

Original Article

Bioremediation of petroleum compounds through optimizing of ligninolytic enzyme production

Mitra Parsa¹, Elaheh Pourfakhra^{1*}, Samira Saeidi Akbarzadeh¹, Shole Mosanef¹, Kamal Khodaei², Farhad Jadidi¹

1-Industrial and Environmental Biotechnology Department, Research Institute of Applied Science, ACECR, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

2-Environmental Geology Department, Research Institute of Applied Science, ACECR, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Extended Abstract

Introduction: Oil, as the most important economic resource in the country, not only generates income but also inevitably causes environmental pollution during the stages of extraction, refining, distribution, and storage. Microorganisms utilize degrading enzymes of petroleum compounds to break down hydrocarbons as a carbon source in environmental stress. Enzymes usage, due to their lack of pollution and controllability, is the best method for cleaning up environmental pollutants. One of the best enzymes for degrading oil compounds is ligninolytic enzymes produced by fungi. The aim of this study is to optimize the production of enzymes that degrade petroleum compounds for oil pollution cleanup.

Material and Methods: In this study, the fungal strain 2E, which was preserved in the microorganism bank of Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR) of Shahid Beheshti University, was utilized, and its ability to produce ligninolytic enzymes was investigated. The experimental design was carried out with the Minitab 22.2.1 software for optimizing enzyme production, and the environment that had the highest protein level was identified using spectrophotometry and Bradford method. Enzymatic assays were performed at wavelengths of 420 and 595 nanometers for laccase and peroxidases, respectively, using suitable substrates. The concentration of protein in each of the specified environments was determined, and the degradation of crude oil was measured using lignin-degrading enzymes.

Results and discussion: Fungus was identified as a producer of ligninolytic enzymes. Decomposition of guaiacol and the color change of the culture medium to brown indicated the activity of the laccase enzyme and the reaction on substrate was confirmed by formation of red color in the presence of manganese peroxidase and decolorization of azure in the presence of lignin peroxidase. Using Minitab 22.2.1 software and cultivation results in 12 culture media from the experimental design with the aforementioned software, the stirring and inducing factors showed the greatest effect. The highest protein concentration was obtained under conditions of 5 grams per liter of glucose, 0.02 grams per liter of ammonium sulfate, 0.1 millimolar of copper sulfate, 4% crude oil, pH 7, temperature at 30 degrees Celsius, 15 milliliters of inoculum, and a stirring speed of 150 rpm. Three media with high protein concentration were tested for enzyme activity, and a direct relationship between

protein concentration and the activity of ligninolytic enzymes was observed, leading to the selection of the optimal environment. The supernatant obtained from the fungal culture in the optimal condition was concentrated using ammonium sulfate precipitation and chromatography, with enzyme activity measured at 128.32 U/ml for laccase and 59.4 U/ml for peroxidases. The enzymatic biodegradation ability in the presence of crude oil was investigated, and based on the results of gas chromatography, the degradation rate of crude oil was calculated to be 88.3 ± 2.17 percent, which indicates a high degradation capability compared to other scientific reports regarding petroleum compounds. Ligninolytic enzymes, due to their wide substrate range and high structural flexibility, can react with petroleum compounds as pseudo-substrates and can lead to biodegradation and environmental cleanup.

Conclusion: Based on the results of this research, ligninolytic enzymes can be considered a powerful option for petroleum compounds biodegradation as a pseudo-substrate. From an economic perspective, optimizing ligninolytic enzymes production in an appropriate environment for practical use is important. It is hoped that the use of hydrocarbon-degrading enzymes as an environmentally friendly method will pave a new path for addressing oil pollution.

Keywords: Biodegradation, Optimization, Hydrocarbon compounds, Degrading enzymes, Enzyme assay.

مقاله پژوهشی

پاک سازی زیستی ترکیبات نفتی با بهینه سازی تولید آنزیم های لیگنینولایتیک

میترا پارسا^۱، الهه پورفخرایی*^۱، سمیرا سعیدی اکبرزاده^۱، شعله مصنفی^۱، کمال خدایی^۲، فرهاد جدیدی^۱

۱- گروه بیوتکنولوژی صنعت و محیط، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- گروه زمین شناسی محیطی، پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده مبسوط

سابقه و هدف: نفت به عنوان مهم ترین منبع اقتصادی در کشور علاوه بر ایجاد درآمد، به صورت اجتناب ناپذیری در مراحل استخراج، پالایش، توزیع و انبارش سبب آلودگی محیط زیست می گردد. میکروارگانیسم ها در تنش های محیطی از آنزیم های تجزیه کننده ترکیبات نفتی برای تجزیه هیدروکربن ها به عنوان منبع کربن استفاده می کنند. استفاده از آنزیم ها، به دلیل عدم ایجاد آلودگی و قابلیت کنترل، بهترین روش پاک سازی آلودگی های محیط زیست است. از بهترین آنزیم ها برای تجزیه ترکیبات نفتی، آنزیم های لیگنینولایتیک هستند که توسط قارچ ها تولید می شوند. هدف از انجام این آزمایش، بهینه سازی تولید آنزیم های تجزیه کننده ترکیبات نفتی برای پاک سازی آلودگی نفتی است.

مواد و روش ها: در این پژوهش از سویه قارچی 2E که در بانک میکروارگانیسمی جهاد دانشگاهی شهید بهشتی نگهداری می شد استفاده گردید و توانایی تولید آنزیم های لیگنینولایتیک در آن بررسی شد. طراحی آزمایش با نرم افزار Minitab 22.2.1 برای بهینه سازی تولید آنزیم صورت گرفت و محیطی که بیشترین میزان پروتئین را داشت با روش اسپکتروفتومتری و بردفورد شناسایی شد. سنجش آنزیمی در طول موج ۴۲۰ و ۵۹۵ نانومتر به ترتیب برای لاکاز و پراکسیدازها، با سوبسترای مناسب انجام شد. میزان غلظت پروتئین هر یک از محیط هایی که با مشخص شده بود تعیین شد و میزان تجزیه نفت خام با آنزیم های لیگنینولایتیک سنجش گردید.

نتایج و بحث: قارچ مورد مطالعه مولد آنزیم های لیگنینولایتیک شناخته شد، تجزیه گایاکول و تغییر رنگ محیط کشت به رنگ قهوه ای نشان از فعالیت آنزیم لاکاز و واکنش بر سوبسترا در ایجاد رنگ قرمز در حضور منگنز پراکسیداز و رنگبری آزر در حضور لیگنین پراکسیداز تأیید گردید. با استفاده از نرم افزار Minitab 22.2.1 و نتایج کشت در ۱۲ محیط کشت حاصل از طراحی آزمایش با نرم افزار مذکور فاکتور هم زدن و القاکننده بیشترین تأثیر را نشان دادند. بیشترین غلظت پروتئین در شرایط گلوکز ۵ گرم در لیتر، آمونیوم سولفات ۰/۰۲ گرم در لیتر، سولفات مس ۰/۱ میلی مولار و ۴٪ نفت خام (حجمی/حجمی)، pH=۷، دما ۳۰ درجه سانتی گراد، ۱۵ میلی لیتر مایه تلقیح و سرعت همزنی ۱۵۰ rpm به دست آمد. سه محیط با غلظت بالای پروتئین مورد سنجش فعالیت آنزیمی قرار گرفتند و رابطه

