌ها بر اساس

ابتدا صفحه‌های شیشه‌ای کاملاً شسته شده و بعد از خشک شدن آن‌ها در دمای اتاق فاصله گذار بین دو شیشه‌ای در هر سه طرف آن قرار داده شد. برای جلوگیری از نشت ژل، شیشه‌ها توسط محلول آگار ۱ درصد مسدود شد. دوطرف فاصله گذارها صفحات شیشه‌ای توسط گیره‌های مخصوص محکم شدند و به صورت تراز بر روی پایه قرار داده شد. ۱۲ میلی‌لیتر محلول آکریل‌آمید به همراه ۹ میلی‌لیتر TBE(5X) را به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده و سپس برای لود نمودن حدود ۳ میلی‌لیتر از این محلول را در لوله فالكون ریخته ۳۰ میکرو لیتر محلول APS و به مقدار ۳۰ میکرو لیتر محلول TEMED (Tetramethyl ethylenediamine) به آن اضافه شد و خیلی سریع محتویات را بین دوشیشه ریخته تا انتهای آن بسته شود و از عدم نشت آن اطمینان حاصل گردد. سپس ژل زیرین ریخته و حباب‌های تشکیل شده بر روی آن توسط ایزوپروپانول از بین برده شد تا سطح ژل صاف شود طور کامل پلیمریزه شود. ژل رویی با غلظت ۵ درصد با افزودن TEMD آماده شد و روی ژل زیرین اضافه شد و سپس شانه‌ها را داخل آن قرار داده و با تکان دادن شانه حباب‌های اطراف آن خارج شده و اجازه داده شد (۲۰ دقیقه) تا ژل رویی پلیمریزه شود. سپس شانه‌ها به آرامی بدون آسیب به ژل خارج شد. برای قرار دادن شیشه‌ها در دستگاه الکتروفورز فاصله گذاری پایین بین شیشه‌ها برداشته شد و سپس گیره‌های کناری شیشه را جدا کرده و چاهک‌ها به سمت بالا قرار گرفت. شیشه‌ها در دستگاه الکتروفورز در جای خود ثابت شد و محفظه پایینی و بالایی الکتروفورز توسط بافر تانک پر شد و باید توجه داشت بین دو شیشه پایینی و تانک پایینی حبابی تشکیل نشود در غیر این صورت با سرنگ سرکجی تمام حباب‌ها خارج می‌شود.

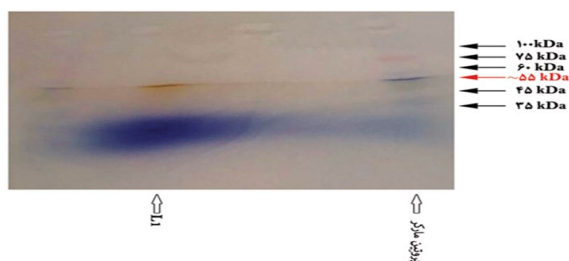
جهت لود پروتین‌ها در ژل نمونه‌های پروتینی به درون چاهک‌ها تزریق شد. به این صورت که ۲۵ میکرو لیتر از نمونه به همراه ۶ میکرو لیتر لدر و ۱ میکرو لیتر سمپل بافر توسط سمپل کریستالی به انتهای چاهک تزریق شد. سپس دستگاه به منبع انرژی با ولتاژ ۷۰ ولت و ۱۱۵ میلی آمپر به مدت ۱۲۰ دقیقه متصل شد.

ویژگی‌های مورفولوژیک تعیین گردید (شکل ۱).  
توالی نوکلئوتیدی است و در مجموعه داده (dataset) نهایی، ۴۴۵ جایگاه نوکلئوتیدی با استفاده از نرم افزار MEGA7 آنالیز شده است (دیاگرام ۱).



دیاگرام ۱: درخت فیلوژنتیکی اسپریژیلوس جدا شده با سایر اسپریژیلوس‌ها.

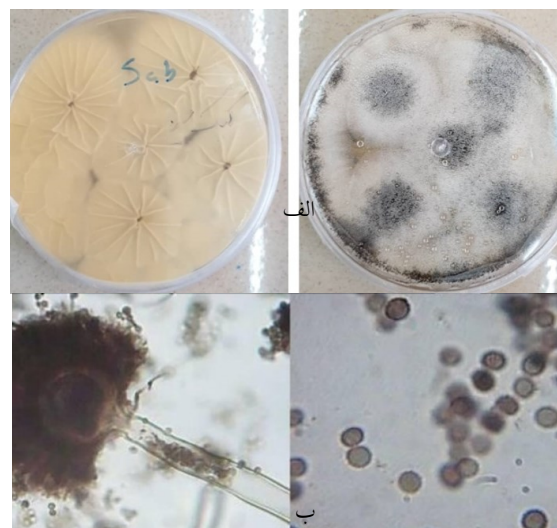
شکل ۲ نتیجه آنالیز زیموگرافی لاکاز را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود باند قهوه‌ای رنگ نشانه واکنش آنزیم و سوبسترا و نشان دهنده تخلیص آنزیم است.



