



<https://bjm.ui.ac.ir/?lang=en>

Journal of Microbial Biology

E-ISSN: 3060-7647

14<sup>th</sup> Year, Vol. 14, No. 54, 2025 pp. 83-104

Received: 05/09/2025 Accepted: 26/10/2025

**Research Paper**

## Isolation, Screening, and Optimization of Laccase Production from Yeast: A Novel Approach in the Synthesis of Bioactive Hydrogels

**Soheila Abbasi** 

Department of Cellular and Molecular Microbiology, Faculty of Biological Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan.

[Soheila522003@yahoo.com](mailto:Soheila522003@yahoo.com)

**Fariba Esmaili**

Department of Plant and Animal Biology, Faculty of Biological Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

[esmail\\_far@yahoo.com](mailto:esmail_far@yahoo.com)

**Zahara Ghazavi Fatemeh**

Department of Cellular and Molecular Microbiology, Faculty of Biological Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan,

[laya.ghazavi@yahoo.com](mailto:laya.ghazavi@yahoo.com)

### Abstract

Laccases are a diverse group of multicopper oxidases that catalyze the oxidation of a wide range of aromatic compounds. These enzymes act on various phenolic and non-phenolic, as well as inorganic substrates. Owing to their strong oxidative potential, laccases are capable of degrading highly recalcitrant compounds, thereby playing a crucial role in pollutant removal. They are widely distributed in nature, occurring in numerous plants, fungi, bacteria, and even some insects. Environmental samples were cultured on yeast extract–glucose agar, and the isolated yeast strains were subjected to qualitative screening using guaiacol, ABTS, acetaminophen, and catechol as indicator substrates. A high potential laccase-producing strain was selected through quantitative assays. Culture conditions were optimized with respect to temperature, carbon source, and nitrogen source. The enzyme was subsequently purified and applied to the preparation of chitosan/gelatin hydrogels containing *Kochia scoparia* extract. Following qualitative and quantitative screening, the strain *Rhodotorula mucilaginosa* ASAA1404 was identified as the superior producer, with a laccase activity of 50.6 IU/L. Glucose and yeast extract were found to be the most effective carbon and nitrogen sources, respectively, and the optimal cultivation temperature was 25 °C. The resulting hydrogels exhibited notable antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. This study demonstrates that laccase production by yeast and its incorporation within biocompatible hydrogel matrices represent a novel and sustainable strategy for developing advanced systems in biotechnology, medicine, and environmental applications.

**Keywords:** Laccase, Oxidation, Hydrogel, Yeast, Antibacterial.

---

<sup>1</sup>Corresponding Author  
[3060-7647](mailto:3060-7647) / © 2025 The Authors

This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Abbasi, S., Esmaili, F., ghazavi, F. Z. Isolation, screening, and optimization of laccase enzyme production from yeast and its use as a novel step in the synthesis of bioactive hydrogels. *Journal of Microbial Biology*, 2025; 14(54): 83-104. doi: 10.22108/bjm.2025.146566.1650



## Introduction

Laccases are one of the oldest and most well-known members of the multicopper protein family, known as benzenediol:oxygen oxidoreductases. They are model enzymes for multicopper oxidases and participate in cross-linking monomers, degrading polymers, and cleaving aromatic compounds. They represent the simplest enzymes that combine all three types of oxidized copper (II) centers within a single molecule.

One application of laccase enzymes is their use in the preparation of hydrogels for wound dressings, particularly for chronic wounds. Chitosan and collagen, or gelatin-based dressings are typically produced in hydrogel form, adhering to the accepted concept of moist wound healing. The stability of dressings for chronic wounds can be compromised due to the need for infrequent yet repeated replacement. Therefore, these hydrogels must possess biological stability and mechanical strength, which can be achieved through additional cross-linking.

To this end, various chemical cross-linkers have been used; however, their cytotoxicity makes them unsuitable for biomedical applications. The search for natural and safe cross-linking agents has led to the use of plant polyphenols, such as proanthocyanidins and hydrolyzable tannins, due to their low cytotoxicity, among other reasons, for stabilizing carbohydrate–protein systems. *Kochia scoparia* seed polyphenols, known as potent antioxidants, serve as an example.

The aim of this study was to isolate and screen yeast strains producing laccase, optimize the top-performing strain, analyze the produced enzyme, and utilize it for the fabrication of hydrogel dressings for chronic wounds. These dressings were designed to contain chitosan, gelatin, and natural phenolics cross-linked by laccase to obtain bioactive and biostable materials with adjustable physicochemical and mechanical and functional properties.

## Materials and Methods

Yeasts isolated for this study were obtained from Isfahan Zoo waste and decaying wood in Kuh-e Soffeh Park, Isfahan. Samples were collected in sterile containers and transported to the laboratory for further processing. Samples from the aforementioned sources were inoculated onto plates of yeast extract–glucose agar, YGA medium and incubated aerobically at 30 °C for 48 hours. Representative yeast colonies were randomly selected and subcultured 2-3 times on sterile YGA plates to obtain pure isolates. The obtained yeast isolates were qualitatively screened on yeast extract–peptone–dextrose, YPD agar medium containing the indicator compounds 0.5% (w/v) guaiacol, ABTS, acetaminophen, and 0.02% (w/v) catechol.

Laccase assay was performed using a modified method by Moncultunaroc et al. (2012). This method involved the spectrophotometric measurement of ABTS oxidation at 30 °C. Oxidation was monitored by the increase in absorbance at 420 nm, compared to a standard laccase (50 U/mL), using a UV/VIS spectrophotometer. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme oxidizing 1 mmol of ABTS per minute. A growth curve was plotted for the best isolate, selected based on quantitative and qualitative screening results as it exhibited the highest laccase production potential.

Optimization of laccase production was performed in the aforementioned yeast culture medium using different carbon sources (glucose, sucrose) and agricultural products such as *Kochia* seeds, molasses, iris leaves, green tea, cocoa, and whey at a concentration of 1% (w/v), along with various nitrogen sources including peptone, yeast extract, ammonium sulfate, sodium nitrate, and potassium nitrate. Different incubation temperatures (25, 30, 35, and 37 °C) were also tested. The medium was inoculated with 1 mL of a 48-hour yeast culture and incubated at the same temperature. After 72 hours, the amount of laccase produced in each medium was measured.