مستقیم بین غلظت پروتئین و فعالیت آنزیم‌های لیگنینولایتیک مشاهده گردید و محیط بهینه انتخاب شد. سوپرناتانت حاصل از کشت قارچ در محیط بهینه با روش‌های رسوبدهی با سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی تغلیظ شد و میزان فعالیت آنزیمی به ترتیب برای لاکاز و پراکسیدازها $128/32 \text{ U/ml}$ و $59/4 \text{ U/ml}$ محاسبه شد. توانایی تجزیه زیستی آنزیمی در حضور نفت خام بررسی شد و بر اساس نتایج کروماتوگرافی گازی میزان تجزیه نفت خام $88/3 \pm 2.17$ درصد محاسبه شد که نسبت به گزارش‌های علمی دیگر توان تجزیه‌ای بالایی را در مقابل ترکیبات نفتی نشان می‌دهد. آنزیم‌های لیگنینولایتیک به دلیل گستره دامنه سوسترایی وسیع و انعطاف‌پذیری بالای ساختاری قابلیت واکنش با ترکیبات نفتی را به‌عنوان شبه سوستر دارند و می‌توانند سبب تجزیه زیستی و پاک‌سازی محیط‌زیست شوند. نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این پژوهش می‌توان آنزیم‌های لیگنینولایتیک را گزینه‌ای توانمند در تجزیه زیستی ترکیبات نفتی به‌عنوان شبه سوستر بر شمرد. از نظر اقتصادی بهینه‌سازی تولید آنزیم‌های لیگنینولایتیک در محیط مناسب برای استفاده کاربردی دارای اهمیت است. امید است استفاده از آنزیم‌های تجزیه‌کننده نفت به‌عنوان روشی دوستدار محیط‌زیست مسیر نوینی برای رفع آلودگی‌های نفتی باشد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه زیستی، بهینه‌سازی، ترکیبات نفتی، آنزیم‌های تجزیه‌کننده، سنجش آنزیمی.

مقدمه

افزایش فعالیت‌های بشر و رشد صنعت سبب افزایش آلودگی محیط‌زیست شده است (Asemoloye *et al.*, 2020). نفت از مهم‌ترین منابع آلوده‌کننده محیط‌زیست به شمار می‌رود که به دلیل وابستگی اقتصاد کشور به آن، همواره یافتن راهکارهای پاک‌سازی آلودگی‌های نفتی در اولویت است (Ahlbrandt, 2002). یک‌سوم انرژی مصرفی در جهان را نفت تأمین می‌کند. تولید و توزیع نفت و فرآورده‌های نفتی به‌عنوان سوخت فسیلی مورد نیاز صنایع و چرخه حمل و نقل حیاتی بوده و نقش بسیار مهمی در تأمین سوخت دارند و به دلیل گستردگی استفاده در کشور، تحمیل آلودگی‌های نفتی به محیط‌زیست اجتناب ناپذیر است. نفت خام مخلوطی از هزاران ترکیب مختلف است؛ چهار گروه از ترکیبات عمده در نفت خام شامل پارافین‌ها، نفتن‌ها، آروماتیک‌ها، رزین‌ها و آسفالتن‌ها هستند. در مجموع پارافین‌ها و نفتن‌ها هیدروکربن‌های اشباع شده هستند و هیدروکربن‌های آروماتیک از نظر هیدروژن، غیراشباع هستند (Varjani, 2017). همچنین ترکیبات نفتی علاوه بر ترکیبات آلی، دارای ترکیبات ازته، سولفید گوگرد، مواد معدنی و ترکیبات سنگین هستند (Bai *et al.*, 2019). برخی از این ترکیبات، سرطان‌زا و سمی بوده و توانایی تجمع زیستی در زنجیره‌های غذایی را دارند (Davoodi, 2017). طبق طبقه‌بندی RCRA¹ مواد حاصل از پالایش نفت و انواع ترکیبات نفتی در فهرست مواد زائد خطرناک قرار می‌گیرند (Hall *et al.*, 2001). از

مهمترین منابع در خطر آلودگی نفتی، آب‌های زیرزمینی هستند، این منابع آبی در لایه‌های آبدار و اشباع زیر زمین تجمع پیدا کرده‌اند و حدود چهار میلیون مترمکعب از ذخایر آب جهان را تشکیل می‌دهند و از مهم‌ترین منابع تأمین آب در دنیا محسوب می‌شوند. حضور مخازن نفتی در محدوده آب‌های زیرزمینی یکی از مهم‌ترین تهدیدات برای آلودگی آبخوان‌ها محسوب می‌شود. از بین بردن آلودگی یک آبخوان، زمان بر و مشکل بوده و حذف منبع آلودگی به‌سختی انجام می‌شود (Shahbazi & Mehrjoo, 2014).

مطالعات میدانی از محیط‌های آلوده نشان داده است که افزایش این آلاینده‌ها می‌تواند منجر به کاهش زیست‌توده میکروبی، کاهش تراکم جمعیت باکتریایی زنده، مهار کانی‌سازی مواد آلی و کاهش تجزیه شود. آلودگی نفتی منجر به عدم تعادل در نسبت کربن به نیتروژن در محل نشت می‌شود. این موضوع باعث کمبود نیتروژن در محیط آغشته به نفت می‌شود که در نتیجه رشد باکتری‌ها و استفاده از منابع کربن را به تأخیر می‌اندازد. علاوه بر این، غلظت‌های زیادی از مواد آلی زیست‌تخریب‌پذیر در لایه بالایی خاک، ذخایر اکسیژن موجود در خاک را کاهش داده و سرعت انتشار اکسیژن به لایه‌های عمیق‌تر را کاهش می‌دهند (Singh Tomar & Jajoo, 2013).

از روش‌های مختلفی برای حذف آلودگی‌های نفتی از جمله روش شیمیایی، فیزیکی و زیستی استفاده می‌شود. روش شیمیایی سبب بین رفتن تعادل شیمیایی محیط و ایجاد آلودگی ثانویه در محیط می‌شود. در روش‌های فیزیکی، مانند سوزاندن، ممکن است موجودات زنده بومی از جمله میکروب‌های تجزیه‌کننده نفت نابود شده و سمیت نفت باقیمانده، افزایش یابد یا موجب آلودگی هوا شود (Davoodi, 2017). استفاده از روش‌های زیستی برای تجزیه فرآورده‌های نفتی به‌عنوان روشی دوستدار محیط‌زیست، می‌تواند جایگزین مناسبی برای سایر روش‌ها باشد. استفاده از روش‌های زیستی بسیار کم‌هزینه بوده و در مقیاس مولکولی با شکست زنجیره‌های هیدروکربنی به کاهش میزان گرانشی نفت کمک می‌کنند. همچنین مواد زیستی، آلودگی‌های ثانویه استفاده از ترکیبات شیمیایی را ندارند و سازگار با محیط‌زیست هستند. بعضی از میکروارگانیسم‌ها قادر هستند با تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی از آنها به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند و سبب کاهش آلودگی خاک و آب شوند (Rojo, 2009). انواع میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها توانایی تخریب ترکیبات نفتی را دارند (Wang & Shao, 2013) و از کربن موجود در ساختار آنها برای تأمین کربن استفاده می‌کنند (Meng *et al.*, 2018).

قارچ‌ها به‌عنوان ابزاری قدرتمند برای تجزیه انواع ترکیبات آلی به‌ویژه هیدروکربن‌های پلی آروماتیک در نفت محسوب می‌شوند. دلیل این توانمندی، حضور آنزیم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی و مهم‌ترین آنها آنزیم‌های لیگنینولایتیک است. از ویژگی‌های آنزیم‌های لیگنینولایتیک این است که به‌صورت خارج سلولی تولید می‌شوند و دامنه سوبسترای وسیعی دارند (Hess *et al.*, 2002). قارچ‌ها دارای دو نوع سیستم آنزیمی خارج سلولی هستند: ابتدا سیستم هیدروولایتیک که هیدرولاز را تولید می‌کند و مسئول تجزیه پلی‌ساکاریدها است و سپس سیستم لیگنینولایتیک که سیستمی اکسیداتیو و خارج سلولی منحصربه‌فرد است که باعث تجزیه لیگنین و باز شدن حلقه‌های فنیل می‌شود. از آنزیم‌های لیگنینولایتیک می‌توان به آنزیم لاکاز، لیگنین پراکسیداز و منگنز پراکسیداز اشاره کرد که به دلیل فعالیت بر شبه سوبستراها، نقش بسیاری در شکست مولکول‌های نفتی با توجه به ساختار منعطف و گستره دامنه سوبسترای می‌توانند داشته باشند (Bogan *et al.*, 1996).