شکل ۲: زیموگرافی فعالیت لاکاز در ژل رنگ آمیزی شده با 3 mM ABTS لاین (L1) آنزیم لاکاز خالص شده.

اثر شرایط تخمیر بر تولید بیومس و فعالیت آنزیمی نتایج زیر را نشان داد:

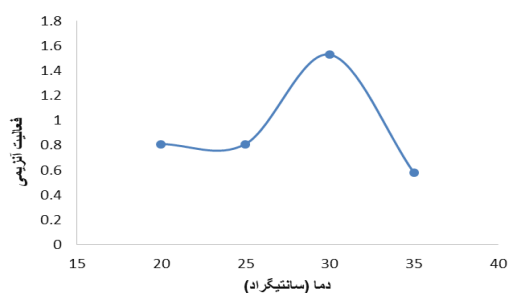
الف) اثر زمان گرمخانه‌گذاری: پس از کشت قارچ در محیط تخمیر اثر زمان گرمخانه‌گذاری بر تولید بیومس و فعالیت آنزیمی تعیین گردید. نتایج نشان داد زمان گرمخانه‌گذاری نقش بسیار مهمی در رشد و تولید آنزیم دارد. در دمای ۳۰ درجه سلسیوس تولید آنزیم تقریباً در سومین روز از آغاز تلقیح اسپورهای قارچی (ساعت ۴۸) شروع شده و در روز ششم (۱۴۴ ساعت) به حداکثر خود می‌رسد (1.53 IU/ml) اما تولید



شکل ۱: الف) تصویر کلنی قارچ مولد آنزیم ب) لام میکروسکوپی.

تمامی سویه‌ها از نظر تولید آنزیم لاکاز مورد آزمایش قرار گرفتند. در بین جدایه‌ها بهترین سویه مولد آنزیم (از نظر کمی) بر اساس خصوصیات مورفولوژیک به جنس اسپریژیلوس تعلق داشت. این یافته‌ها، تایید داده‌های محققان دیگر مبنی بر توانایی تولید آنزیم لاکاز توسط اعضای جنس اسپریژیلوس است (۱۳). برای توالی‌های ناحیه‌ی ITS (شامل ژن S rRNA 5.8s) که موقعیت سویه‌ی مورد نظر (♦) را در میان گونه‌های خویشاوند در جنس Aspergillus نشان می‌دهد. سویه‌های شاخص با علامت بالانویس T مشخص شده‌اند. شماره‌ی دسترسی به توالی‌ها در GenBank در پرانتز نوشته شده است. قارچ Aspergillus nutans 121.56 CBS به عنوان گروه خارجی تعیین شد. آنالیز با ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap انجام شد. مقدار Bootstrap که در کنار هر شاخه (branch) نشان داده شده است، درصد درخت‌هایی که در آن‌ها تاکسون‌های مرتبط، با یکدیگر در یک دسته (cluster) قرار گرفته‌اند را نشان می‌دهد. مقادیر Bootstrap بیش از ۵۰٪ در درخت نشان داده شده است. فواصل تکاملی به روش Maximum Composite Likelihood محاسبه شد و واحد آن‌ها تعداد جایگزینی باز به ازای هر نوکلئوتید است. خط مقیاس، ۰/۰۱ جایگزینی باز به ازای هر جایگاه نوکلئوتیدی را نشان می‌دهد. آنالیز شامل ۱۹

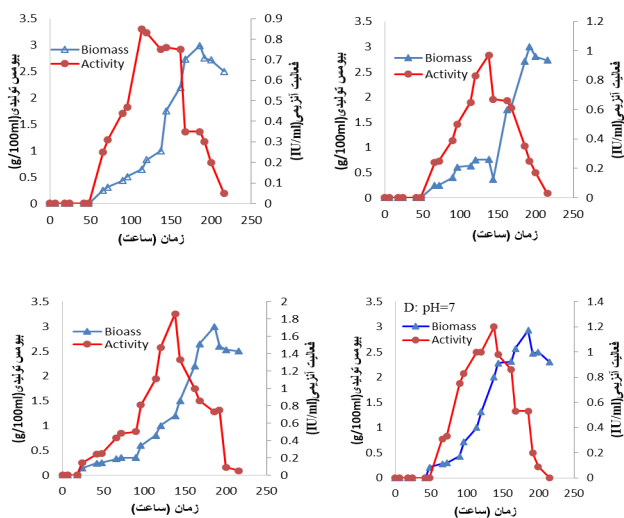




شکل ۴: اثر کلی دما طی واکنش ۱۵ دقیقه‌ای.

همانطور که در شکل مشاهده می‌شود بیشترین فعالیت آنزیمی در ۳۰ درجه سلسیوس مشاهده و پس از آن فعالیت با شیب تند کاهش می‌یابد.

اثر pH: پس از کشت قارچ در محیط تخمیر، اثر انواع pH ۴، ۵، ۶ و ۷ در بازه‌های زمانی مختلف بر تولید بیومس و فعالیت آنزیمی تعیین گردید. نتایج نشان داد بهترین میزان تولید بیومس و فعالیت آنزیمی در pH=6 به ترتیب به میزان 3 g/100 ml و 1.68 IU/ml بود.