Laccase enzyme purification was carried out according to the method of Ding et al. (2012). Crude laccase was purified using ammonium sulfate precipitation. Polyphenols were extracted from *Kochia scoparia* seeds using water and ethanol solvents. Since the ethanol extraction method yielded better results, it was used in subsequent stages. Chitosan and gelatin solutions were mixed at a 2:3 (w/w) ratio at room temperature overnight. Subsequently, 20 mL of the extracted *Kochia* solution was added to 75 mL of the previously prepared chitosan-gelatin mixture (2:3 w/w). The cross-linking reaction was initiated by adding 15 mL of laccase solution (10 units/mL) and continued for a specified period of 24 hours at 45 °C under constant stirring. The enzymatic reaction was terminated by heating at 100 °C for 2 minutes, and the resulting mixture were frozen and freeze-dried at -20 °C.

Scanning Electron Microscopy (SEM) micrographs of the hydrogels were prepared at  $\times 25$  magnification. The antimicrobial activity of the enzymatically synthesized hydrogels was evaluated against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*.

## Results

A total of 22 laccase-producing yeast strains were isolated from the samples. The qualitative screening results for laccase production by these 22 yeasts, isolated from various sample sources, were examined for growth and laccase production on screening media containing catechol, guaiacol, acetaminophen, and ABTS. Isolates showing no response to the substrates or only a weak response to a single substrate were discarded. Only isolate F12 showed the most positive response to all substrates. The results of the quantitative screening of yeast isolates, measuring laccase activity using 1 mM ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), showed that yeast isolates F12 and F14 had the highest activity at 50.6 U/L, followed by isolate F11 (47.9 U/L). The lowest activity was observed in isolate F1 with a value of 24 U/L. Based on the qualitative and quantitative screening results, isolate F12, which had higher growth and laccase activity, was selected as the superior isolate for further studies. F12 was isolated from zoo waste. Isolate F12 was identified based on morphological, microscopic, and physiological characteristics. The colony morphology of isolate F12 on PDA medium was creamy and raised. The microscopic shape of the isolate was shown in the corresponding figure. The sugar fermentation pattern of isolate F12 showed that this yeast could ferment sorbitol, maltose, mannitol, trehalose, glucose, and galactose, but was unable to ferment xylose.

Based on a BLAST search of the complete ITS region sequence, the yeast strain used for F12 showed the highest similarity (90%) with strain ASAA1404 of *Rhodotorula mucilaginosa*. The sequence of the yeast isolate was deposited in the GenBank database with the accession number SUB15519713. Figure 3 shows the phylogenetic tree of the superior strain. Growth and laccase-producing enzyme activity were monitored for up to 216 hours. The correlation between the growth curve and laccase production showed that the maximum enzyme production occurred during the logarithmic and stationary phases. The yeast isolate *Rhodotorula mucilaginosa* ASAA1404 exhibited its highest laccase activity in glucose (50.34 U/L), its maximum activity with yeast extract (50.18 U/L), and its highest laccase activity at 30 °C (60.02 U/L).

The results of laccase purification from *Rhodotorula mucilaginosa* ASAA1404 and its effect on total protein content and total laccase activity are shown. The total protein content decreased from 0.452 mg/mL to 0.160 mg/mL at each purification stage, subsequently increasing the specific activity of the enzyme. Scanning Electron Microscopy (SEM) micrographs of the chitosan and gelatin hydrogels with freeze-dried *Kochia* seeds revealed porous structures with varying pore sizes and shapes, depending on the cross-link density (enzymatic reaction time). The antimicrobial activity of the enzymatically synthesized hydrogels against the Gram-positive bacteria *S. aureus* and *L. monocytogenes* and the Gram-negative bacterium *E. coli* was demonstrated. The hydrogels inhibited the growth of all three strains after 24 hours of incubation.

## Discussion and Conclusion

The yeast isolates with the best laccase potential in this work were isolated from zoo waste. The yeasts showed diversity in their response to several indicator compounds, which is consistent with the report by Baldarian (2004). This can be attributed to a preferential tendency towards different substrate groups (ortho- and para-diphenols). The formation of a dark brown color in positive microbes was due to the reactive quinone product generated during the reaction, which often spontaneously polymerizes to form dark brown or black melanoid pigments. This research investigated and optimized the feasibility of producing laccase enzyme from yeast as a cost-effective and efficient biological source. The initial screening results showed that the selected yeast strains were capable of producing laccase with a significant level of enzymatic activity. This finding aligns with previous studies that have reported yeasts such as *Yarrowia lipolytica* and *Pichia pastoris* as potential laccase producers. Optimizing the culture conditions led to a significant increase in laccase production yield. Key factors, including the type and concentration of carbon and nitrogen sources, as well as incubation temperature, were identified as effective parameters. The optimal conditions resulted in an approximately 2-3-fold increase in enzyme activity compared to control conditions, indicating the direct influence of these factors on enzyme expression and stability in the environment.

In the second part of the study, the produced laccase was used as a biocatalytic agent in hydrogel synthesis. The use of laccase in the cross-linking reaction of polymers such as polyvinyl alcohol and derivative polysaccharides led to the formation of stable and uniform three-dimensional networks. Evaluation of the physicochemical properties of the hydrogels, including swelling degree, mechanical stability, cell biocompatibility, and controlled release capability, showed that the final product possessed desirable properties and had the potential for use in drug delivery systems or tissue engineering.

A comparison of these results with similar studies indicates that using yeast laccase instead of fungal laccase may offer advantages in terms of production cost, growth time, and biological safety. Furthermore, laccase-based biocatalytic processes reduce the need for harsh reaction conditions, providing a green and sustainable approach to the synthesis of biomaterials. However, challenges such as complete enzyme purification, long-term stability of the hydrogel in a physiological environment, and *in vivo* toxicity studies remain, requiring more extensive research and development at both pilot and industrial scales. Additionally, engineering yeast strains through molecular methods could improve laccase gene expression and increase enzymatic activity.