چندین مکانیسم آنزیمی تجزیه هیدروکربن‌های پلی آروماتیک توسط این نوع از آنزیم‌ها مورد بررسی قرار گرفته‌اند:

الف) لیگنین پراکسیداز و منگنز پراکسیداز مستقیماً اکسیداسیون تک الکترونی هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای را با پتانسیل یونی‌زاسیون ۷.۵۵ eV کاتالیز و کینون تولید می‌کنند که می‌تواند از طریق ادغام حلقه بیشتر متابولیزه شود (Hammel *et al.*, 1991).

ب) لاکاز اکسیداسیون تک الکترونی هیدروکربن‌های پلی آروماتیک را کاتالیز می‌کند، مثلاً آنتراسن و بنزوآلفاپیرن که بازده واکنش در حضور واسطه‌هایی نظیر HBT² یا ABTS³ افزایش می‌یابد (Johannes *et al.*, 1996).

ج) برخی ترکیبات هیدروکربن‌های پلی آروماتیک تا شش حلقه از طریق واکنش‌های اکسیداسیون واسطه به منگنز پراکسیداز در خارج و درون سلول قابل تجزیه هستند (Moen & Hammel, 1994).

در این مطالعه از قارچ‌های تولیدکننده آنزیم‌های لیگنینولایتیک که در این پژوهشکده نگهداری می‌شوند، استفاده شده است. تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی در بهترین سویه با بالاترین تولید آنزیم با استفاده از پارامترهای مختلف و با استفاده از نرم‌افزار Minitab 22.2.1 بهینه‌سازی شده و در نهایت پس از سنجش فعالیت، آنزیم‌ها استخراج شدند. در نهایت توانایی شکست نفت خام توسط آنزیم‌های تولیدی بررسی شد. هدف از این پژوهش یافتن روش‌های نوین و کاربردی برای پاک‌سازی زیستی ترکیبات نفتی به‌خصوص در مناطقی است که محدودیت دسترسی اکسیژن برای باکتری‌های هوازی مانند آب‌های زیرزمینی وجود دارد. استفاده از آنزیم‌ها به‌عنوان روشی کارا و نوین برای پاک‌سازی زیستی در حال توسعه در جهان است و احتمال اثرات تغییر فلور یا جهش باکتریایی را در محیط‌زیست از بین می‌برد.

مواد و روش‌ها

کشت جدایه قارچی

در این پژوهش از جدایه قارچی، 2E که دارای مشابهت به دسته بازیدیومیست‌ها و جنس *Daedaleopsis* sp. است و در بانک میکروارگانیسم جهاد دانشگاهی نگهداری می‌شود، استفاده شد. برای کشت جدایه قارچی از محیط کشت جامد SDA استفاده شد و سپس به مدت ۱۴ روز در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند.



شکل ۱- قارچ مولد آنزیم لیگنینولایتیک

Fig. 1- Ligninolytic enzyme-producing fungus

اثبات تولید آنزیم‌های لیگنینولایتیک در قارچ مورد مطالعه

برای اثبات توانایی ترشح آنزیم لاکاز در گونه مورد مطالعه از گایاکول استفاده شد. بدین منظور به محیط کشت جامد SDA به میزان ۰/۰۴ درصد گایاکول (حجمی/حجمی) اضافه شد. یک سانتی‌متر از نمونه قارچی تهیه و در مرکز پتری دیش با قطر ۱۵ سانتی‌متر کشت شدند و به مدت ۱۴ روز در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. تشکیل حلقه قهوه‌ای رنگ در اطراف قارچ نشانه تجزیه گایاکول و ترشح آنزیم لاکاز است (Umar, 2021). برای اثبات توانایی ترشح آنزیم لیگنین پراکسیداز نیز از آزور نوع B استفاده شد. به محیط کشت جامد SDA به میزان ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر آزور اضافه شد و با شرایط مشابه کشت شدند. بی‌رنگ شدن محیط کشت در اطراف قارچ نشانه تجزیه آزور و ترشح آنزیم لیگنین پراکسیداز است (Archibald, 1992). برای اثبات توانایی آنزیم منگنز پراکسیداز از فنل رد استفاده شد. بدین منظور به محیط کشت جامد SDA، میزان ۰/۰۲۵ درصد (حجمی/حجمی) فنل رد اضافه شد و در شرایط مشابه کشت شد. تشکیل حلقه قرمز رنگ در اطراف قارچ نشانه تجزیه فنل رد و ترشح آنزیم منگنز پراکسیداز است (Agrawal *et al.*, 2017).

بهینه‌سازی ترشح آنزیم‌های لیگنینولایتیک

بهینه‌سازی ترشح آنزیم‌های لیگنینولایتیک در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت نهایی با در نظر گرفتن متغیرهایی مانند منبع کربن (گلوکز)، منبع نیتروژن (آمونیم سولفات)، منبع القاکنده (نفت سفید)، ترکیبات معدنی (سولفات مس)، مقدار مایه تلقیح (قارچ) در غلظت‌های مختلف، میزان pH، دما و دور همزن طراحی شد (Reddy & Kanwal, 2022). برای غربالگری و شناسایی پارامترهای مؤثر از طراحی پلاکت برمن استفاده شد. نرم‌افزار آماری Minitab 22.2.1 برای طراحی آزمایش‌ها، تحلیل نتایج و تعیین اهمیت هر پارامتر مورد استفاده قرار گرفت. در این بررسی هر هشت پارامتر، هر کدام در دو سطح مورد غربالگری قرار گرفتند. با انجام ۱۲ آزمایش تأثیر هر یک از پارامترها بر فرآیند تجزیه ترکیبات نفتی توسط قارچ مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین برای افزایش دقت، هر آزمایش، سه بار تکرار شد و در نهایت ۳۶ آزمایش انجام شد. همچنین نمونه‌های تحت تیمار با نمونه‌های کنترل (فقط محیط پایه) مقایسه شدند. ماتریس پیشنهادی نرم‌افزار برای انجام آزمایش‌ها در جدول ۱ ارائه شده است (Zhang *et al.*, 2013).

جدول ۱- ماتریس پیشنهادی نرم‌افزار برای انجام آزمایش‌ها

Table 1- The software suggested a matrix to carry out the tests

ردیف	درصد مایه تلقیح	دور در دقیقه	دما (درجه سانتیگراد)	pH	غلظت مس (mM)	القاکنده (%)	آمونیم سولفات (g/L)	گلوکز (g/L)
۱	۵	۱۵۰	۴۰	۷	۰/۰۳۳	۱	۰/۰۲	۴۰
۲	۱۵	۱۰۰	۴۰	۷	۰/۰۳۳	۴	۳/۹۶	۴۰
۳	۱۵	۱۵۰	۴۰	۵	۰/۰۳۳	۱	۳/۹۶	۵
۴	۵	۱۵۰	۴۰	۵	۰/۱	۴	۳/۹۶	۵
۵	۱۵	۱۵۰	۳۰	۷	۰/۱	۴	۰/۰۲	۵
۶	۱۵	۱۰۰	۳۰	۵	۰/۱	۱	۳/۹۶	۴۰
۷	۱۵	۱۵۰	۳۰	۵	۰/۰۳۳	۴	۰/۰۲	۴۰
۸	۱۵	۱۰۰	۴۰	۷	۰/۱	۱	۰/۰۲	۵
۹	۵	۱۰۰	۳۰	۷	۰/۰۳۳	۴	۳/۹۶	۵

۵	۰/۰۲	۱	۰/۰۳۳	۵	۳۰	۱۰۰	۵	۱۰
۴۰	۰/۰۲	۴	۰/۱	۵	۴۰	۱۰۰	۵	۱۱
۴۰	۳/۹۶	۱	۰/۱	۷	۳۰	۱۵۰	۵	۱۲

تعیین غلظت پروتئین و سنجش فعالیت آنزیم‌ها

محاسبه غلظت پروتئین

برای تعیین مقدار پروتئین تولید شده توسط قارچ در شرایط مختلف طبق جدول ۱ از روش برادفورد، که براساس اتصال پروتئین موجود به رنگ کوماسی بلو است، استفاده شد. بدین منظور، ۰/۰۱ گرم از رنگ کوماسی بلو G-250 در ۵ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد حل و به آن ۱۰ میلی لیتر اسیدفسفریک ۸۵ درصد اضافه شد و به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. غلظت‌های مختلفی از پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA^۵) تهیه شده و به معرف برادفورد اضافه شد. سپس مقدار جذب بعد از ۵ دقیقه در ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. برای افزایش دقت میانگین جذب بعد از سه بار تکرار در هر غلظت به دست آمد. منحنی استاندارد با رسم مقدار جذب در برابر غلظت‌های تهیه شده رسم گردید. با رسم منحنی استاندارد و اندازه‌گیری جذب نمونه مجهول، غلظت پروتئین محاسبه شد (Bradford, 1976).