شکل ۵: اثر pH بر رشد و تولید آنزیم لاکاز حاصل از قارچ اسپریژیلوس

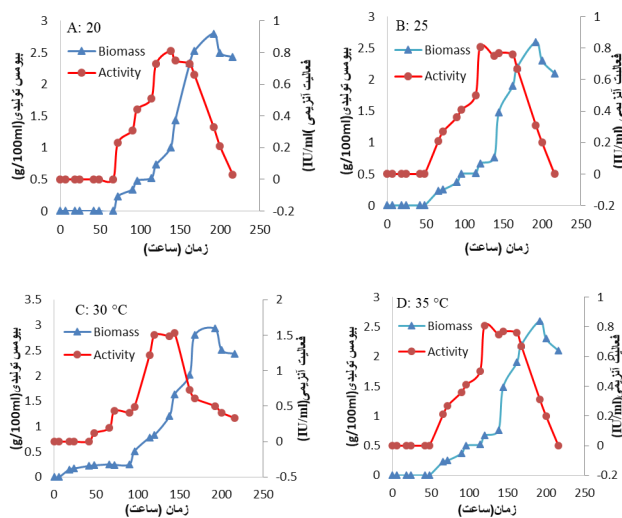
pH=6 مشاهده و پس از آن فعالیت با شیب تند کاهش می‌یابد. ارزیابی پایداری آنزیم نشان داد بیش از ۹۰ درصد فعالیت آن در انواع pH محدوده ۶-۷ و حرارت محدوده ۳۰-۳۵ حفظ گردید. گزارشات زیادی مرتبط با پایداری آنزیم لاکاز وجود ندارد و اساساً از دست دادن قابلیت آنزیم در pH و درجه حرارت‌های خاص یکی از محدودیت‌های کاربرد آن در زیست

بیومس در روز هشتم (ساعت ۱۹۲) به حداکثر رسید (2.93 g/100ml). بعد از روز ششم تولید آنزیم و بیومس قارچی به دلیل کاهش مواد غذایی در محیط کاهش یافت. در روز نهم عملاً تولید کاهش چشمگیری داشته و پس از آن تولیدی مشاهده نشد.

ب) اثر درجه حرارت بر تولید آنزیم: پس از کشت قارچ در محیط تخمیر اثر درجه حرارت‌های مختلف بر تولید بیومس و فعالیت آنزیمی تعیین گردید. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود درجه حرارت ۳۰ درجه سلسیوس بهترین حرارت برای تولید بیومس و فعالیت آنزیمی پس از ۸ و ۶ روز به ترتیب به میزان 2.93 g/100 ml و 1.53 IU/ml بود.

پیش آزمایشات انجام شده در این تحقیق تاثیر pH را به منظور انتخاب بهترین pH جهت تولید تایید نمود. شکل ۶ اثر کلی pH را طی واکنش ۱۵ دقیقه‌ای نشان می‌دهد.

همانطور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود بیشترین فعالیت آنزیمی



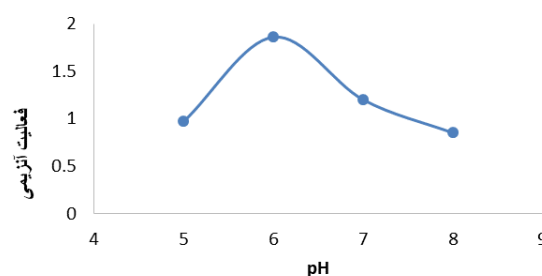
شکل ۳: اثر درجه حرارت گرمخانه‌گذاری بر رشد و تولید لاکاز توسط قارچ اسپریژیلوس

نتایج نشان داد که فعالیت آنزیمی از ۲۵ تا ۳۵ درجه سلسیوس روند افزایشی داشته است و بهترین درجه حرارت برای تولید فعالیت آنزیمی ۳۰ °C می‌باشد. پیش آزمایشات انجام شده در این تحقیق تاثیر درجه حرارت تولید را به منظور انتخاب بهترین طیف حرارتی جهت تولید تایید نمود. شکل ۴ اثر کلی دما را طی واکنش ۱۵ دقیقه‌ای نشان می‌دهد.

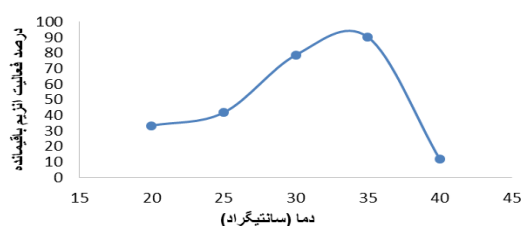
فناوری است.

داروهای ضد سرطان نیز کاربرد دارند و به مواد آرایشی اضافه می‌شوند تا اثرات سمی آنها به حداقل برسد (۱۷). عوامل متعددی بر تولید این آنزیم موثر است. از جمله این عوامل می‌توان به منبع کربن، منبع نیتروژن، عوامل القا کننده، دما، pH، زمان گرمخانه‌گذاری و نوع فرآیند تخمیری اشاره کرد (۱۸ و ۲۰). در این مطالعه ابتدا آنزیم لاکاز توسط یک سویه اسپرژیلوس جدا شده از پساب کارخانجات روغن کشی زیتون تولید و خالص سازی گردید. سپس اثر عوامل مختلف بر پایداری و فعالیت آنزیم مورد سنجش قرار گرفت.