## جداسازی، غربال‌گری و بهینه‌سازی تولید آنزیم لاکاز از مخمر و استفاده از آن به‌عنوان گامی نوین در سنتز هیدروژل‌های زیست‌فعال

سهیلا عباسی

گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، ایران.  
Soheila522003@yahoo.com

فریبا اسماعیلی

گروه زیست‌شناسی گیاهی و جانوری، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، ایران.  
esmail\_far@yahoo.com

فاطمه زهرا قضاوی

گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، ایران.  
laya.ghazavi@yahoo.com

### چکیده

لاکازها گروه متنوعی از اکسیدازهای چند مسی هستند که اکسیداسیون انواع ترکیبات آروماتیک را کاتالیز می‌کنند. این آنزیم طیف وسیعی از سوبستراهای فنلی و نیز سوبستراهای غیرفنلی و غیرآلی را اکسید می‌کند. این آنزیم به‌علت قدرت اکسیدکنندگی بالا می‌تواند ترکیبات بسیار سخت تجزیه‌پذیر را تجزیه کند و در حذف آلاینده‌ها نقش داشته باشد. لاکاز در طبیعت به‌طور وسیع پراکنده است؛ به‌طوری‌که در بسیاری از گیاهان آلی، قارچ‌ها باکتری‌ها و حتی در بعضی از حشرات دیده شده است. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده روی محیط کشت عصاره مخمر گلوکز آگار کشت داده شد و مخمرهای رشدیافته جداسازی شدند. با غربالگری کیفی روی ترکیبات شاخص گایاکول، ABTS، استامینوفن و کاتکول و غربالگری کمی سویه برتر با پتانسیل بالای تولید لاکاز انتخاب و شرایط کشت از لحاظ دما، منبع کربن و منبع نیتروژن بهینه‌سازی شد. آنزیم به‌دست آمده، خالص‌سازی و در تهیه هیدروژل کیتوزان و ژلاتین با عصاره تخم جارو استفاده شد. پس از جداسازی و غربالگری کمی و کیفی سویه رودوتورولا موسیلاژینوزا/ASAA1404 با فعالیت آنزیم برابر ۵۰/۶ IU/mL به‌عنوان سویه برتر شناخته شد. گلوکز به‌عنوان بهترین منبع کربن فعالیت لاکاز (۵۰/۳۴ IU/mL)، عصاره مخمر به‌عنوان منبع نیتروژن (۵۰/۱۸ IU/mL) و دمای مناسب ۲۵ درجه سانتی‌گراد (۶۰/۰۲ IU/mL) بود. هیدروژل‌ها دارای فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس آرتوس (ZOI=۱۵ mm)، لیستریا مونوسیژنوزنز (ZOI=۵ mm) و اشیریشیا کوللی (ZOI=۲۰ mm) بودند. این تحقیق نشان می‌دهد تولید لاکاز از منابع مخمری و به‌کارگیری آن در ساخت هیدروژل‌های زیست‌سازگار، رویکردی نوین و پایدار برای توسعه سامانه‌های نوظهور در حوزه‌های زیست‌فناوری، پزشکی و محیط زیست محسوب می‌شود.

واژه‌های کلیدی: لاکاز، اکسیداسیون، هیدروژل، مخمر، ضدباکتریایی

\* نویسنده مسئول مکاتبات

عباسی، سهیلا، اسماعیلی، فریبا، قضاوی، فاطمه زهرا. جداسازی، غربال‌گری و بهینه‌سازی تولید آنزیم لاکاز از مخمر و استفاده از آن به‌عنوان گامی نوین در سنتز هیدروژل‌های زیست‌فعال. زیست‌شناسی میکروبی، ۱۴۰۴؛ ۱۴(۵۴): ۸۳-۱۰۴. doi: 10.22108/bjm.2025.146566.1650



## مقدمه

لاکازها یکی از قدیمی‌ترین و شناخته‌شده‌ترین اعضای خانواده پروتئین چند مسی هستند که به‌عنوان بنزن دیول اکسیژن اکسیدوردوکناز شناخته می‌شوند. آنها آنزیم‌های مدل اکسیدازهای چند مسی هستند که در اتصال عرضی مونومرها، تخریب پلیمرها و برش ترکیبات آروماتیک شرکت می‌کنند (۱). ساده‌ترین آنزیمی است که هر سه رزونانس آلی مس (II) را در یک مولکول ترکیب می‌کند.

آنزیم لاکاز یک اکسیداز است که به‌عنوان کاتالیست در واکنش‌های کاهش اکسیژن به آب به کار برده می‌شود (۲). لاکازها به‌عنوان بیوکاتالیست‌های وسیع‌الطیف برای تجزیه چندین ترکیب مانند آلاینده‌های فاضلاب‌های صنعتی و بیمارستانی استفاده می‌شوند. هنگامی که سوبسترا توسط لاکاز اکسید می‌شود، یک الکترون از دست می‌دهد و معمولاً یک رادیکال آزاد تشکیل می‌دهد که ممکن است تحت اکسیداسیون بیشتر یا واکنش‌های غیرآنزیمی از جمله هیدراتاسیون و پلیمریزاسیون قرار گیرد (۳).

لاکاز از اکسیژن به‌عنوان پذیرنده الکترون، استفاده و کوئینون تولید می‌کند و به این دلیل جزء خانواده فنل اکسیداز است (۴). این آنزیم طیف وسیعی از سوبستراهای آلی شامل مونو، دی و پلی‌فنل‌ها، آمین‌های آروماتیک، اسیدهای کربوکسیلیک و نیز سوبستراهای غیرفنی و غیرآلی را اکسید می‌کند؛ البته تمایل آن به اکسید کردن پارا دی‌فنل بیشتر است. این آنزیم به‌علت قدرت اکسیدکنندگی ترکیبات فنلی و غیرفنلی ترکیبات لیگنین می‌تواند ترکیبات مشابه که در طبیعت بسیار سخت تجزیه‌پذیر هستند را نیز تجزیه و در حذف آلاینده‌ها نقش داشته باشد. لاکاز در طبیعت به‌طور وسیع پراکنده است؛ به‌طوری‌که در بسیاری از گیاهان آلی، قارچ‌ها باکتری‌ها و حتی در بعضی از حشرات دیده شده است (۵).

یکی از کاربردهای آنزیم لاکاز استفاده از این آنزیم در تهیه هیدروژل برای استفاده در پانسمان زخم‌های مزمن است. مواد پانسمان کیتوزان و کلاژن یا ژلاتین معمولاً به شکل هیدروژل و مطابق با مفهوم پذیرفته‌شده ترمیم مرطوب زخم تولید می‌شوند. پایداری پانسمان در کاربرد زخم‌های مزمن ممکن است به دلیل نیاز به تعویض مکرر و کم، به خطر بیفتد؛ بنابراین، این هیدروژل‌ها باید دارای پایداری زیستی و استحکام مکانیکی باشند تا با ایجاد پیوند عرضی اضافی قابل دستیابی باشد (۶).