بررسی بهینه‌سازی ترشح آنزیم لیگنینولایتیک

برای اطمینان از نسبت غلظت پروتئین و آنزیم‌های موردنظر در سه محیط با بیشترین میزان غلظت پروتئین، فعالیت‌های آنزیمی مورد مطالعه قرار گرفت تا بتوان بهترین محیط را برای بهینه‌سازی تولید آنزیم‌های لیگنینولایتیک معرفی نمود.

بررسی فعالیت آنزیم لاکاز

از ABTS با غلظت ۵ میلی‌مولار در بافر سیترات ۰/۲ مولار با pH=۵ با ضریب خاموشی $M^{-1} \text{ cm}^{-1} = 36000 \text{ } \epsilon_{420}$ به عنوان شناساگر برای طیف سنجی مرئی در طول موج ۴۲۰ نانومتر و سوپرناتانت حاصل از کشت مایع قارچ در محیطی که حاوی آنزیم‌های خارج سلولی بود استفاده شد. برای مطالعه عملکرد لاکاز و حذف عملکرد پراکسیدازها از آنزیم کاتالاز برای حذف آب اکسیژنه به عنوان کوفاکتور پراکسیدازها استفاده شد. در ابتدا به مدت ۳ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد صورت گرفت و سپس توسط دستگاه اسپکتروفتومتر فرابنفش- مرئی مدل ۲۰۰۰ از کمپانی WPA مقدار جذب به دست

آمد. ایجاد رنگ سبز به همراه افزایش ارتفاع پیک در طول موج مورد نظر میزان عملکرد آنزیم را نشان داد (Forootanfar *et al.*, 2016).

بررسی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز

۱ میلی‌لیتر از مخلوط واکنش حاوی ۵۰ میلی‌مولار بافر مالونات سدیم ($\text{pH}=4/5$)، ۲ میلی‌مولار سولفات منگنز، ۰/۲ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن تهیه شده و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره سلولی اضافه شد. مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه شد. واکنش با افزودن پراکسید هیدروژن آغاز شد و جذب بلافاصله پس از افزودن پراکسید هیدروژن در طول موج ۵۹۵ نانومتر در فواصل یک دقیقه‌ای اندازه‌گیری شد (Kudo *et al.*, 2017).

بررسی توانایی آنزیم‌های لاکاز و پراکسیداز در شکست ترکیبات نفتی

پس از تعیین بهترین شرایط برای تولید آنزیم‌های لیگنینولایتیک در محیط مناسب، کشت قارچ در مقیاس بیشتر انجام شد و سوپرناتانت حاوی آنزیم‌های تولیدی با استفاده از روش‌های رسوب‌دهی سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی تغلیظ شد (Illuri *et al.*, 2021). توانایی آنزیم‌های لیگنینولایتیک در شکست ترکیبات نفتی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، از محیطی که بهترین فعالیت آنزیمی را نشان داد، به‌عنوان محیط بهینه استفاده شد.

استخراج ترکیبات نفتی با استفاده از حلال کلروفرم

آنزیم‌ها در معرض نفت خام برای بررسی پاک‌سازی زیستی قرار گرفتند. پس از گذشت ۷۲ ساعت ترکیبات نفتی باقیمانده با استفاده از حلال کلروفرم استخراج شدند. نمونه کنترل حاوی نفت خام و تمام محتویات واکنش به جز آنزیم‌های لیگنینولایتیک بودند تا بتوان از اثر سایر متغیرها صرف نظر کرد.

تعیین باقیمانده ترکیبات نفتی از طریق روش کروماتوگرافی

در این پژوهش از دستگاه کروماتوگرافی گازی کمپانی شیمادزو مدل 15A با ستون Rtx-5MS استفاده شد. باتوجه به قابلیت‌های ستون مورد استفاده، از برنامه‌های دمایی مختلف استفاده شد. دمای تزریق و شناساگر ۳۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. دمای ستون از ۵۰ درجه سانتیگراد شروع و با رمپ ۱۰ درجه بر دقیقه به ۲۸۰ درجه سانتیگراد رسید و به مدت ۵ دقیقه در آن دما نگه داشته شد (Pourfakhraei *et al.*, 2018).

نتایج و بحث

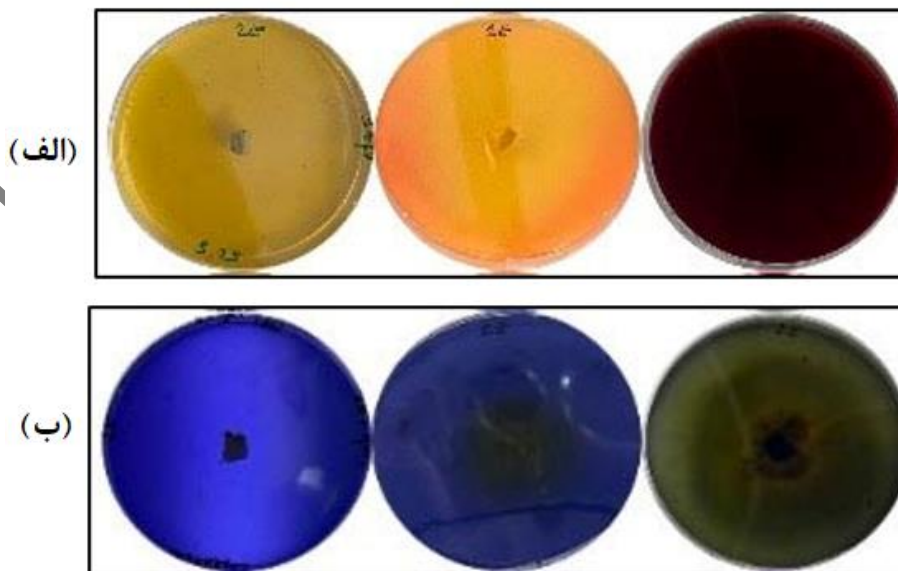
نتایج اثبات تولید آنزیم‌های لیگنینولایتیک در قارچ هدف

در آزمایش اثبات تولید آنزیم‌های لیگنینولایتیک، تغییر رنگ محیط کشت به دلیل فعالیت آنزیم لاکاز، منگنز پراکسیداز و لیگنین پراکسیداز مشاهده گردید که در شکل‌های ۲ و ۳ قابل مشاهده است. تجزیه گیاکول و تغییر رنگ محیط کشت به رنگ قهوه ای نشان از فعالیت آنزیم لاکاز دارد (شکل ۲). در خصوص پراکسیدازها هم واکنش بر سوبسترا در ایجاد رنگ قرمز در حضور منگنز پراکسیداز و رنگ‌بری آزور در حضور لیگنین پراکسیداز قابل مشاهده است (شکل ۳).