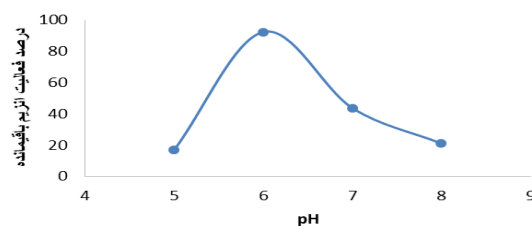
زمان گرمخانه‌گذاری نقش بسیار مهمی در رشد و تولید آنزیم دارد. در این مطالعه، در دمای ۳۰ °C تولید آنزیم تقریباً در سومین روز از آغاز تلقیح اسپوره‌های قارچی (۴۸ ساعت) شروع شده و در روز ششم (۱۴۴ ساعت) به حداکثر خود می‌رسد (1.53 IU/ml) اما تولید بیومس در روز هشتم (۱۹۲ ساعت) به حداکثر رسید (2.93 g/100ml). این نتایج با یافته‌های Karla و همکاران در سال ۲۰۱۳، منصف و همکاران در سال ۲۰۱۶ و Desai و Nityanand در سال ۲۰۱۱ که بیشترین تولید را شش روز پس از آغاز گرمخانه‌گذاری گزارش نمودند، مطابقت دارد (۷ و ۱۱ و ۲۱). نتایج این تحقیق با نتایج Kumar و همکاران در سال ۲۰۱۶ روی تولید آنزیم لاکاز توسط اسپرژیلوس فلاووس مطابقت ندارد. آن‌ها دریافتند که ماکزیمم تولید آنزیم 17.39 IU/ml و در روز دوازدهم از آغاز فرآیند تخمیر است (۱۹). Sadhavisam و همکاران طی تحقیقی روی سوش‌های قارچی مشابه شروع تولید آنزیم را طی دومین روز از گرمخانه‌گذاری و ماکزیمم تولید را در روز چهارم گزارش نمودند و دریافتند که پس از روز هشتم تولیدی صورت نمی‌پذیرد (۲۲). زمان تولید ماکزیمم آنزیم برای سایر جنس‌های قارچی مثل *Botryis cinerea* (۵ تا ۷ روز) و در مورد گونه جنس *Ganoderma* دهمین روز از آغاز فرآیند تخمیر گزارش شده است. همین زمان برای قارچ *Pleurotus florida*، ۱۲ روز با مقدار ماکزیمم 4.60 IU/ml گزارش گردیده است (۲۳). Karla و همکاران در سال ۲۰۱۳، Desai و Nityanand در سال ۲۰۱۱ نیز بیشترین تولید آنزیم را



شکل ۶: اثر pH بر فعالیت آنزیم لاکاز طی زمان ۱۵ دقیقه واکنش.



شکل ۷: پایداری آنزیم در درجه حرارت‌های مختلف.



شکل ۸: پایداری آنزیم تحت انواع مختلف pH.

## بحث

مطالعات زیادی بر روی لاکازها از لحاظ عملکرد زیستی، اختصاصیت سوبسترای، ساختار همراه با مس و کاربردهای صنعتی انجام شده است. این آنزیم توسط تعداد زیادی از باکتری‌ها، گیاهان و قارچ‌ها تولید می‌شود (۱۴). در قارچ‌ها، لاکازها نقش‌های مختلفی از نظر فیزیولوژیکی از جمله مورفولوژی، تعامل پاتوژن و میزبان، دفاع از تنش و تخریب لیگین را بر عهده دارند (۱۵). به دلیل استفاده از سوبستراهای گسترده، این آنزیم دارای کاربردهای بالقوه صنعتی گسترده‌ای مانند سفید کردن خمیر کاغذ، رنگ زدایی، توسعه کاتد اکسیژن برای سلول‌های سوخت زیستی، حسگرهای زیستی، تصفیه بیولوژیکی و سم زدایی از آلاینده‌های محیطی است (۱۶). همچنین، لاکازها در پزشکی برای تهیه داروهای خاص مانند



نتیجه با نتایج حاصل از این تحقیق هم‌خوانی دارد. آن‌ها حداکثر تولید آنزیم را در دمای 30 °C به مدت 6 روز پس از شروع فرایند گرمخانه‌گذاری گزارش نموده و به حداکثر بیومس 5 گرم به ازای 50 میلی‌لیتر محیط دست یافتند (۲۸ و ۱۹). Karla و همکاران در سال ۲۰۱۳ حداکثر فعالیت آنزیمی لاکاز جدا شده از قارچ‌های رشته‌ای در محدوده 40 تا 60 درجه سلسیوس گزارش کرده‌اند که با هیچ یک از محققان فوق مطابقتی نداشته و شاید دلیل این عدم مطابقت آن است که آنزیم مذکور مقاوم به حرارت بوده است (۷).

