



مطالعه ویژگی‌های سینتیکی آنزیم لاکاز گرفته شده از قارچ ترامتس ورسیکالر (*Trametes versicolor*)

در حضور کانی‌های مونتموریلونیت و زئولیت

حدیثه رحمانی، امیر لکزبان، علیرضا کریمی و اکرم حلاج‌نیا

به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، دانشیار و استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد:

ha.rahmani@stu.um.ac.ir

چکیده

استفاده عملی از آنزیم لاکاز معمولا دارای محدودیت‌هایی است. با اینحال، این آنزیم‌ها اخیرا توجهات زیادی را در زمینه اصلاح محیط‌های آلوده به خود جذب کرده‌اند. در مطالعه حاضر، کانی‌های مونتموریلونیت و زئولیت به عنوان جاذب‌های طبیعی برای بررسی ویژگی‌های سینتیکی لاکاز بی‌جنبش شده حاصل از قارچ ترامتس ورسیکالر (*Trametes versicolor*) مورد استفاده قرار گرفتند. مقادیر V_{max} و K_m پس از بی‌جنبش سازی کاهش یافت و بیشترین کاهش در حضور زئولیت مشاهده گردید. بیشترین کارایی کاتالیزوری آنزیم لاکاز در حضور مونتموریلونیت مشاهده شد که این امر نشان می‌دهد این کانی توانایی کمتری برای جذب آنزیم داشت. در مجموع، هر دو کانی پتانسیل بی‌جنبش سازی لاکاز را داشتند و انتخاب نوع کانی به نوعی در گرو هدف مورد نظر و شرایط مطالعه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: لاکاز بی‌جنبش شده، جاذب‌های طبیعی، کاربردهای عملی

مقدمه

آنزیم‌های خارج سلولی در تجزیه، تغییر شکل و معدنی کردن مواد آلی خاک دخیل هستند. آنها متابولیت‌های فنولی محلول و خارج سلولی سمی را به محصولات پلیمریزه نامحلول اکسید می‌کنند و یا بستره‌های پلیمری را در ریزوسفر برای اهداف متابولیکی، هیدرولیز یا اکسید می‌نمایند (Datta et al., 2013; Wu et al., 2014; Gianfreda, 2015). لاکاز (E.C 1.10.3.2) به طور وسیعی در طبیعت وجود دارد (Chen et al., 2015). لاکاز اکسیداسیون یک الکترون از انواع ترکیبات آروماتیک به ویژه فنول‌ها را همزمان با احیای ۴ الکترون از اکسیژن مولکولی به آب، کاتالیز می‌کند (Chen et al., 2015). لاکازها اخیرا توجهات زیادی را در زمینه کاربردهای زیست‌فناوری از جمله اصلاح محیط‌های آلوده، به خود جذب کرده‌اند (Majeau et al., 2010; Chen et al., 2015). با اینحال، کاربردهای عملی آنها، به دلیل طول عمر کوتاه، حساسیت به دنا توره شدن و سختی بازیافت از سیستم واکنش، که ممکن است منجر به هزینه‌های بهره برداری بالا گردند، محدود می‌شود (Chen et al., 2015; Kennedy et al., 2007). بی‌جنبش سازی آنزیم روی جاذب‌های نامحلول، یک روش موثر برای فائق آمدن بر این محدودیت‌ها می‌باشد (Chen et al., 2015). لاکازها توسط جاذب‌های مختلفی از جمله نانو ذرات سیلیکا (Wang et al., 2010)، بیدهای پلیمری (Arica et al., 2009)، رزین‌ها (Chawla et al., 2011) و پلی پروپیلن (Georgieva et al., 2010) بی‌جنبش شده‌اند. به دلیل توانایی لاکازها در تجزیه بسیاری از مواد زئوبیوتیک آروماتیک، مطالعات متعددی پیرامون کاربرد لاکازهای بی‌جنبش شده در زیست پالایی خاک انجام شده است (Gianfreda and Rao, 2004; Rodríguez Couto and Toca Herrera, 2006). کانی‌های رسی خاک به عنوان جاذب‌های طبیعی، قادر هستند تا لاکازها را جذب نموده و سطوحی را فراهم آورند که بر اساس آن واکنش‌های کاتالیزوری صورت پذیرند، اما بی‌جنبش سازی لاکازها از طریق جذب، می‌تواند منجر به تغییرات قابل توجه ویژگی‌های آنزیم شود (Wu et al., 2014; Zimmerman and Ahn, 2011). اگر جذب آنزیم روی کانی‌های رسی منجر به انسداد جایگاه‌های فعال آن یا تغییر شکل ساختار سوم آنزیم شود، فعالیت آنزیم احتمالا کاهش می‌یابد. با اینحال، اگر جذب در جهت تثبیت ساختار آنزیم عمل نماید، قادر خواهد بود تا فعالیت آنزیم را حفظ نموده یا حتی افزایش دهد (Tietjen and Wetzel, 2003). روش‌ها و مواد مختلفی برای بی‌جنبش سازی آنزیم مورد استفاده قرار گرفته است. در این میان، گلو تار آلدئید یک عامل بسیار خوب برای روش اتصال عرضی است که پروتئین‌ها