شکل ۲- تغییر رنگ محیط به دلیل فعالیت آنزیم لاکاز

Fig. 2- colour change of culture medium due to laccase enzyme activity



شکل ۳- تغییر رنگ محیط به دلیل فعالیت پراکسیدازی الف) ایجاد رنگ قرمز در فعالیت منگنز پراکسیدازی ب) تجزیه

رنگ آزور به دلیل فعالیت لیگنین پراکسیدازی

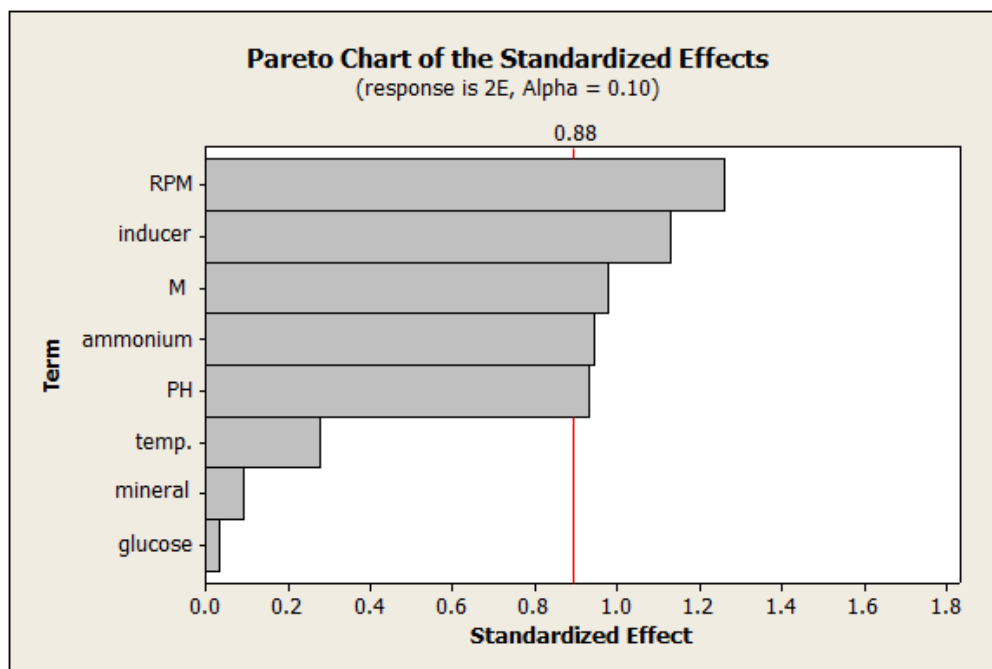
Fig. 3- colour change of culture medium due toto peroxidase activity. a) Red color creation due to manganese peroxidase activity b) Decomposition of azure color due to lignin peroxidase activity

نتایج بهینه‌سازی تولید آنزیم‌های لیگنینولایتیک

بهینه‌سازی تولید آنزیم

چندین فاکتور از جمله منبع کربن (گلوکز)، منبع نیتروژن (آمونیم سولفات)، منبع القاکنده (نفت سفید) و ترکیبات معدنی (سولفات مس) و مقدار مایه تلقیح در غلظت‌های مختلف برای بهینه‌سازی تولید آنزیم استفاده شد. در این پژوهش بیشترین فاکتورهای مؤثر در قارچ مورد استفاده، فاکتورهای مربوط به دور همزن، القاکنده، مقدار مایه تلقیح قارچ (M)، منبع نیتروژن و pH بودند (شکل ۴).

تحلیل آماری نشان می‌دهد مدل مورد استفاده با سطح اطمینان ۹۵ درصد، تطابق بسیار خوبی با داده‌های آزمایشگاهی دارد. براساس جدول ANOVA ارائه شده، می‌توان مشاهده کرد که اثرات متغیرهای دور همزن، القاکنده، مقدار مایه تلقیح (قارچ)، منبع نیتروژن و pH بر پاسخ به صورت معنادار ارزیابی شده است و P-value همگی آنها کمتر از ۰/۰۵ می‌باشد (جدول ۲). مقادیر F-value برای متغیرهای معنادار نسبتاً بزرگ است که نشان دهنده تاثیر آنها بر نتایج می‌باشد. همچنین مقدار خطا در این آزمایش بسیار کوچک است، که نشان می‌دهد نتایج به‌دست آمده قابل اطمینان و معتبر می‌باشد.



شکل ۴- تأثیر فاکتورهای مختلف بر میزان تولید پروتئین قارچ 2E

Fig. 4- Effect of various factors on production rate of fungus protein 2E

جدول ۲- نتایج به دست آمده از طریق ANOVA

Table 2- Results obtained through ANOVA

p-value	F- value	Mean square	df	Sum of squares	source
$1/24E-07$	811/2	$0/292034$	1	$0/292034$	دور همزن
$2/21E-07$	668/352	$0/240608$	1	$0/240608$	الفاکننده
$5/91E-07$	480	$0/72801$	1	$0/72801$	مایه تلقیح
$1/10E-06$	388/8	$0/139969$	1	$0/139969$	آمونیم
$1/18E-06$	380/208	$0/136876$	1	$0/136876$	pH
$0/00059$	43/2	$0/015552$	1	$0/015552$	دما
$0/07099$	4/8	$0/001728$	1	$0/001728$	ماده معدنی

گلوز	۰/۰۰۰۴۳۲	۱	۰/۰۰۰۴۳۲	۱/۲	۰/۳۱۵۳۳
خطا	۰/۰۰۰۲۱۶	۶	۰/۰۰۰۳۶	-	-

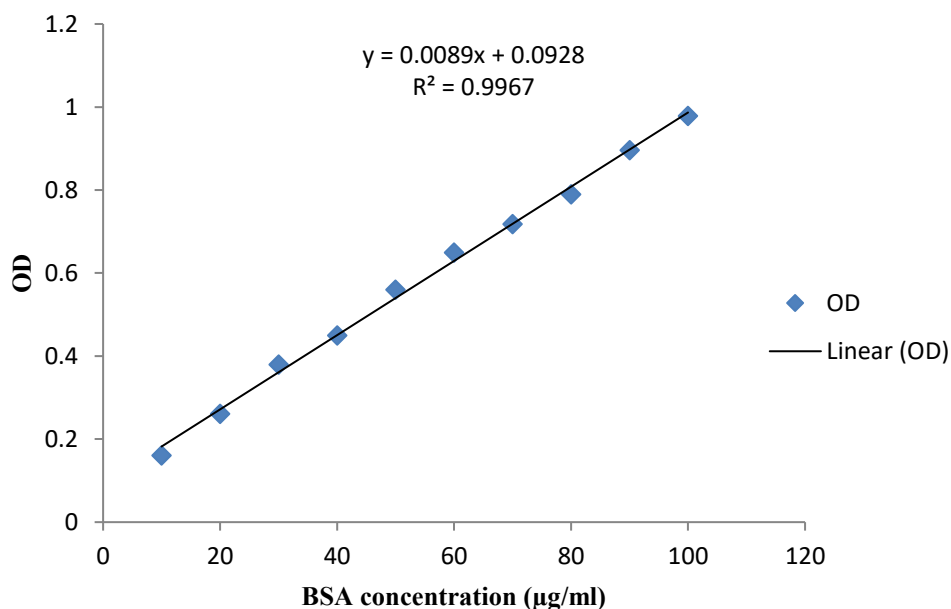
محققان به این نتیجه رسیده‌اند که منبع نیتروژن نقش حیاتی در سنتز زیست توده و تولید متابولیت‌های ثانویه دارند. افزایش سطح نیتروژن باعث افزایش زیست توده و در نتیجه فعالیت آنزیم می‌شود (Kumar *et al.*, 2016). در مطالعه دیگری مشخص شد که برهمکنش بین دما و عصاره قارچی و نیز دما و همزدن نیز اثرات معنی‌داری داشت (Niladevi *et al.*, 2009). همزدن نقش مهمی را در فرآیندهای آنزیمی دارد. نه تنها انتقال جرم و اکسیژن را بین فازهای مختلف بهبود می‌بخشد، بلکه با اختلاط مداوم، شرایط شیمیایی و فیزیکی همگن را در محیط حفظ می‌کند. نتایج حاکی از آن است که در محدوده دمایی بهینه، به علت بالا بودن نیازهای انتقال جرم و اکسیژن و با افزایش هم زدن، رشد افزایش می‌یابد و در نتیجه تولید آنزیم بیشتر می‌شود (Zhou *et al.*, 2018). نرخ بالاتر هم زدن شرایط هوادهی و اختلاط بهتر را فراهم می‌کند و در نتیجه رشد و تولید آنزیم را افزایش می‌دهد. تأثیر نرخ همزدگی بالاتر بر تولید لاکاز از گونه‌های دیگر استرپتومایسس نیز قبلاً گزارش شده است (Arias *et al.*, 2003).