اساساً اثر درجه حرارت در تولید لاکاز به خصوص درجه حرارت بهینه بمنظور تولید از یک سویه قارچی به سویه دیگر بسیار متفاوت است اما غالباً در محدوده 25 تا 30 می‌باشد (۲۹). در اغلب موارد دمای بالاتر از 30 °C منجر به کاهش تولید گردیده است. Afreen و همکاران در بررسی اثر درجه حرارت بر تولید آنزیم لاکاز توسط قارچ *Arthrospira* دریافتند. که بهترین زمان درجه حرارت برای تولید آنزیم دمای 30 درجه به مدت 4 روز از ابتدای تخمیر است آن‌ها دریافتند افزایش درجه حرارت از 30 به 35 درجه باعث کاهش تدریجی در تولید آنزیم می‌شود و نتایج حاصل از تحقیق این محققان نیز با تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد غالب تحقیقات حاکی از آن است که با توجه به اینکه آنزیم‌ها متابولیسم‌های اولیه رشد میکروارگانیسم‌ها هستند رشد صحیح قارچ تعیین‌کننده میزان بهینه تولید آنزیم خواهد بود (30). درجه حرارت بر خواص محیط آبی میکروارگانیسم و بر فعالیت‌های سوخت و سازی آن خصوصاً بر میزان دسترسی میکروارگانیسم به موارد کل اثر مستقیم دارد (6).

pH عامل موثر دیگر در تولید آنزیم لاکاز است. در مطالعه حاضر، بهترین میزان تولید بیومس و فعالیت آنزیمی در pH = 6 به ترتیب به میزان 3 g/100ml و 1.68 IU/ml به دست آمد. pH بهینه برای فعالیت آنزیم در قارچ‌های رشته‌ای مولد لاکاز در محدوده 4 تا 6 گزارش شده است (۱۱). اثر pH در تولید این آنزیم مانند سایر آنزیم‌ها انکارناپذیر است. اثر pH معمولاً به دنبال ضعف در رشد میسیلیوم‌های قارچی و

توسط قارچ‌های رشته‌ای در زمان 6 روز ذکر کرده‌اند (۷ و ۲۱). در تحقیقات انجام شده توسط Tellez و همکاران بر عوامل تاثیرگذار در تولید آنزیم لاکاز اثر زمان گرمخانه‌گذاری مورد مطالعه قرار گرفته است و آنان در یافته‌اند که در کشت غوطه‌ور قارچ رشته‌ای جنس *Pleurotus* نزدیک به پانصد ساعت پس از شروع تخمیر تولید آنزیم به حداکثر مقدار خود رسید اما افزایش تولید از دومین دوره زمانی 15 ساعت از شروع تخمیر آغاز و با یک سیر صعودی ادامه یافت (۲۴). بدیهی است که این زمان به قابلیت سازگاری قارچ با محیط مورد نظر و اجزای موجود در محیط و وجود القاکننده‌ها در محیط کشت بستگی دارد.

درجه حرارت عامل دیگری است که بر روی تولید لاکاز موثر است. در این مطالعه، درجه حرارت 30 °C بهترین حرارت برای تولید بیومس و فعالیت آنزیمی پس از 8 و 6 روز بترتیب به میزان 2.93 g/100ml و 1.53 IU/ml بود. Kumar و همکاران در سال ۲۰۱۶ دمای بهینه تولید آنزیم توسط قارچ رشته‌ای *Aspergillus flavous* را 35 °C گزارش نموده‌اند. آن‌ها دریافتند تولید آنزیم در دمای 35 °C، pH = 7 و در حضور پپتون و سلولز به بیشترین میزان خود می‌رسد (۱۹). Palonon و همکاران در سال ۲۰۰۳ و Xu و همکاران در سال ۱۹۹۶ حداکثر فعالیت آنزیم‌های لاکاز قارچی مزوفیل را بین 30 تا 50 درجه سلسیوس گزارش نموده و ثابت کردند که این آنزیم‌ها در 60 °C فعالیت خود را بطور کامل از دست می‌دهند (۲۵ و ۲۶). Shradha و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر درجه حرارت بر تولید آنزیم لاکاز را بر حسب نوع میکروارگانیسم مولد، بسیار متفاوت ذکر کرده‌اند. بهترین دما برای تولید آنزیم توسط قارچ رشته‌ای *Pyenoporus Sanguineus* 25 °C و برای قارچ رشته‌ای جنس ترایکودرما 35 °C گزارش شده است (۲۷). Elshfei و همکاران در سال ۲۰۱۲ دمای 30 °C را به عنوان دمای بهینه تولید آنزیم توسط *Penicillium martensii* گزارش نمودند، همین درجه حرارت در بهینه‌سازی تولید آنزیم توسط Kumar و همکاران در سال ۲۰۱۶ با کلون‌سازی ژن مولد آنزیم در گونه اسپرژیلوس بهترین دما تعیین شد که این

را در این بازه زمانی حفظ نماید (۳۹).  
 Parabin و همکاران در سال ۲۰۱۶ پایداری آنزیم جداسازی از کشت قارچ کپکی *Ganoderma Lucidum* را در محدوده pH برابر ۲ تا ۸ و حرارت ۲۰ تا ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۸۰ دقیقه بررسی نمودند. بررسی نتایج نشان داد که آنزیم فعالیت خود را در طیف وسیعی از pH حفظ می‌کند. pH=5 بهترین pH از نظر پایداری آنزیم بوده و در pH بالاتر از آن فعالیت آنزیم تا ۸۰ درصد کاهش می‌یابد. در صورتی که زمان در معرض قرارگیری در pH=6 به بیش از ۱۸۰ دقیقه افزایش یابد آنزیم ۹۳ درصد از فعالیت خود را از دست می‌دهد. از نظر ثبات حرارتی مشاهده شد که بهترین دما برای پایداری زیر 50°C و بهینه دما 30°C بوده و با افزایش دما تا 70°C و بالاتر فعالیت آنزیم بطور کامل از دست می‌رود (۴۰).