را نامحلول کرده و یک تثبیت نسبتا دست نخورده از ساختارهای سلولی را فراهم می کند و به طور همزمان، فعالیت های آنزیمی سلولی را حفظ می نماید (Habeb and Hiramoto, 1968). در این مطالعه، گلو تار آلدهید به عنوان عامل اتصال عرضی، برای بی جنبش سازی لاکاز با منشا قارچ پوسیدگی سفید *Trametes versicolor* (تولید کننده اصلی لاکاز در خاک ها) مورد استفاده قرار گرفت (Collins et al., 1996; Cassland and Jönsson, 1999). کانی های مونتموریلونیت و زئولیت نیز به عنوان جاذب در فرآیند بی جنبش سازی مورد استفاده قرار گرفتند. هدف از این مطالعه ارزیابی ویژگی های سینتیکی آنزیم لاکاز، پس از بی جنبش سازی بر کانی های مونتموریلونیت و زئولیت بود.

مواد و روش ها

در این مطالعه، آنزیم لاکاز خالص گرفته شده از *T.versicolor*، با کارایی ویژه بیش از ۱۰U بر میلی گرم (پودری)، ABTS^۱ و کانی مونتموریلونیت خالص (پودر شده) با سطح ویژه ۲۷۰-۲۲۰ m²/g، از شرکت سازنده مواد شیمیایی سیگما آلد ریچ خریداری گردیدند. کانی زئولیت تقریبا خالص استخراج شده از معدنی واقع در جنوب شرقی سمنان، از شرکت کهربا واقع در شهر تهران خریداری شد و سپس خرد و آسیاب گردید. تصاویر SEM از هر دو کانی بررسی شده در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد آماده شد.

بی جنبش سازی آنزیم لاکاز بر روی کانی های مونتموریلونیت و زئولیت

بی جنبش سازی بر پایه روش Ruggiero et al., (1989) و Gianfreda and Bollag (1994) بر روی کانی های مونتموریلونیت و زئولیت انجام شد. ۲۰۰mg از هر یک از کانی ها از طریق شیک متوالی با ۰/۵ N HNO₃ و ۳-آمینو پروپیل تری اتوکسی زیلان ۲ درصد ساخته شده در استون خالص برای بی جنبش سازی آماده شد. کانی های فعال شده، با محلول گلو تار آلدهید ۵ درصد در بافر استات سدیم ۰/۱ مولار (pH=۵) تیمار شدند و به مدت ۲۴ ساعت با ۰/۵ میلی گرم آنزیم محلول در بافر تکان داده شدند. لاکاز بی جنبش شده از راه سانتریفوژ بازیافت و با بافر شسته شد تا زمانی که در محلول های شستشو، فعالیت لاکاز دیده نشد. مقدار لاکاز پیوند شده فعال بر سطوح کانی ها از تفاوت بین مقدار فعالیت اولیه آنزیمی با فعالیت در محلول رویی سوسپانسیون ها در هر نمونه آزمایشی به دست آمد (Lai et al., 2013).