در پژوهشی مشاهده شد کنترل pH برای تولید آنزیم لاکاز تأثیرگذار است. در طی تخمیرهای بدون کنترل pH و با غلظت گلوز ۹ گرم در لیتر، مشاهده شد که pH به سرعت کاهش یافت که همزمان با کاهش گلوز بود و پس از آن pH دوباره افزایش یافت. مقالات نشان می‌دهند که اسیدهای آلی مانند ملات، اگزالات، فومارات و گلیوکسالات در طی تخمیر *T. versicolor* تولید می‌شوند که مسئول افت pH هستند (Tavares *et al.*, 2006). مقادیر pH پایین محیط کشت برای تولید لاکاز توسط قارچ مطلوب نیست. دو توضیح برای این وجود دارد: متابولیسم سنتز لاکاز در مقادیر pH پایین سرکوب می‌شود یا تغییرات ساختاری در ساختار سه بعدی آنزیم توسط مقادیر pH پایین افزایش می‌یابد که بر جایگاه فعال تأثیر می‌گذارد و اجازه واکنش‌های بیوکاتالیستی را نمی‌دهد (Tavares, Coelho *et al.*, 2006). افزایش فعالیت لاکاز در حضور CuSO_4 به این دلیل است که مس به‌عنوان یک القاکنده قوی لاکاز در قارچ‌های پوسیدگی سفید عمل می‌کند. لاکازها به گروه اکسیدازهای مس آبی تعلق دارند و فراوان‌ترین اعضای خانواده پروتئین‌های چند مسی هستند (Gomaa & Momtaz, 2015). بر اساس مطالعات انجام شده نتایج این پژوهش بر قارچ مورد مطالعه با پژوهش‌های مشابه همخوانی دارد و اهمیت فاکتورهای مذکور در بسیاری از مقالات ذکر شده است. القاکنده‌ها همواره به‌عنوان عاملی مهم در افزایش

تولید آنزیم‌ها مدنظر قرار گرفته‌اند، در خصوص قارچ مورد مطالعه، اهمیت اثر همزدن در تولید آنزیم‌های لیگنینولایتیک می‌تواند بر توانمندی صنعتی تولید این آنزیم‌ها بیفزاید و به‌عنوان عاملی مهم مدنظر قرار گیرد.

محاسبه غلظت پروتئین و رسم منحنی استاندارد

برای محاسبه غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد و میانگین غلظت پروتئین‌ها با توجه به آزمایش‌های پیشنهادی نرم‌افزار Minitab 22.2.1 محاسبه شد که نتایج در شکل‌های (۵ و ۶) ارائه شده است.



شکل ۵- نمودار منحنی استاندارد

Fig. 5- Standard curve diagram



شکل ۶- میزان غلظت پروتئین در قارچ منتخب در محیط کشت پایه برنامه طراحی شده توسط نرم افزار Minitab

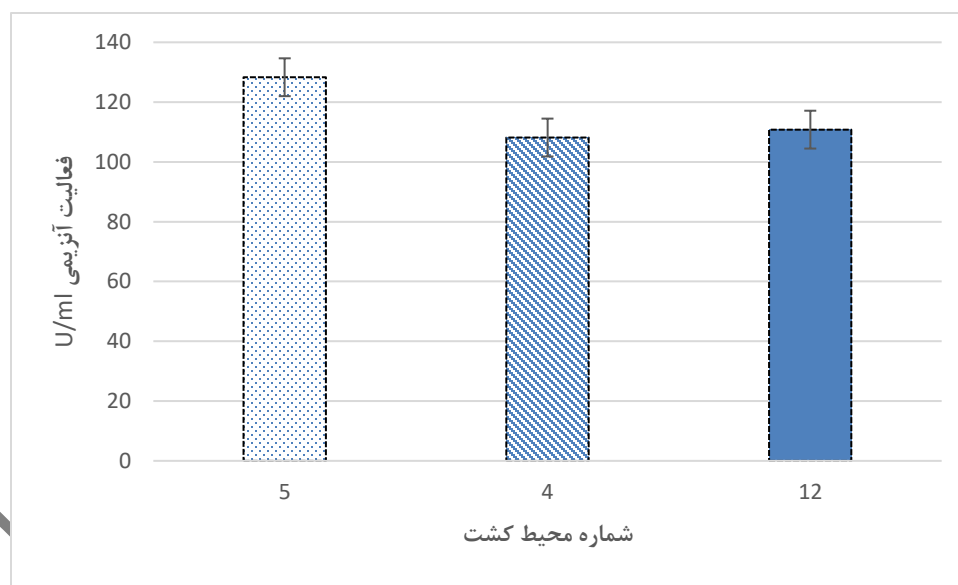
22.2.1

Fig. 6- Protein concentration in selected fungus in basic culture medium method designed by Minitab 22.2.1 software.

همان طور که در شکل ۶ مشاهده می شود، محیط شماره ۵ بالاترین غلظت پروتئین را نشان داد و سه محیط ۴، ۵ و ۱۲ با بالاترین غلظت پروتئین ها مورد بررسی فعالیت آنزیمی قرار گرفتند. میزان غلظت پروتئین هر یک از محیط هایی که با نرم افزار Minitab 22.1 مشخص شده بود تعیین شد که بیشترین غلظت پروتئین قارچ E۲ در محیط ۵ شامل گلوکز ۵ گرم در لیتر، آمونیوم سولفات ۰/۰۲ گرم در لیتر، سولفات مس ۰/۱ میلی مولار و ۴٪ نفت سفید، pH=۷، دما ۳۰ درجه سانتی گراد، ۱۵ میلی لیتر مایه تلقیح و سرعت همزنی 150 rpm به دست آمد. در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۲ انجام شد، محققان نشان دادند که با بهینه سازی ۸ متغیر با استفاده از طراحی مرکب مرکزی و پلاکت برمن در محیط کشت حداقل *Aspergillus* sp. HB_RZ4 بیشترین مقدار لاکاز خارج سلولی را تولید کرد (Manimozhi & Kaviyarasan, 2012). آنها نشان دادند که دمای ۳۴ درجه سانتی گراد، ۲/۱ گرم در لیتر گلوکز (منبع کربن)، ۲/۵ گرم در لیتر عصاره مخمر (منبع نیتروژن) و ۰/۰۰۲۵ گرم در لیتر سولفات مس (القاکننده)، pH=۶ مقادیر بهینه ای بودند که حداکثر لاکاز را به دست آوردند (Bhamare et al., 2018).

بررسی فعالیت آنزیم های لیگنینولایتیک

جهت اطمینان از تولید بیشتر آنزیم‌های مورد مطالعه در محیط با مقدار پروتئین بیشتر، میزان فعالیت هر یک از آنزیم‌های لیگنینولایتیکی در نمونه‌هایی که میزان بالای غلظت پروتئین (محیط‌های ۵، ۴ و ۱۲) را داشتند مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی از سوپرناتانت حاوی آنزیم‌های لیگنینولایتیک استفاده شد. فعالیت بیشتر آنزیم‌های لیگنینولایتیک در محیط با مقدار بالاتر غلظت پروتئین استفاده از محیط ۵ را برای ادامه بررسی تأیید کرد. برای تعیین میزان فعالیت آنزیم لاکاز، تغییرات جذب در طی زمان در طول موج ۴۲۰ نانومتر ثبت شد و مقدار میکرو مول سوبسترای که به محصول تبدیل شده بود، محاسبه و مقدار فعالیت آنزیم لاکاز در محیط ۵ که بالاترین میزان فعالیت را نسبت به محیط ۴ و ۱۲ داشت (شکل ۷)، U/ml ۱۲۸/۳۲ به دست آمد. همچنین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز محاسبه در محیط ۵ نسبت به سایر محیط‌های مذکور بالاتر بود و در طول موج ۵۹۵ نانومتر مقدار آن، U/ml ۵۹/۴ محاسبه شد. نتایج نشان می‌دهد میزان تولید پروتئین با تولید آنزیم‌های لیگنینولایتیک رابطه مستقیم دارد.