Mabrouk و همکاران در سال ۲۰۱۲ با بررسی پایداری آنزیم خالص قارچ *Trematos phacteria mangrovei* دریافتند که پایداری فعالیت آنزیم به دما و مدت حرارت‌دهی بستگی دارد بدین ترتیب که در 35°C آنزیم به مدت ۶۰ دقیقه بهترین پایداری را از خود نشان داد اما در ۴۰ تا ۴۵ درجه سلسیوس طی ۶۰ دقیقه بیش از ۵۰ درصد فعالیت آنزیم از دست رفت. در دماهای بالاتر در محدوده ۶۵ تا ۸۰ درجه سلسیوس، به مدت ۶۰ دقیقه، ۹۸ درصد فعالیت آنزیم از دست می‌رود (۴۱).  
 در خصوص پایداری تحت pH متفاوت نیز ثابت شد در pH=4 بیشترین پایداری طی ۶۰ دقیقه حاصل شده و در pH=4.5، ۸۷/۲۴ درصد فعالیت طی ۳۰ دقیقه و در pH=3.5، ۵۴/۴۳ درصد فعالیت طی ۶۰ دقیقه حفظ می‌گردد. در انواع pH ۵، ۵/۵ و ۶ طی ۳۰ دقیقه فعالیت آنزیم بین ۸۰ تا ۹۱ درصد از دست می‌رود. به نظر می‌رسد که تنوع در پایداری آنزیم در pH و حرارت‌های مختلف به منبع جداسازی میکروارگانیسم نیز بستگی دارد (۴۲).

در تحقیق حاضر نیز بهترین پایداری در شرایط اسیدی حاصل شده است که مشابه تحقیق فوق و بسیاری تحقیقات دیگر می‌باشد. در گزارشات متعدد دیگر پایداری فعالیت عمدتاً در pH خنثی و کمی قلیایی گزارش گردیده است (۴۳ و ۴۵).

محدودیت تولید آنزیم اعمال می‌شود. قاعدتاً تولید بیومس قارچی می‌بایست با تولید آنزیم همخوانی داشته باشد (۳۱). یافته‌ها حاکی از آن است که pH بهینه فعالیت آنزیم تا حد زیادی به نوع سوبسترای مورد استفاده آن بستگی دارد. در مورد اغلب لاکازهای قارچی این pH برای سوبسترای ABTS حدود ۳ و برای گایاکل بین ۶ تا ۷ می‌باشد (۲۱ و ۳۲ و ۳۵).

بیشترین تحقیقات در خصوص اثر pH بر تولید آنزیم بر pH آغازین فرآیند تخمیر متمرکز شده است و متناسب با نوع سوبه قارچی تولید بهینه در pH ۶ تا ۷ گزارش گردیده است (۳۶). لذا نتایج تحقیق حاضر با یافته‌های فوق مطابقت نشان می‌دهد. اثر pH معمولاً به دنبال ضعف در رشد میسلیوم‌های قارچی و محدودیت تولید آنزیم اعمال می‌شود از قاعدتاً تولید بیومس قارچی می‌بایست با تولید آنزیم همخوانی داشته باشد (۳۱). اساساً تولید تمامی لاکازهای قارچی وابسته به pH است و pH بهینه برای عملکرد آن‌ها بر سوبستراهای فنلی ۵/۵-۳ است و غالباً در pH خنثی یا قلیایی غیر فعال اما از نظر ساختار پایدار هستند (۲۶ و ۳۷). در مطالعه Elshafei و همکاران بر روی اثر عوامل مختلف در تولید آنزیم خصوصاً اثر pH مشخص شد که بیشترین میزان آنزیم لاکاز توسط قارچ *Penizillium* در محدوده pH=5.5 تولید شده است و به نظر می‌رسد که در صورت افزایش یا کاهش pH با ایجاد تغییر در ساختار سه بعدی آنزیم فعالیت آن مختل می‌گردد و علاوه بر آن که نوسانات pH رشد قارچ را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد (۳۸). به نظر می‌رسد اثر pH بر عملکرد لاکازها تحت تاثیر عوامل مختلف فیزیکیوشیمیایی منجمله پتانسیل اکسیداسیون احیا می‌باشد (۳۷).