بررسی خصوصیات سینتیکی آنزیم های لاکاز آزاد و جذب شده بر سطوح کانی ها

به منظور مطالعه خصوصیات سینتیکی آنزیم لاکاز در حضور کانی های مونتموریلونیت و زئولیت، ابتدا کمپلکس های هر یک از کانی های فوق با آنزیم لاکاز تهیه و سپس تغییرات سرعت واکنش های آنزیمی (لاکاز آزاد (Free-Lac)، کمپلکس لاکاز-مونتموریلونیت (MT-Lac) و کمپلکس لاکاز- زئولیت (Zeo-Lac)) در برابر غلظت های ۱-۰/۱ mM بستره (ABTS)، با در نظر گرفتن ۰/۵ mg آنزیم به ازای ۲۰۰mg کانی، در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و pH=۵ با دو تکرار بررسی شد. برای تعیین پارامترهای سینتیکی معادله میکائلیس-منتن (V_{max} و K_m) (معادله ۱)، از معادله لاین ویور-بارک استفاده شد

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad \text{(معادله ۲)} \quad (1)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2)$$

[S] برابر با غلظت بستره، V_{max} برابر با سرعت بیشینه واکنش آنزیمی، K_m (ثابت میکائلیس) بیانگر تمایل آنزیم به بستره بوده و برابر با غلظتی از بستره است که در آن سرعت واکنش آنزیمی برابر با نصف سرعت بیشینه می باشد (Gopinath and Sugunan, 2007; Johnson and Goody, 2011).

¹ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)

همچنین فاکتور اثر بخشی (η)، به عنوان یکی از پارامترهای مهمی که مبین نقش فرآیند پخشیدگی در واکنش است، محاسبه گردید (معادله ۳) (Sanjay and Sugunan, 2005). در محاسبه این فاکتور، سرعت های مربوط به غلظت بالای بستره که در آن اثرات بازدارندگی حذف شده است، در نظر گرفته می شود (Gopinath and Sugunan, 2007).

$$\eta = \frac{\text{Rate}(\text{immobilized})}{\text{Rate}(\text{free})} \quad (3)$$

اندازه گیری فعالیت آنزیم لاکاز

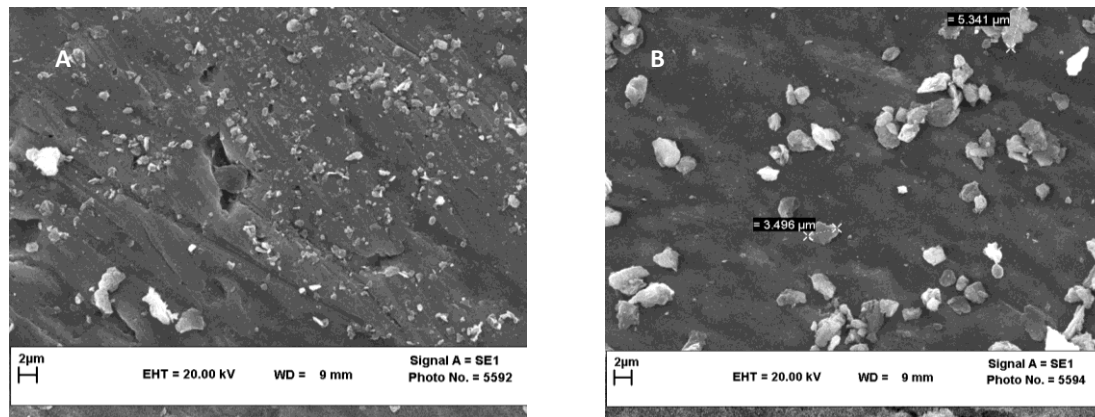
فعالیت لاکاز آزاد و بی جنبش شده در طول موج ۴۲۰ نانومتر، از طریق تولید رادیکالهای سبزی آبی $\text{ABTS}^{\bullet-}$ ناشی از اکسیداسیون آنزیمی بستره ABTS با استفاده از اسپکتروفوتومتر مدل WPA S2000UV/Vis در دمای اتاق تعیین شد. مخلوط واکنش محتوی ABTS (۱-۰/۱ mM)، بافر استات سدیم ۰/۱ M ($\text{pH}=5$) و نمونه محتوی آنزیم بود (Lu et al., 2007; Nicolucci et al., 2011). مدت زمان انجام واکنش آنزیمی ۱۰ دقیقه بود. پس از این مدت، لاکاز دناتوره شده در گرما، از طریق قرار دادن آنزیم آزاد در ۱۰۰ درجه سانتیگراد برای ۱۰ دقیقه بدست آمد و پس از توقف فعالیت آنزیمی، میزان رادیکالهای $\text{ABTS}^{\bullet-}$ ایجاد شده، به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین گردید. درصد فعالیت نسبی نیز بر اساس فعالیت اندازه گیری شده در تیمارهای مختلف نسبت به فعالیت بیشینه اندازه گیری شده در هر تیمار سنجیده شد. فعالیت آنزیم نیز مطابق معادله ۴ به دست آمد:

$$A \text{ (U L}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta E V_t}{0.036 V_s} \quad (4)$$

در این معادله، U (یونیت) برابر با فعالیت آنزیمی (یک یونیت از فعالیت لاکاز عبارت است از اندازه آنزیم لازم برای اکسید کردن یک میکرومول ABTS در دقیقه)، ΔE برابر با افزایش جذب در هر دقیقه، V_t و V_s به ترتیب برابر با حجم کل و حجم نمونه در کوت (mL) و ضریب جذب (420ϵ) برابر با 36000 L/mol.cm بود (Linke et al., 2005).

نتایج و بحث

بر اساس نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، اندازه ذرات کانی های مونتموریلونیت و زئولیت کمتر از ۱۰ میکرومتر بود (شکل ۱). لازم به ذکر است که در برخی از مطالعات، برهمکنش بین آنزیم ها و کانی ها با استفاده از ذرات بزرگتر نیز بررسی شده است (Makboul and Ottow, 1979).

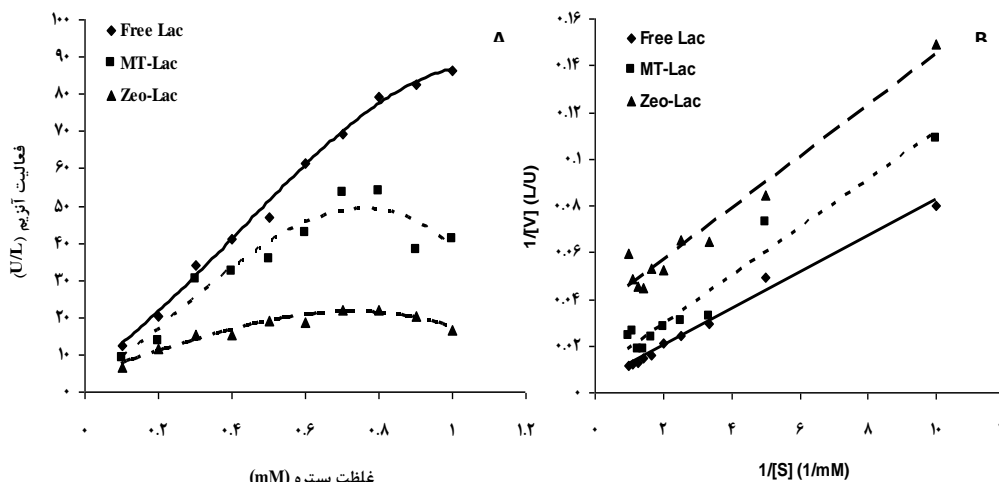


شکل ۱: تصاویر SEM زئولیت (A) و مونتموریلونیت (B)

شکل (۲)، نمودار سینتیک لاکاز آزاد و بی جنبش شده بر سطوح کانی های مونتموریلونیت و زئولیت را نشان می دهد. نتایج آزمایش نشان داد که آنزیم لاکاز در هر دو حالت آزاد و جذب شده از سینتیک میکائیلیس- منتن پیروی نمود (شکل A-۲).