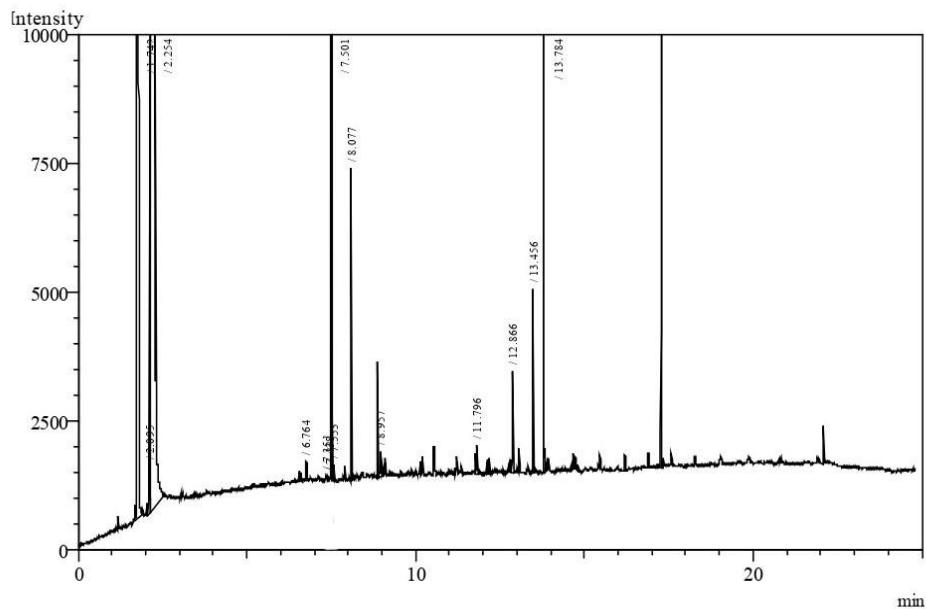
شکل ۷ - نمودار فعالیت آنزیم لاکاز در محیط‌های کشت مختلف

Fig. 7- Enzyme activity diagram in different culture media

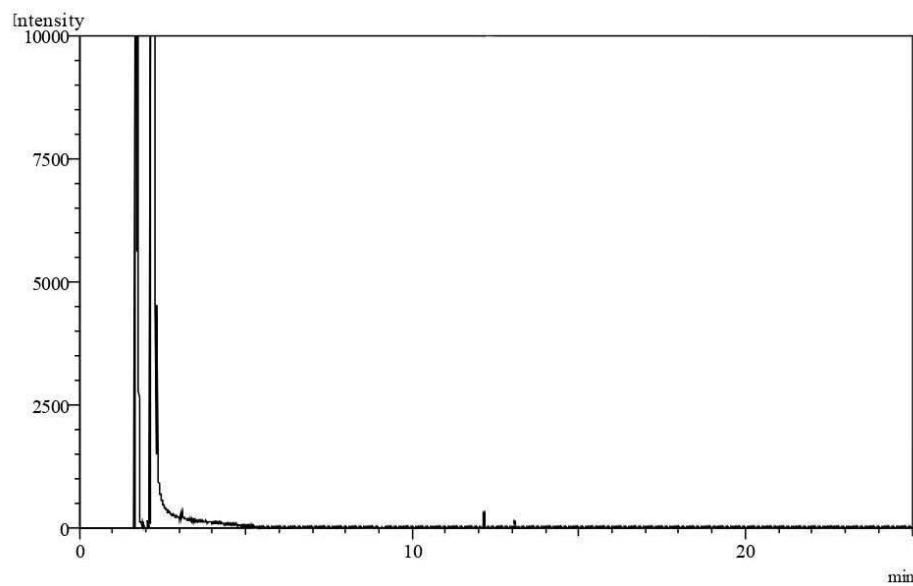
نتایج بررسی توانایی آنزیم‌های لیگنینولایتیک در شکست ترکیبات نفتی

نتایج آنالیز کروماتوگرام در مورد ترکیبات نفت خام نشان داد که آنزیم‌ها در محیط بافری ۵ توانایی شکست ترکیبات نفتی را داشته و موجب تجزیه ترکیبات نفتی موجود در نفت خام شده‌اند (شکل ۸).

الف



ب



شکل ۸- کروماتوگرام باقیمانده ترکیبات نفت خام در محیط بافری ۵-الف) نمونه شاهد ب) نمونه همراه با آنزیم‌های

لیگنینولایتیک

Fig. 8- Chromatogram of residual crude oil compounds in buffer medium 5 - a) Control sample b) Sample with ligninolytic enzymes

میزان پاک‌سازی مناسبی در عملکرد آنزیم‌های لیگنینولایتیک با خلوص نسبی در محیط بافری ۵ برای تجزیه ترکیبات نفتی موجود در نفت خام مشاهده شد. بر اساس سطح زیر نمودار در کروماتوگرام کروماتوگرافی گازی، تجزیه آنزیمی نفت خام در محیط بافری ۵، میزان $2.17 \pm 88/3$ درصد محاسبه شد.

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۸ انجام شد، محققان با استفاده از *Fusarium neocosmosporiellum* ۵۸ درصد هیدروکربن‌ها را در محیط حداقل تجزیه کردند. علاوه بر این، تجزیه و تحلیل باقیمانده نفت خام با طیف سنجی فروسرخ تبدیل فوریه نشان داد که این سویه قادر به تجزیه ۵۰ درصد از ترکیبات آلیفاتیک است. برای بررسی مکانیسم تخریب، آنزیم‌های اکسیداز مورد سنجش قرار گرفتند و مشخص شد که *F. neocosmosporiellum* می‌تواند لاکاز تولید کند (Azin et al., 2018). همچنین در مطالعه دیگری، از باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت همراه با قارچ‌های پوسیدگی سفید برای اصلاح خاک‌های آلوده به نفت استفاده شد که دارای نرخ تخریب 5.55 ± 57.72 درصد پس از ۳۰ روز تیمار بود. در این سیستم، باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت همراه با قارچ‌های پوسیدگی سفید برای اصلاح خاک‌های آلوده به نفت استفاده شدند. قارچ‌های پوسیدگی سفید به جای اسپری کردن سوسپانسیون قارچی، از طریق تخمیر حالت جامد (SSF) ابتدا یک ماده اصلاحی تشکیل دادند که می‌توانست به طور مداوم آنزیم‌های کلیدی را تحت تحریک ویژه ترشح کند (Liu et al., 2017). با توجه به نتایج تجزیه‌کنندگی بسیار بالای قارچ مورد مطالعه استفاده از ترکیب قارچ و باکتری‌های تجزیه‌کننده نفت به صورت کنسرسیوم می‌تواند سبب افزایش عملکرد تجزیه زیستی شود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه هدف بهینه‌سازی تولید آنزیم‌های لیگنینولایتیک برای استفاده در تجزیه زیستی ترکیبات نفتی بوده است. در این راستا اثبات تولید آنزیم‌های لاکاز، منگنز پراکسیداز و لیگنین پراکسیداز انجام شد و پس از طراحی آزمایش بهینه‌سازی با متغیرهای مختلف انجام شد. دور همزن و القاکننده بیشترین اثر در تولید پروتئین را داشتند. محیط شامل گلوکز ۵ گرم در لیتر، آمونیوم سولفات ۰/۲ گرم در لیتر، سولفات مس ۰/۱ میلی‌مولار و ۴٪ نفت خام (حجمی/حجمی)، $pH=7$ ، دما ۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ میلی‌لیتر مایه تلقیح و سرعت همزنی ۱۵۰ rpm، به‌عنوان بهترین محیط در تولید آنزیم‌های لیگنینولایتیک با سنجش فعالیت آنزیمی با روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. میزان فعالیت آنزیمی به ترتیب برای لاکاز U/ml و پراکسیدازها ۱۲۸/۳۲ و ۵۹/۴ U/ml محاسبه شد. پس از کشت قارچ در محیط بهینه سوپرناتانت تغلیظ و جهت تجزیه ترکیبات نفتی استفاده شد. بر اساس نتایج کروماتوگرافی گازی میزان تجزیه نفت خام $2.17 \pm 88/3$ درصد محاسبه

شد. امید است استفاده از آنزیم‌های تجزیه‌کننده نفت به‌عنوان روشی دوستدار محیط‌زیست مسیر نوینی برای رفع آلودگی‌های نفتی باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از سازمان جهاد دانشگاهی به دلیل حمایت مالی از این پژوهش کمال سپاس را دارند و همواره قدردان همکاران محترم در پژوهش‌کنده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی شهید بهشتی که در پیشبرد این پژوهش همراهی کردند، هستند.