برای این منظور، از اتصال‌دهنده‌های عرضی شیمیایی مختلفی استفاده شده است؛ با این حال، سمیت سلولی، آنها را برای کاربردهای زیست‌پزشکی نامناسب می‌کند (۷). جست‌وجو برای عوامل پیونددهنده طبیعی و ایمن، (۸) استفاده از پلی‌فنل‌های گیاهی مانند پروآنتوسیانیدین‌ها (۹) و تانن‌های قابل هیدرولیز (۱۰) را به دلیل سمیت سلولی پایین آن پیشنهاد می‌دهد (۱۱). دربارهٔ پلی‌فنل‌ها تصور می‌شود تثبیت ماتریس‌های کربوهیدرات و پروتئین به دلیل تعاملات فیزیکی بین این ترکیبات و بیوپلیمرها باشد. چنین رویکردهای مبتنی بر ترکیب طبیعی را می‌توان با استفاده از ابزارهای آنزیمی بسیار اختصاصی برای دستیابی به ژل‌های پایدار و پیوندیافته کووالانسی ارتقا داد. آنزیم‌های اکسیداتیو، مانند لاکاز، قادر به افزایش واکنش‌های جفت‌شدن بین و درون مولکولی در بیوپلیمرها و فنولیک‌های طبیعی هستند (۱۲) و برای مثال، لاکاز (EC 1.10.3.2) ترکیبات فنلی و باقیمانده‌های تیروزین را در پروتئین‌ها به کینون‌های واکنش‌پذیر اکسید می‌کند که می‌توانند با تشکیل باز شیف با نوکلئوفیل‌هایی مانند گروه‌های آمینه از کیتوزان و ژلاتین واکنش بیشتری نشان دهند. از سوی دیگر، این ترکیبات به دلیل ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، اثر ضد میکروبی، ضد التهابی و خواص بهبود زخم شناخته شده‌اند.

از رقت‌های بالاتر هر نمونه به محیط کشت استریل عصاره مخمر گلوکز آگار تلقیح شد که به آن آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر برای جلوگیری از آلودگی باکتریایی اضافه شده بود. پلیت‌های محیط کشت عصاره مخمر گلوکز آگار (گلوکز- ۱۰، عصاره مخمر- ۳، پپتون- ۵ و آگار- ۱۵ گرم بر لیتر)، تلقیح و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در شرایط هوازی انکوبه شدند. کلنی‌های نماینده رشد مخمر به‌طور تصادفی، انتخاب و ۲-۳ بار روی پلیت‌های استریل عصاره مخمر گلوکز آگار کشت داده شدند تا کلنی‌های خالص جدایه‌ها به دست آید.

### غربالگری کیفی مخمر تولیدکننده لاکاز در محیط

#### جامد

جداهای مخمر به‌دست‌آمده به‌صورت کیفی در محیط کشت عصاره مخمر پپتون دکستروز (YPD) آگار با ترکیبات شاخص گایاکول (w/v) ۰/۵ درصد، ABTS (۲)، ۲-آزینو-بیس(۳-اتیل بنزتیازولین-۶-سولفونیک اسید)، استامینوفن و کاتکول هرسه (w/v) ۰/۲ درصد غربالگری شدند. همه موارد به‌جز اسید تانیک با محیط آگار با استفاده از اتوکلاو استریل شدند. اسید تانیک به‌طور جداگانه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد با استفاده از اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه استریل شد و قبل از افزودن به محیط آگار، ۵ دقیقه اجازه خنک شدن یافت؛ درحالی‌که ABTS با فیلتر غشایی استریل شده بود. سویه‌های مخمر خالص جداشده با روش کشت نقطه‌ای روی محیط غربالگری لاکاز، تلقیح و به مدت ۴۸ ساعت به‌صورت هوازی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. مشاهده تشکیل هاله رنگی در اطراف کلنی‌های مخمر، نشان‌دهنده تولید لاکاز است.

پلی‌فنل‌های دانه جارو<sup>۱</sup> که به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های قوی شناخته می‌شوند و دارای خواص ضدالتهابی و ضد میکروبی هستند، می‌توانند در پیشگیری از آسیب‌های سلولی و کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های مزمن نقش داشته باشند. پلی‌فنل‌های دانه جارو شامل اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها، لیگنان‌ها و استیلین‌ها می‌شوند.

این عصاره‌ها قادر به محافظت از سلول‌ها در برابر رادیکال‌های آزاد هستند که مانع از تکثیر سلول‌های ملانوما می‌شوند (۱۳) و اثر مهاری بر آنزیم‌های مضر زخم‌های مزمن در شرایط آزمایشگاهی دارند (۱۴). برتری درمانی عصاره‌ها در مقایسه با اجزای منفرد جداشده در دوزهای معادل (۱۵) دلیل استفاده از عصاره طبیعی به‌عنوان اتصال‌دهنده‌های عرضی به‌جای مواد فنلی منفرد بود.

هدف این مطالعه جداسازی و غربالگری سویه‌های مخمر تولیدکننده لاکاز و بهینه‌سازی سویه برتر آنالیز آنزیم تولیدشده و استفاده از آن برای تولید پانسمان‌های هیدروژل برای کاربرد زخم‌های مزمن حاوی کیتوزان، ژلاتین و فنولیک‌های طبیعی است که توسط لاکاز به هم متصل می‌شوند تا مواد زیست‌فعال و زیست‌پایدار با خواص فیزیکومکانیکی و عملکردی قابل تنظیم به دست آید.

### مواد و روش‌ها

#### جداسازی مخمرها

مخمرهای جداشده برای این مطالعه از فضولات باغ وحش اصفهان و چوب‌های درحال پوسیدن پارک کوه صفه اصفهان جدا شدند. نمونه‌ها در ظروف استریل، جمع‌آوری و برای پردازش بیشتر به آزمایشگاه منتقل شدند.

نمونه‌های حاصل از منابع جداسازی فوق به‌صورت سریالی ۱۰ برابر با سرم فیزیولوژی رقیق شدند. سپس یک میلی‌لیتر

<sup>1</sup> Broom seeds (*Kochia scoparia*)

### تولید لاکاز در محیط کشت مایع

از جدایه‌هایی استفاده شد که براساس پاسخ به غربالگری کیفی، بهترین پتانسیل را برای تولید لاکاز داشتند. محیط کشت، عصاره مخمر گلوکز شامل گلوکز (۱۰)، عصاره مخمر (۵)، پیتون (۳) برحسب گرم بر لیتر بود. سپس با ۱ میلی‌لیتر از کشت مخمر ۴۸ ساعته براساس نیم مک فارلند، تلقیح و به مدت ۸ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد درون شیکر ۸۰ دور بر دقیقه انکوبه شد. ۴۸ ساعت بعد، ۲ میلی‌لیتر از کشت رشدیافته در شرایط استریل، جمع‌آوری و با استفاده از میکروسانتریفیوژ با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. محلول‌های رویی، جمع‌آوری و برای سنجش آنزیم استفاده شدند. این روش در این تحقیق برای تولید آنزیم در مراحل بعدی نیز دنبال شد.