پایداری آنزیم یکی از مهمترین ویژگی‌های آن جهت کاربردهای صنعتی می‌باشد. بر اساس نتایج حاصله از این مطالعه بیش از ۹۰ درصد فعالیت آنزیم در pH محدوده ۶-۷ و حرارت محدوده ۳۵-۳۰ حفظ گردید. Sondhi و همکاران در سال ۲۰۱۵ نوعی لاکاز مقاوم به حرارت جدا شده از باکتری *باسیلوس تکونسیس* را با قابلیت پایداری ۲۴ ساعت در 70°C گزارش نموده‌اند. این آنزیم توانست ۸۰ درصد از فعالیت خود

### ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از تمام محققینی که در این پژوهش همکاری داشتند و همچنین از دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت کمال سپاسگزاری را دارند.

### تعارض منافع

وجود ندارد.

از دلایل دیگر تنوع پایداری در حرارت‌ها و pH مختلف می‌توان به ساختار مولکولی آنزیم اشاره کرد. در برخی مواقع بخش‌هایی از انتهای مولکولی به تغییرات شیمیایی و فیزیکی حساس‌تر هستند لذا به آسانی فعالیت اکسیداتیو خود را از دست داده و تقلیب شده و پایداری خود را از دست می‌دهند (۴۶).

### نتیجه‌گیری

در این مطالعه نوعی آنزیم لاکاز توسط قارچی از گونه آسپرژیلوس جداسازی شده از ضایعات زیتون تولید گردید. فعالیت بالا و قابل قبول آنزیم و پایداری نسبتاً مناسب آن در pH و درجه حرارت‌های مورد آزمایش، می‌تواند ایده استفاده از آن را جهت کاربرد صنعتی مطرح سازد.

## References

1. Hoegger PJ, Kilaru S, James TY, Thacker JR, Kües U. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS J.* 2006; 273 (10):2308-26.
2. Sakurai T, Kataoka K. Basic and applied features of multicopper oxidases, CueO, bilirubin oxidase, and laccase. *Chem. Rec.* 2007;7(4):220-9.
3. Sadhasivam S, Savitha S, Swaminathan K, Lin FH. Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1. *Process Biochem.* 2008; 43(7):736-42.
4. Atalla MM, Zeinab HK, Eman RH, Amani AY, Abeer AA. Characterization and kinetic properties of the purified *Trematosphaeria mangrovei* laccase enzyme. *Saudi J. Biol. Sci.* 2013; 20(4):373-81.
5. Johannes C, Majcherczyk A. Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66(2):524-8.
6. Afreen S, Anwer R, Singh RK, Fatma T. Extracellular laccase production and its optimization from *Arthrospira maxima* catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Saudi J. Biol. Sci.* 2018; 25(7):1446-53.

7. Kalra K, Chauhan R, Shavez M, Sachdeva S. Isolation of laccase producing *Trichoderma* spp. and effect of pH and temperature on its activity. *Int. J. Chem. Environ. Technol.* 2013; 5 (5):2229-35.
8. Pourkhanali K, Khayati G, Mizani F, Raouf F. Isolation, identification and optimization of enhanced production of laccase from *Galactomyces geotrichum* under solid-state fermentation. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2021;
9. Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *Journal of natural products.* 2017 Mar 24;80(3):756-70
10. Moshtaq Talip Al-mohanna , May 2016, METHODS FOR FUNGAL ENUMERATION, ISOLATION AND IDENTIFICATION,156-230.
11. Abd El Monssef RA, Hassan EA, Ramadan EM. Production of laccase enzyme for their potential application to decolorize fungal pigments on aging paper and parchment. *Ann. Agric. Sci.* 2016; 61(1):145-54.
12. Rastogi A, Singh P. Partial purification and characterization of laccase enzyme isolated from carpet and textile effluent. *IOSR-JBB.* 2017; 3(4): 43-51.
13. Jin X, Ning Y. Laccase production optimization by response surface methodology with *Aspergillus fumigatus* AF1 in unique inexpensive medium and decolorization of different dyes with the crude enzyme or fungal pellets. *J. Hazard. Mater.* 2013; 262:870-7.
14. Mayer AM, Staples RC. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry.* 2002; 60 (6):551-65.
15. Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G. Laccases: a never-ending story. *Cell. Mol. Life Sci.* 2010; 67(3):369-85.
16. Couto SR, Herrera JL. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol. Adv.* 2006; 24(5):500-13.
17. Ali MI, Ouf SA, Khalil NM, Abd El-Ghany MN. Biosynthesis of laccase by *Aspergillus flavus* NG85 Isolated from Saint Catherine protectorate. *Egypt. J. Exp. Biol.* 2015; 55(1):127-47.
18. Bhamare HM, Jadhav HP, Sayyed RZ. Statistical optimization for enhanced production of extracellular laccase from *Aspergillus* sp. HB\_RZ4 isolated from bark scrapping. *Environ. Sustain.* 2018; 1(2):159-66.
19. Kumar R, Kaur J, Jain S, Kumar A. Optimization of laccase production from *Aspergillus flavus* by design of experiment technique: Partial purification and characterization. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 2016; 14(1):125-31.
20. Yang J, Li W, Ng TB, Deng X, Lin J, Ye X. Laccases: production, expression regulation, and applications in pharmaceutical biodegradation. *Front. Microbiol.* 2017; 8:832.
21. Desai SS, Nityanand C. Microbial laccases and their applications: a review. *Asian j. biotechnol.* 2011; 3(2):98-124.