پی‌نوشت

- ¹ Resource Conservation and Recovery Act
- ² Hydroxyphenyl benzothiazole
- ³ 2,2'-Azinobis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate)
- ⁴ Sabouraud Dextrose Agar
- ⁵ Bovin Serum Albumin

منابع

- Agrawal, Verma, Singh, & Shahi. (2017). Ligninolytic enzyme production by white rot fungi *Podoscypha elegans* strain FTG4. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 6(5), 2757-2764.
- Ahlbrandt. (2002). Future petroleum energy resources of the world. *International Geology Review*, 44(12), 1092-1104.
- Archibald. (1992). A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(9), 3110-3116.
- Arias, Arenas, Rodríguez, Soliveri, Ball, & Hernández. (2003). Kraft pulp biobleaching and mediated oxidation of a nonphenolic substrate by laccase from *Streptomyces cyaneus* CECT 3335. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 1953-1958.

- Asemoloye, Tosi, Daccò, Wang, Xu, Marchisio, Pecoraro. (2020). Hydrocarbon degradation and enzyme activities of *Aspergillus oryzae* and *Mucor irregularis* isolated from nigerian crude oil-polluted sites. *Microorganisms*, 8(12), 1912.
- Azin, Moghimi, & Heidarytabar. (2018). Petroleum degradation, biosurfactant and laccase production by *Fusarium neocosmosporiellum* RH-10: a microcosm study. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 27(4), 329-342.
- Bai, Song, Liu, Mohamed, Mou, & Liu. (2019). Health risk assessment of groundwater contaminated by oil pollutants based on numerical modeling. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(18), 3245.
- Bhamare, Jadhav, & Sayyed. (2018). Statistical optimization for enhanced production of extracellular laccase from *Aspergillus* sp. HB_RZ4 isolated from bark scrapping. *Environmental Sustainability*, 1(2), 159-166.
- Bogan, Schoenike, Lamar, & Cullen. (1996). Manganese peroxidase mRNA and enzyme activity levels during bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil with *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(7), 2381-2386.
- Bradford. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Davoodi. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. *Veterinary Histobiology*, 5(1). Retrieved from https://journals.iau.ir/article_534577.html?lang=en
- Forootanfar, Rezaei, Zeinvand-Lorestani, Tahmasbi, Mogharabi, Ameri, & Faramarzi. (2016). Studies on the laccase-mediated decolorization, kinetic, and microtoxicity of some synthetic azo dyes. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 14, 1-9.
- Gomaa, & Momtaz. (2015). Copper induction and differential expression of laccase in *Aspergillus flavus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 285-292.
- Hall, Davis, Schwartz, Bryson, & McCrum. (2001). *RCRA hazardous wastes handbook*: Government Institutes.
- Hammel, Green, & Gai. (1991). Ring fission of anthracene by a eukaryote. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(23), 10605-10608.

- Hess, Leitner, Galhaup, Kulbe, Hinterstoisser, Steinwender, & Haltrich. (2002). *Enhanced formation of extracellular laccase activity by the white-rot fungus Trametes multicolor*. Biotechnology for Fuels and Chemicals: The Twenty–Third Symposium.
- Illuri, Kumar, Eyini, Veeramanikandan, Almaary, Elbadawi, Balaji. (2021). Production, partial purification and characterization of ligninolytic enzymes from selected basidiomycetes mushroom fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 7207-7218.
- Johannes, Majcherczyk, & Hüttermann. (1996). Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46, 313-317.
- Kudo, Harada, Kubota, Sasaki, & Kaneta. (2017). Simultaneous determination of manganese peroxidase and lignin peroxidase by capillary electrophoresis enzyme assays. *ACS omega*, 2(10), 7329-7333.
- Kumar, Kaur, Jain, & Kumar. (2016). Optimization of laccase production from *Aspergillus flavus* by design of experiment technique: Partial purification and characterization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 14(1), 125-131.
- Liu, Liu, Ju, Li, & Wang. (2017). Bacteria-white-rot fungi joint remediation of petroleum-contaminated soil based on sustained-release of laccase. *RSC Advances*, 7(62), 39075-39081.
- Manimozhi, & Kaviyaran. (2012). Screening the effect of nutritional parameters on biomass and laccase production in submerged medium by litter decomposing basidiomycete *Agaricus heterocystis*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(3), 592-599.
- Meng, Li, Bao, & Sun. (2018). Promoting the treatment of crude oil alkane pollution through the study of enzyme activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 708-716.
- Moen, & Hammel. (1994). Lipid peroxidation by the manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* is the basis for phenanthrene oxidation by the intact fungus. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6), 1956-1961.
- Niladevi, Sukumaran, Jacob, Anisha, & Prema. (2009). Optimization of laccase production from a novel strain—*Streptomyces psammoticus* using response surface methodology. *Microbiological Research*, 164(1), 105-113.

- Pourfakhraei, Badraghi, Mamashli, Nazari, & Saboury. (2018). Biodegradation of asphaltene and petroleum compounds by a highly potent *Daedaleopsis* sp. *Journal of Basic Microbiology*, 58(7), 609-622.
- Reddy, & Kanwal. (2022). Influence of carbon, nitrogen sources, inducers, and substrates on lignocellulolytic enzyme activities of *Morchella spongiosa*. *Journal of Agriculture and Food Research*, 7, 100271.
- Rojo. (2009). Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental microbiology*, 11(10), 2477-2490.
- Shahbazi, & Mehrjoo. (2014). Sources of groundwater pollution and remediation methods. *Human & Environment*, 11(2). Retrieved from <https://civilica.com/doc/1871878>
- Singh Tomar, & Jajoo. (2013). A quick investigation of the detrimental effects of environmental pollutant polycyclic aromatic hydrocarbon fluoranthene on the photosynthetic efficiency of wheat (*Triticum aestivum*). *Ecotoxicology*, 22, 1313-1318.
- Tavares, Coelho, Agapito, Coutinho, & Xavier. (2006). Optimization and modeling of laccase production by *Trametes versicolor* in a bioreactor using statistical experimental design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 134, 233-248.
- Umar. (2021). Screening and evaluation of laccase produced by different *Trichoderma* species along with their phylogenetic relationship. *Archives of Microbiology*, 203(7), 4319-4327.
- Varjani. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223, 277-286.
- Wang, & Shao. (2013). Enzymes and genes involved in aerobic alkane degradation. *Frontiers in Microbiology*, 4, 116.
- Zhang, He, Liu, Guo, Ren, Gao, & Wen. (2013). Statistical optimization of medium components for milk-clotting enzyme production by *Bacillus amyloliquefaciens* D4 using wheat bran-an agro-industry waste. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(8), 1084-1091.
- Zhou, Han, He, Sang, Yu, Feng, & Zhang. (2018). Effects of agitation, aeration and temperature on production of a novel glycoprotein GP-1 by *Streptomyces kanasensis* ZX01 and scale-up based on volumetric oxygen transfer coefficient. *Molecules*, 23(1), 125.

نسخه پیش از انتشار