پارامترهای این معادله براساس معادله لاین ویور-بارک با ترسیم معکوس سرعت ($\frac{1}{V}$) در برابر معکوس غلظت بستره ($\frac{1}{S}$) تعیین شد (شکل B-۲) (جدول ۱). بر این اساس، مقدار K_m برای آنزیم آزاد برابر با $1/93 \text{ mM}$ به دست آمد. همچنین، مقادیر K_m برای لاکاز بی جنبش شده روی مونتموریلونیت و زئولیت به ترتیب برابر با $1/24 \text{ mM}$ و $0/32 \text{ mM}$ بود. در حقیقت، بی جنبش سازی آنزیم روی کانی های مورد مطالعه منجر به کاهش مقادیر K_m گردید که این کاهش در حضور کانی زئولیت به نحو قابل ملاحظه ای بیشتر بود. همچنین، مقادیر V_{max} لاکاز بی جنبش شده روی مونتموریلونیت و زئولیت به ترتیب $120/48 \text{ U/L}$ و $29/07 \text{ U/L}$ بود درحالی که مقدار V_{max} لاکاز آزاد $243/90 \text{ U/L}$ است. بر اساس این نتایج، مقادیر K_m و V_{max} به طور معنی داری تحت تاثیر بی جنبش سازی آنزیم قرار گرفتند. این امر احتمالاً ناشی از تغییر تمایل لاکاز به بستره خود، به دلیل تغییرات ساختاری آنزیم پس از بی جنبش سازی بود (Metin, 2013).

شکل ۲- نمودارهای میکائیلیس-متن (A) و لاین ویور-بارک (B) لاکاز آزاد و بی جنبش شده بر مونتموریلونیت (MT-Lac) و زئولیت (Zeo-)



(Lac)

با توجه به مقادیر K_m به دست آمده، تمایل لاکاز به بستره ABTS از جذب بر مونتموریلونیت و زئولیت بیشتر از آنزیم های آزاد بود (زئولیت-لاکاز < مونتموریلونیت-لاکاز < لاکاز آزاد). مقادیر K_m بالاتر، تمایل کمتر آنزیم به یک بستره خاص را نشان می دهد (Gopinath and Sugunan, 2006). البته، محققان گوناگون نتایج متناقضی را گزارش کرده اند. برای مثال، Shindo et al., (2002)، کاهش مقادیر K_m و V_{max} کمپلکس اکسید آلومینیوم-فسفاتاز اسیدی را گزارش کردند. از سوی دیگر، Wang et al., (2013) افزایش K_m و کاهش V_{max} را برای لاکاز بی جنبش شده روی کمپلکس های TiO_2 -مونتموریلونیت گزارش کردند.