### تعیین کمی فعالیت لاکاز

سنجش لاکاز با استفاده از روش اصلاح‌شده Moncultunaroc et al. (2012) انجام شد. این روش شامل اندازه‌گیری اسپکتروفتومتری اکسیداسیون ABTS، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود. مخلوط واکنش شامل ۲۸۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی، ۱۸۰ میکرولیتر بافر استات سدیم با pH 5.0 (۰/۱ مولار) و ۶۰ میکرولیتر محلول ABTS (۱ میلی‌مولار) بود. واکنش با استفاده از ۲۰ میکرولیتر اسید تری‌کلرواستیک ۵ درصد پس از ۱۰ دقیقه متوقف شد. در هر سنجش (به‌جز مواردی که ذکر شده باشد)، نمونه شاهد شامل تمام اجزای مخلوط واکنش به‌جز عصاره آنزیمی بود که با حجم مربوطه آب مقطر استریل جایگزین شد. اکسیداسیون از طریق افزایش جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر در مقایسه با لاکاز استاندارد (۵۰ IU/mL) با استفاده از اسپکتروفتومتر UV/VIS دنبال شد. یک واحد فعالیت آنزیم به‌عنوان مقدار آنزیم اکسیدکننده یک میلی‌مول ABTS در دقیقه تعریف شد.

### رسم منحنی رشد و تولید لاکاز توسط سویه برتر

از بهترین جدایه‌ای استفاده شد که براساس پاسخ به غربالگری کمی و کیفی، بهترین پتانسیل را برای تولید لاکاز داشت. محیط کشت عصاره مخمر گلوکز استفاده‌شده قرار گرفت و سپس با ۱ میلی‌لیتر از کشت مخمر ۴۸ ساعته براساس نیم مک فارلند، تلقیح و به مدت ۸ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد درون شیکر ۸۰ دور بر دقیقه انکوبه شد. هر ۴۸ ساعت، ۲ میلی‌لیتر از کشت رشدیافته در شرایط استریل، جمع‌آوری و میزان رشد و تولید آنزیم لاکاز آن اندازه‌گیری شد.

### تولید آنزیم لاکاز در شرایط محیطی مختلف

**اثر منبع کربن:** منابع کربن مختلف (گلوکز و ساکارز) و محصولات کشاورزی مانند تخم جارو، ملاس، برگ زنبق، چای سبز، کاکائو و آب پنیر با غلظت ۱ درصد (وزنی / حجمی) به محیط کشت عصاره مخمر پیتون اضافه شدند. محیط کشت، استریل و با ۱ میلی‌لیتر از کشت مخمر ۴۸ ساعته براساس نیم مک فارلند تلقیح شد. پس از ۷۲ ساعت میزان لاکاز تولیدشده در هر کدام از محیط‌ها اندازه‌گیری شد.

**اثر منبع نیتروژن:** محیط کشت پایه حاوی گلوکز و عصاره مخمر استفاده شد. منابع مختلف نیتروژن شامل پیتون، عصاره مخمر، سولفات آمونیوم، نترات سدیم و نترات پتاسیم به‌صورت جداگانه با غلظت ۰/۱ درصد (وزنی / حجمی) به‌عنوان تنها منبع نیتروژن به محیط کشت پایه، اضافه و استریل و با ۱ میلی‌لیتر از کشت مخمر ۴۸ ساعته تلقیح شدند. پس از ۷۲ ساعت میزان لاکاز تولیدشده در هر کدام از محیط‌ها سنجش شد.

**تأثیر دما:** تأثیر دماهای مختلف انکوباسیون (۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد) بر تولید لاکاز در یک محیط کشت استریل با ترکیب ذکرشده در بالا انجام شد. محیط کشت با

محصول PCR به یک لوله جدید، منتقل و تا زمان استفاده برای تعیین توالی منجمد شد.

### تهیه هیدروژل

استخراج پلی‌فنل‌ها از دانه‌های جارو (*Kochia scoparia*) با استفاده از حلال اتانول هم حجم محلول آبی و با استفاده از روتاری انجام شد.

محلول ژلاتین (w/v) ۲ درصد در بافر ۲۵ میلی‌مولار بافر استات در pH برابر ۵ و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد تهیه شد و کیتوزان در HCl ۱ درصد حل شد تا محلول (w/v) ۲ درصد به دست آید و pH با NaOH نرمال برابر ۵ تنظیم شد. محلول‌های کیتوزان و ژلاتین به نسبت (w/w) ۲:۳ در دمای اتاق به مدت یک شب مخلوط شدند. پس از آن، ۲۰ میلی‌لیتر محلول عصاره جاروی استخراج شده به ۷۵ میلی‌لیتر از مخلوط کیتوزان و ژلاتین اضافه شد که قبلاً با نسبت (w/w) ۲:۳ تهیه شده بود. واکنش اتصال عرضی با افزودن ۱۵ میلی‌لیتر محلول لاکاز (۱۰ واحد در میلی‌لیتر) آغاز شد و برای مدت زمان مشخصی تا ۲۴ ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تحت هم‌زدن مداوم ادامه یافت. واکنش آنزیمی با حرارت‌دادن در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه خاتمه یافت و مخلوط‌های حاصل تا دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد سرد و خشک منجمد شدند. نمونه‌ها براساس زمان واکنش آنزیمی تعیین شدند. مخلوط‌های کنترل کیتوزان و ژلاتین و عصاره فنلی و کیتوزان و ژلاتین به تنهایی با پیروی از همان روش، اما با حذف آنزیم یا با حذف هم‌زمان پلی‌فنل و آنزیم تهیه شدند.

### بررسی و آنالیز هیدروژل

میکروگراف‌های میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از هیدروژل‌ها با بزرگنمایی ۲۵× تهیه شدند.

۱ میلی‌لیتر از کشت مخمر ۴۸ ساعته، تلقیح و در دماهای فوق‌انکوبه شد. پس از ۷۲ ساعت میزان لاکاز تولیدشده در هر کدام از محیط‌ها اندازه‌گیری شد.

### خالص‌سازی نسبی (تغلیظ) آنزیم لاکاز

خالص‌سازی نسبی آنزیم لاکاز طبق روش دینگک و همکاران (۲۰۱۲) انجام شد (۱۶). لاکاز خام با استفاده از روش رسوب با سولفات آمونیوم تغلیظ شد که در آن از نمک سولفات آمونیوم برای حذف پروتئین‌های هیبریدی از محیط تخمیر در سطح اشباع ۶۰ درصد استفاده شد. سپس رسوب با سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه به دست آمد. سپس رسوب پروتئینی دیالیز شد تا سولفات آمونیوم و سایر مواد غیرآنزیمی حذف شوند. رسوب به داخل کیسه دیالیز ریخته شد، دو سر آن به خوبی محکم شد و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط یخچال در آب مقطر غوطه‌ور شد.