22. Sadhasivam S, Savitha S, Swaminathan K, Lin FH. Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1. *Process. Biochem.* 2008; 43(7):736-42.
23. Sivakumar R, Rajendran R, Balakumar C, Tamilvendan M. Isolation, screening and optimization of production medium for thermostable laccase production from *Ganoderma* sp. *Int. J. Eng. Sci. Technol.* 2010; 2(12):7133-41.
24. Téllez-Téllez M, Fernández FJ, Montiel-González AM, Sánchez C, Díaz-Godínez G. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied microbiology and biotechnology.* 2008 Dec;81(4):675-9.
25. Palonen H, Saloheimo M, Viikari L, Kruus K. Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella* sp. *Enzyme Microb. Technol.* 2003; 33(6), 854-862.
26. Xu F, Shin W, Brown SH, Wahleithner JA, Sundaram UM, Solomon EI. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochim. Biophys. Acta. Protein. Struct. Molec. Enzym.* 1996; 1292(2):303-11.
27. Shraddha, Shekher R, Sehgal S, Kamthania M, Kumar A. Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme. Res.* 2011; 1-11.
28. Elshafei AM, Hassan MM, Haroun BM, Elsayed MA, Othman AM. Optimization of laccase production from *Penicillium martensii* NRC 345. *Adv. life sci.* 2012; 2(1):31-7.
29. Shekher R, Sehgal S, Kamthania M, Kumar A. Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Enzyme Res.* 2011; 1-11.
30. Afreen S, Anwer R, Singh RK, Fatma T. Extracellular laccase production and its optimization from *Arthrospira maxima* catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Saudi journal of biological sciences.* 2018 Nov 1;25(7):1446-53.
31. Patel H, Gupte A. Optimization of different culture conditions for enhanced laccase production and its purification from *Tricholoma giganteum* AGHP. *Bioresour. Bioprocess.* 2016; 3(1):11.
32. Błyskal B. Fungi utilizing keratinous substrates. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 2009; 63(6):631-53.
33. Chiu SW, Poon YK. Submerged production of *Monascus* pigments. *Mycologia.* 1993; 85(2):214-8.
34. Konkol N, McNamara C, Sembrat J, Rabinowitz M, Mitchell R. Enzymatic decolorization of bacterial pigments from culturally significant marble. *J. Cult. Herit.* 2009; 10(3):362-6.
35. López-Miras M, Piñar G, Romero-Noguera J, Bolivar-Galiano FC, Ettenauer J, Sterflinger K, Martin-Sanchez I. Microbial communities adhering to the obverse and reverse sides of an oil painting on canvas: identification and evaluation of their biodegradative potential. *Aerobiologia.* 2013; 29(2):301-14.

36. Pannu JS, Kapoor RK. Microbial laccases: a mini-review on their production, purification and applications. *Int. J. Pharm. arch.* 2014;3(12):528-36.
37. Yin Q, Zhou G, Peng C, Zhang Y, Kües U, Liu J, Xiao Y, Fang Z. The first fungal laccase with an alkaline pH optimum obtained by directed evolution and its application in indigo dye decolorization. *AMB Express.* 2019; 9(1):151.
38. Elshafei AM, Hassan MM, Haroun BM, Elsayed MA, Othman AM. Optimization of laccase production from *Penicillium martensii* NRC 345. *Advances in life Sciences.* 2012;2(1):31-7.
39. Sondhi S, Sharma P, George N, Chauhan PS, Puri N, Gupta N. An extracellular thermo-alkali-stable laccase from *Bacillus tequilensis* SN4, with a potential to biobleach softwood pulp. *3 Biotech.* 2015; 5(2):175-85.
40. Shrestha P, Joshi B, Joshi J, Malla R, Sreerama L. Isolation and physicochemical characterization of laccase from *Ganoderma lucidum*-CDBT1 isolated from its native habitat in Nepal. *Biomed. Res. Int.* 2016; 1-11.
41. Mabrouk AM, Kheiralla ZH, Hamed ER, Youssry AA, Abd El Aty AA. Characterization and purification of the crude *Trematosphaeria mangrovei* laccase enzyme. *Egypt. Pharmaceut. J.* 2012;11(2):93-98.
42. Chakroun H, Mechichi T, Martinez MJ, Dhouib A, Sayadi S. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Trichoderma atroviride*: application on bioremediation of phenolic compounds. *Process. Biochem.* 2010; 45(4):507-13.
43. Ben Younes S, Mechichi T, Sayadi S. Purification and characterization of the laccase secreted by the white rot fungus *Perenniporia tephropora* and its role in the decolourization of synthetic dyes. *J. Appl. Microbiol.* 2007; 102(4):1033-42.
44. Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A, Sannia G. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(50):31301-7.
45. Kiiskinen LL, Viikari L, Kruus K. Purification and characterisation of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002; 59(2-3):198-204.
46. Sun S, Zhang Y, Que Y, Liu B, Hu K, Xu L. Purification and characterization of fungal laccase from *Mycena purpureofusca*. *Chiang. Mai. J. Sci.* 2013; 40:151-60