نسبت V_{max}/K_m ، به عنوان شاخصی از کارایی کاتالیزوری یک آنزیم مطرح است (Shindo et al., 2002). بر اساس جدول ۳، لاکاز پیوند یافته به مونتموریلونیت، در مقایسه با آنزیم بی جنبش شده روی زئولیت، کارایی کاتالیزوری بزرگتر و در مقایسه با آنزیم آزاد، کارایی کاتالیزوری کمتری را نشان داد. همچنین، Shindo et al., (2002) رابطه بین مقدار فسفاتاز اسیدی جذب شده توسط اجزای معدنی و نسبت V_{max}/K_m آنزیم بی جنبش شده را تخمین زدند. در بین اکسیدهای آهن، آلومینیوم و منگنز و کانی های رسی کائولین، مونتموریلونیت و آئوفان، توانایی بالاتر اجزای معدنی برای جذب آنزیم، با نسبت V_{max}/K_m کمتر آنزیم بی جنبش شده در تطابق بود. آنها پیشنهاد نمودند که کارایی کاتالیزوری کمپلکس های آنزیمی تشکیل شده، به وسیله قابلیت جذب آنزیم توسط اجزای معدنی تعیین می شود. احتمالاً، در کمپلکس هایی که در آنها مقدار بیشتری از آنزیم جذب می شود، درجه بالاتری از ممانعت فضایی و تغییرات صورت بندی در ساختار آنزیم اتفاق می افتد (Nannipieri et al., 1996) و متعاقباً، کارایی کاتالیزوری کمپلکس های آنزیمی ممکن است کاهش مفرط معنی داری را داشته باشد (Shindo et al., 2002). بر این اساس، نتایج نشان دادند که زئولیت در مقایسه با مونتموریلونیت، توانایی بالاتری را برای جذب آنزیم داشت (جدول ۱).

جدول ۱- ویژگی‌های سینتیک لاکاز آزاد و بی‌جنبش شده بر کانی‌های مونت‌موریلونیت و زئولیت

پارامتر سینتیک	Zeo-Lac	MT-Lac	Free Lac
V_{max} (U/L)	۲۹/۰۷	۱۲۰/۴۸	۲۴۳/۹۰
K_m (mM)	۰/۳۲	۱/۲۴	۱/۹۳
V_{max}/K_m	۹۰/۹۱	۹۷/۰۹	۱۲۶/۵۸
η	۰/۱۲	۰/۴۹	-

یکی از پارامترهای مهمی که نقش پخشیدگی را در واکنش نشان می‌دهد، فاکتور اثربخشی (η) می‌باشد (معادله ۳). در یک واکنش همگن که در آن تنها آنزیم آزاد حضور دارد (پخشیدگی کامل)، مقدار η برابر یا یک می‌شود (Gopinath and Sugunan, 2006). بر اساس نتایج، مقادیر η برای لاکاز بی‌جنبش شده روی مونت‌موریلونیت و زئولیت به ترتیب برابر با ۰/۴۹ و ۰/۱۲ بود (جدول ۱). بر این اساس، احتمالاً فرآیند پخشیدگی در حضور مونت‌موریلونیت در مقایسه با زئولیت، تقریباً کامل‌تر بود. هر چند در هر دو مورد، پخشیدگی نسبتاً پایین بود. به طور کلی، بی‌جنبش‌سازی مقدار فاکتور اثربخشی را کاهش داد (Gopinath and Sugunan, 2007). بر اساس نتایج تحقیقات (Gopinath and Sugunan, 2006)، اثرات پخشیدگی که مقدار آن توسط η نشان داده می‌شود، به دلیل استفاده از آنزیم‌ها در حالت ناهمگن در بی‌جنبش‌سازی عمل می‌کند. مقاومت‌های پخشیدگی خارجی یا داخلی می‌تواند سینتیک آنزیم متصل به ذره متخلخل را تحت تاثیر قرار دهد. این مقاومت‌ها به ترتیب با انتقال بستره و محصولات از توده محلول به سطح خارجی ذره آنزیم و انتقال داخلی آنها به درون سیستم متخلخل در ارتباط هستند (Siso et al., 1990). در مجموع و بر اساس نتایج به دست آمده، به نظر می‌رسد که هر دو کانی پتانسیل استفاده در زمینه‌های جذب و بی‌جنبش‌سازی آنزیم لاکاز را داشتند که البته انتخاب نوع کانی به نوعی در گرو هدف مورد نظر و شرایط مطالعه می‌باشد.