فعالیت آنزیم لاکاز و محتوای کل پروتئین آنزیم قبل و بعد از خالص‌سازی نسبی برای تعیین اثر خالص‌سازی آنزیم انجام شد. همچنین، محتوای کل پروتئین با استفاده از روش برادفورد و در مقایسه با نمودار استاندارد با غلظت‌های متفاوت آلبومین سرم گاوی (BSA) انجام شد.

### توصیف مولکولی جدایه‌ها

استخراج DNA از کشت‌های فعال در حال رشد با استفاده از روش فنل کلروفرم انجام شد. به‌عنوان بافر استخراج اضافه شد و چندین بار مخلوط شد تا امولسیون تشکیل شود. تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر ناحیه فاصله‌گذار رونویسی داخلی (ITS1/ITS2) ژنوم مخمر با استفاده از آغازگر رو به جلو 5'-CTGGTCATTTAGAGGAAGTAA -

3'-و آغازگر معکوس 5'-ITS4

35 -3' TCCTCCGCTTATTGATATGC انجام شد.

شد که نتیجه غربالگری کیفی تولید لاکاز ۲۲ مخمر جدا شده از منابع نمونه مختلف، در محیط‌های غربالگری حاوی کاتکول، گایاکول، استامینوفن و ABTS در جدول ۱ ارائه شده‌اند. جدایه‌هایی کنار گذاشته شدند که هیچ پاسخی به سوبستراها نشان ندادند یا تنها با یک سوبسترا پاسخ ضعیفی نشان دادند. تنها جدایه F12 بیشترین پاسخ مثبت را به همه سوبستراها نشان داد.

فعالیت ضد میکروبی هیدروژل‌های ساخته شده به روش آنزیمی، در برابر باکتری‌های استافیلوکوکوس آرنوس<sup>۱</sup>، لیستریا مونوسیژنوز<sup>۲</sup> و اشیریشیا کولی<sup>۳</sup> ارزیابی شد.

## نتایج

### جداسازی و غربالگری کیفی مخمر تولیدکننده لاکاز

در مجموع ۲۲ سویه مخمر تولیدکننده لاکاز از نمونه‌ها جدا

جدول ۱. **Error! No text of specified style in document.** غربالگری کیفی پلیت تولید آنزیم لاکاز توسط جدایه‌های مخمر در محیط

کشت عصاره مخمر پیتون دکستروز (YPD) آگار حاوی شاخص‌های غربالگری مختلف براساس ایجاد کلنی قهوه‌ای

Table 1: Qualitative plate screening of laccase enzyme production by yeast isolates on yeast extract peptone dextrose (YPD) agar containing different screening indices based on brown colony formation

نام جدایه	استامینوفن	ABTS	گایاکول	کاتکول
F1	عالی	خوب	عدم رشد	عدم رشد
F2	خوب	متوسط	عدم رشد	خوب
F3	عالی	خوب	عدم رشد	خوب
F4	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد	متوسط
F6	عدم رشد	عدم رشد	خوب	خوب
F7	عدم رشد	عدم رشد	خوب	خوب
F8	عدم رشد	عدم رشد	ضعیف	عدم رشد
F9	عدم رشد	عدم رشد	ضعیف	عدم رشد
F10	ضعیف	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد
F11	عالی	عالی	خوب	عالی
F12	عالی	عالی	عالی	عالی
F13	خوب	عدم رشد	خوب	خوب
F14	ضعیف	عدم رشد	عدم رشد	عدم رشد
F15	خوب	خوب	خوب	عدم رشد
F16	متوسط	خوب	متوسط	عدم رشد
F20	عالی	عالی	خوب	عدم رشد
F21	متوسط	ضعیف	متوسط	عدم رشد
F22	خوب	عالی	عالی	خوب

<sup>3</sup> *S. aureus*

<sup>4</sup> *L.monocytogenes*

<sup>5</sup> *E. coli*

مطالعات بیشتر انتخاب شد؛ F12 از فضولات باغ وحش جدا شده بود.

### شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی مخمر برتر تولیدکننده لاکاز

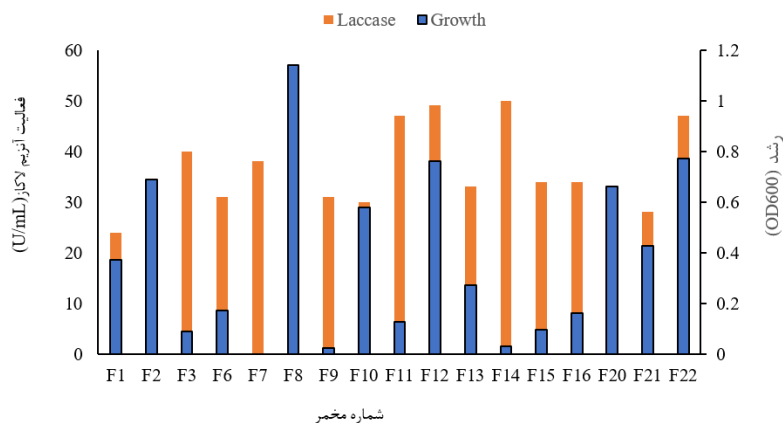
جدایه F12 براساس ویژگی‌های مورفولوژیکی، میکروسکوپی و فیزیولوژیکی شناسایی شد.

همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، مورفولوژی کلنی جدایه F12 روی محیط کشت PDA کرمی و برجسته بود. همچنین شکل میکروسکوپی جدایه را می‌توان در این شکل مشاهده کرد.

### غربالگری کمی جدایه‌های مخمر تولیدکننده لاکاز

نتیجه غربالگری کمی جدایه‌های مخمر در شکل ۱ نشان داده شده است. فعالیت کمی لاکاز با استفاده از ۱ میلی‌مولار ABTS (۲، ۲-آزینو-بیس (۳-اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید) نشان داد جدایه مخمر F12 و F14 بالاترین فعالیت ۵۰/۶ IU/mL واحد در لیتر و پس از آن جدایه مخمر F11 (۴۷/۹ IU/mL) را داشت. کمترین فعالیت مربوط به جدایه F1 با مقدار ۲۴ IU/mL بود.

از نتایج غربالگری کیفی و کمی، جدایه F12 که دارای رشد و فعالیت لاکاز بالاتری بود، به‌عنوان جدایه برتر برای



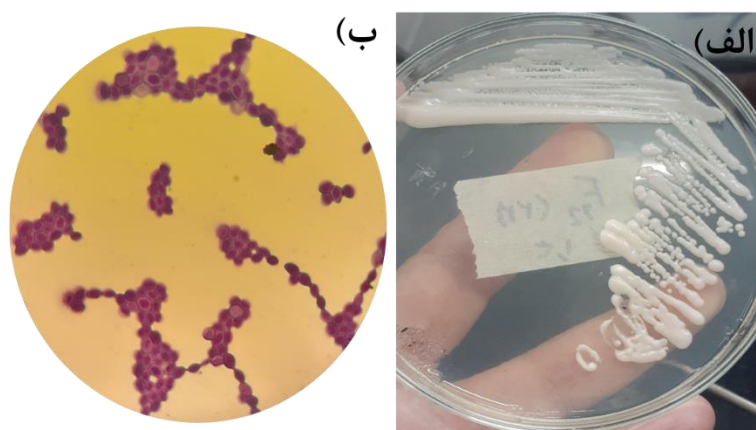
شکل ۱: نمودار کمی رشد و فعالیت کمی آنزیم لاکاز مخمرهای جدا شده

Figure 1: Quantitative graph of growth and quantitative activity of laccase enzyme of isolated yeasts

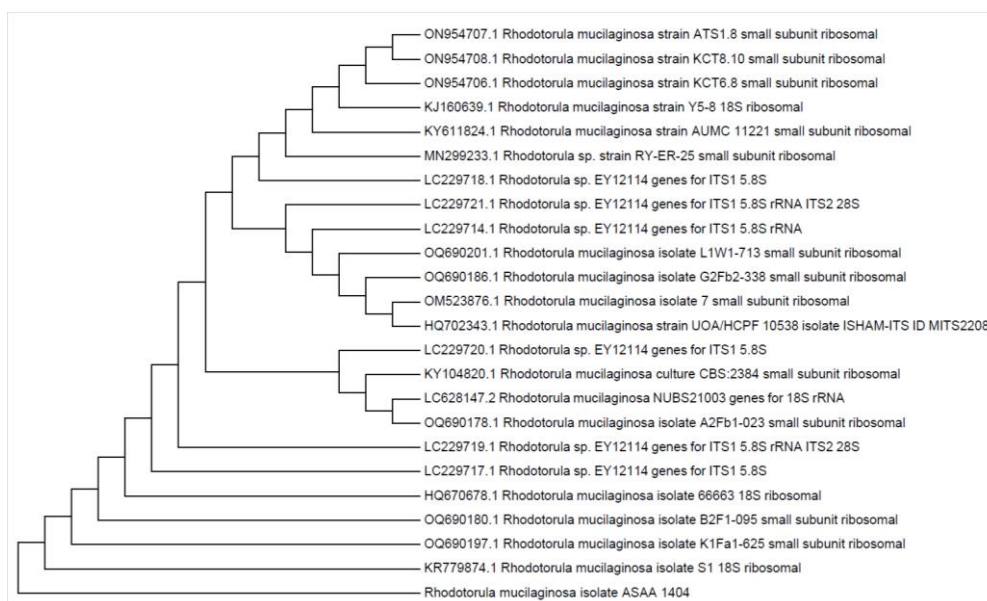
با سویه *Rhodotorula mucilaginosa* ASAA1404 و به میزان ۹۰ درصد داشت. توالی جدایه مخمر در پایگاه داده GenBank ذخیره و با شماره دسترسی SUB15519713 تعیین شدند. شکل ۳ درخت فیلوژنتیکی سویه برتر را نشان می‌دهد.

الگوی تخمیر قند جدایه F12 نشان داد این مخمر قادر به تخمیر قندهای سوربیتول، مالتوز، مانیتول، ترهالوز، گلوکز، گالاکتوز است و قادر به تخمیر قند گزیلوز نیست.

براساس جست‌وجوی BLAST در توالی کامل ناحیه ITS سویه مخمر استفاده شده برای سویه F12، بیشترین شباهت را



شکل ۲: الف) کلنی جدایه F12 روی محیط کشت PDA. ب) مورفولوژی جدایه F12 با رنگ آمیزی گرم با میکروسکوپ نوری.  
Figure 2: A) Colony of isolate F12 on PDA medium. B) Morphology of isolate F12 with Gram staining under light microscope.



شکل ۳: درخت فیلوژنتیکی سویه رودوتورولا موسیلاژینوزا ASAA1404.  
Figure 3: Phylogenetic tree of *Rhodotorula mucilaginosa* strain ASAA1404.

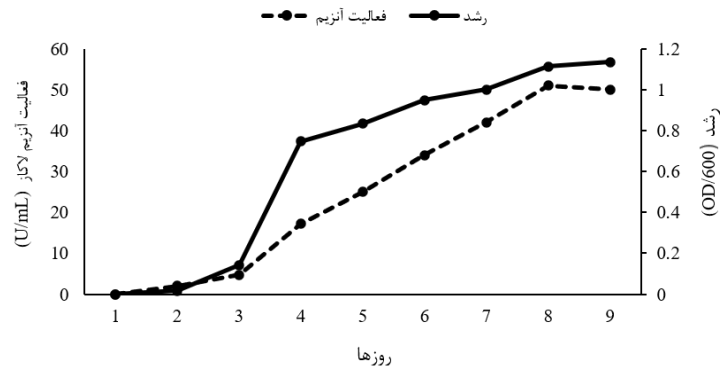
داد حداکثر میزان تولید آنزیم لاکاز در زمان مرحله لگاریتمی و مرحله سکون بوده است.

تأثیر منابع کربن مختلف بر فعالیت لاکاز توسط جدایه‌های مخمر (شکل ۵) نشان داد بالاترین فعالیت توسط جدایه مخمر رودوتورولا موسیلاژینوزا ASAA1404 در زمان

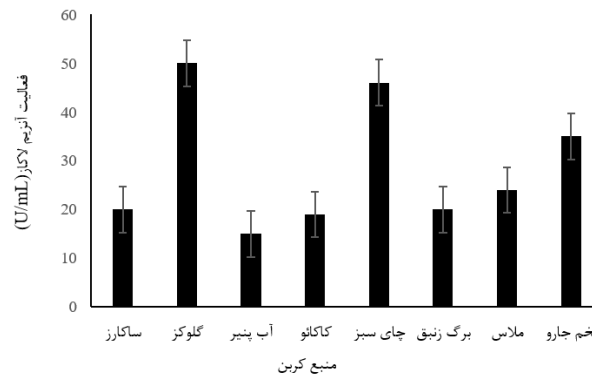
بهینه‌سازی تولید آنزیم لاکاز در شرایط محیطی مختلف

همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، رشد و فعالیت آنزیم تولیدکننده لاکاز تا ۲۱۶ ساعت دنبال شده است. همبستگی بین منحنی رشد و تولید آنزیم لاکاز نشان

انکوباسیون ۱۹۲ ساعت برای گلوکز ثبت شد. بالاترین فعالیت لاکاز (۵۰/۳۴ واحد در میلی‌لیتر) را در گلوکز داشت و کمترین فعالیت در ساکارز (۲۰ واحد در میلی‌لیتر) بود.