منابع

- Arica, M.Y., Altintas, B., Bayramoğlu, G., 2009. Immobilization of laccase onto spacer-arm attached non-porous poly(GMA/EGDMA) beads: application for textile dye degradation. *Bioresour. Technol.* 100, 665–669.
- Cassland, P., Jönsson, L.J., 1999. Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature. *Appl. Microbiol. Biot.* 52, 393–400.
- Chawla, S., Rawal, R., Shabnam, K.R.C., Pundir, C.S., 2011. An amperometric polyphenol biosensor based on laccase immobilized on epoxy resin membrane. *Anal. Methods.* 3, 709–714.
- Chen, L., Zou, M., Hong, F.F., 2015. Evaluation of Fungal Laccase Immobilized on Natural Nanostructured Bacterial Cellulose. *Front. Microbiol.* 6, 1245.
- Collins, P.J., Kotterman, M.J.J., Field, J.A., Dobson, A.D.W., 1996. Oxidation of anthracene and benzo[a]pene by laccase from *Trametes versicolor*. *Appl. Environ. Microb.* 62, 4563–4567.
- Datta, S., Christena, L.R., Rajaram, Y.R.S., 2013. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech.* 3, 1–9.
- Georgieva, S., Godjevargova, T., Mita, D.G., Diano, N., Menale, C., Nicolucci, C., et al., 2010. Non-isothermal bioremediation of waters polluted by phenol and some of its derivatives by laccase covalently immobilized on polypropylene membranes. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 66, 210–218.
- Gianfreda, L., 2015. Enzymes of importance to rhizosphere processes. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 15, 283–306.
- Gianfreda, L., Bollag, J.M., 1994. Effect of soils on the behavior of immobilized enzymes. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 58, 1672–1681.
- Gianfreda, L., Rao, M.A., 2004. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme Microb. Tech.* 35, 339–354.
- Gopinath, S., Sugunan, S., 2006. Enzymes immobilized on montmorillonite: Comparison of performance in batch and packed-bed reactors. *React. Kinet. Catal. Lett.* 88, 3–9.
- Gopinath, S., Sugunan, S., 2007. Enzymes immobilized on montmorillonite K 10: Effect of adsorption and grafting on the surface properties and the enzyme activity. *Appl. Clay. Sci.* 35, 67–75.
- Habeeb, A.F.S.A., Hiramoto, R., 1968. Reaction of proteins with glutaraldehyde. *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 16–26.



- Johnson, K.A., Goody, R.S., 2011. The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *Biochemistry*. 50, 8264-8269.
- Katwa, L.C., Ramakrishna, M., Rao, M.R.R., 1981. Spectrophotometric assay of immobilized tannase. *J Biosci*. 3, 135–142.
- Kennedy, L.J., Selvi, P.K., Padmanabhan, A., Hema, K.N., Sekaran, G., 2007. Immobilization of polyphenol oxidase onto mesoporous activated carbons – isotherm and kinetic studies. *Chemosphere*. 69, 262–270.
- Lai, C., Zeng, G.M., Huang, D.L., Zhao, M.H., Huang, H.L., Huang, C., Wei, Z., Li, N.J., Xu, P., Zhang, C. and Xie, G.X. 2013. Effect of ABTS on the adsorption of *Trametes versicolor* laccase on alkali lignin. *International Biodeterioration and Biodegradation* 82: 180-186.
- Linke, D., Bouws, H., Peters, T., Nimtz, M., Berger, R.G., Zorn, H., 2005. Laccases of *Pleurotus sapidus*: Characterization and Cloning. *J. Agric. Food Chem*. 53, 9498–9505.
- Lu, L., Zhao, M., Wang, Y., 2007. Immobilization of laccase by alginate–chitosan microcapsules and its use in dye decolorization. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 23, 159–166.
- Majeau, J.A., Brar, S.K., Tyagi, R.D., 2010. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresour. Technol*. 101, 2331–2350.
- Makboul, H.E., Ottow, J.C.G., 1979. Michaelis Constant (K_m) of Acid Phosphatase as Affected by Montmorillonite, Illite, and Kaolinite Clay Minerals. *Microb. Ecol*. 5, 207-213.
- Metin, A.Ü., 2013. Immobilization of Laccase onto Polyethyleneimine Grafted Chitosan Films: Effect of System Parameters. *Macromol. Res*. 21, 1145-1152.
- Nannipieri, P., Sequi, P., Fusi, P., 1996. Humus and enzyme activity, in: Piccolo, A. (Ed.), *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier, Amsterdam, pp. 293-328.
- Nicolucci, C., Rossi, S., Menale, C., Godjevargova, T., Ivanov, Y., Bianco, M., Mita, L., Bencivenga, U., Mita, D.G., Diano, N., 2011. Biodegradation of bisphenols with immobilized laccase or tyrosinase on polyacrylonitrile beads. *Biodegradation*. 22, 673–683.
- Rodríguez Couto, S., Toca Herrera, J.L., 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol. Adv*. 24, 500–513.
- Ruggiero, P., Sarkar, J.M., Bollag, J.M., 1989. Detoxification of 2,4-dichlorophenol by a laccase immobilized on soil or clay. *Soil Sci*. 147, 361–370.
- Sanjay, G., Sugunan, S., 2005. Glucoamylase immobilized on montmorillonite: Synthesis, characterization and starch hydrolysis activity in a fixed bed reactor. *Catal. Commun*. 6, 525-530.
- Shindo, H., Watanabe, D., Onaga, T., Urakawa, M., Nakahara, O., Huang, Q., 2002. Adsorption, Activity, and Kinetics of Acid Phosphatase as Influenced by Selected Oxides and Clay Minerals. *Soil Sci. Plant Nutr*. 48, 763-767.
- Siso, M.I.G., Graber, M., Condoret, J.S., Combes, D., 1990. Effect of diffusional resistance on the action pattern of immobilized alpha-amylase. *J. Chem. Technol. Biotechnol*. 48, 185-200.
- Tietjen, T., Wetzal, R.G., 2003. Extracellular enzyme-clay mineral complexes: Enzyme adsorption, alteration of enzyme activity, and protection from photodegradation. *Aquat Ecol*. 37, 331–339.
- Wang, F., Guo, C., Yang, L.R., Liu, C.Z., 2010. Magnetic mesoporous silica nanoparticles: fabrication and their laccase immobilization performance. *Bioresour. Technol*. 101, 8931–8935.
- Wang, Q., Peng, L., Li, G., Zhang, P., Li, D., Huang, F., Wei, Q., 2013. Activity of Laccase Immobilized on TiO₂-Montmorillonite Complexes. *Int. J. Mol. Sci*. 14, 12520-12532.
- Wu, Y., Jiang, Y., Jiao, J., Liu, M., Hua, F., Griffiths, B.S., Li, H., 2014. Adsorption of *Trametes versicolor* laccase to soil iron and aluminum minerals: Enzyme activity, kinetics and stability studies. *Colloids Surf, B*. 114, 342–348.
- Zimmerman, A.R., Ahn, M.Y., 2011. Organo-mineral-enzyme interaction and soil enzyme activity, in: Shukla, G., Varma, A. (Eds.), *Soil Enzymology, Soil Biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 271–292.

Kinetic properties of laccase enzyme from the fungus *Trametes versicolor* in the presence of montmorillonite and zeolite minerals

H. Rahmani, A. Lakzian, A. Karimi and A. Halajnia

PhD student, professor, Associate professor and Assistant professor respectively, Dept. of Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, IRAN.

Email: ha.rahmani@mail.um.ac.ir



Abstract

Practical applications of laccases are usually limited. However, they have recently attracted much attention in remediation of contaminated environments. In the present study, montmorillonite and zeolite minerals were used as natural supports to investigate the kinetic parameters of the immobilized laccase from the fungus *Trametes versicolor*. The K_m and V_{max} values decreased after immobilization, and more further reduction was observed in zeolite. The greater catalytic efficiency of laccase in the presence of montmorillonite indicated that it had a lower ability to adsorb the enzyme. In general, both minerals had the potential to immobilize the laccase; and the choice of minerals depends on the intended purpose and study condition.

Keywords: Immobilized enzyme, Natural supports, Practical applications