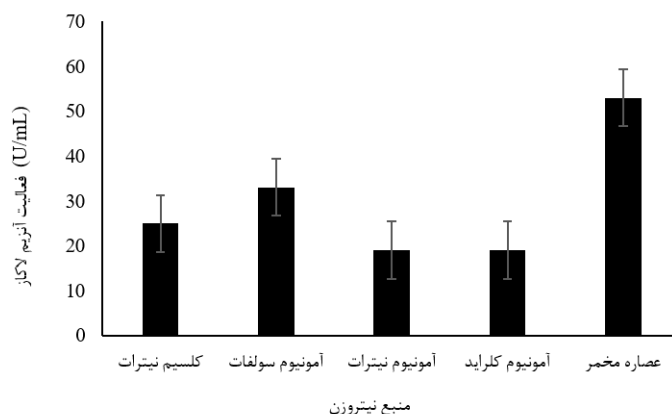
شکل ۴: ارتباط بین منحنی رشد و میزان فعالیت آنزیم لاکاز تولیدشده در مایع رویی محیط کشت توسط سویه رودوتورولا موسیلاژینوزا ASAA1404.  
Figure 4: Relationship between the growth curve and the amount of laccase enzyme activity produced in the supernatant of the culture medium by the *Rhodotorula mucilaginosa* strain ASAA1404.



شکل ۵: تأثیر منابع کربن مختلف بر فعالیت آنزیم لاکاز توسط سویه رودوتورولا موسیلاژینوزا ASAA1404.  
Figure 5: Effect of different carbon sources on laccase enzyme activity by *Rhodotorula mucilaginosa* ASAA1404.

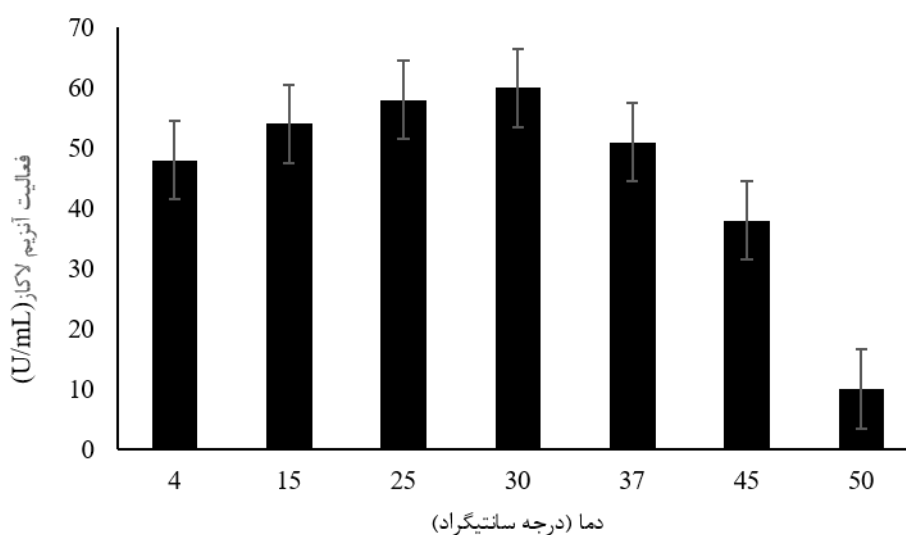
تأثیر دمای مختلف انکوباسیون بر فعالیت لاکاز جدایه‌ها نشان داد رودوتورولا موسیلاژینوزا ASAA1404 بالاترین فعالیت لاکاز را در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد (۶۰/۰۲ واحد در میلی‌لیتر) و کمترین فعالیت را در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد (۹/۹۸ واحد در میلی‌لیتر) داشت.

تأثیر منابع مختلف نیتروژن (اعم از آلی و معدنی) بر فعالیت لاکاز توسط رودوتورولا موسیلاژینوزا ASAA1404 (شکل ۶) نشان داد حداکثر فعالیت را در عصاره مخمر (۵۰/۱۸ واحد در میلی‌لیتر) و کمترین فعالیت را در آمونیوم کلراید (۱۹ واحد در میلی‌لیتر) داشت.



شکل ۶: تأثیر منابع مختلف نیتروژن بر فعالیت لاکاز. توسط سویه رودوتورولا موسیلاژینوزا ASAA1404.

Figure 5: Effect of different carbon sources on laccase enzyme activity by *Rhodotorula mucilaginosa* ASAA1404.



شکل ۷: تأثیر دماهای مختلف انکوباسیون بر فعالیت لاکاز توسط سویه رودوتورولا موسیلاژینوزا ASAA1404.

Figure 7: Effect of different incubation temperatures on laccase activity by *Rhodotorula mucilaginosa* ASAA1404.

### نتایج خالص‌سازی نسبی (تغلیظ) آنزیم لاکاز تولیدشده

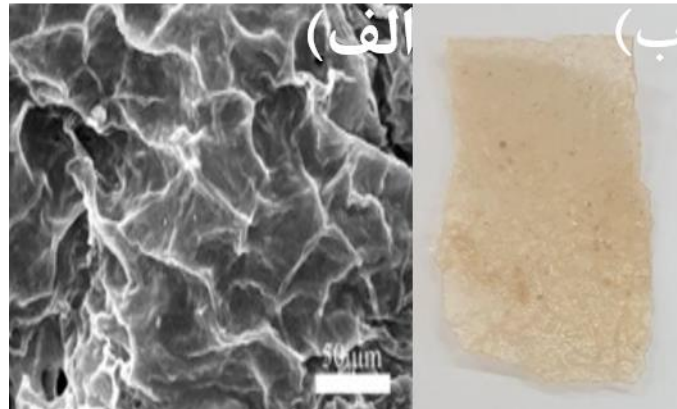
محتوای پروتئین کل در هر مرحله خالص‌سازی از ۰/۴۵۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۰/۱۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کاهش یافت که متعاقباً فعالیت ویژه آنزیم را از ۵۲ واحد بر میلی‌لیتر به ۴۰۰ واحد بر میلی‌لیتر افزایش داد.

تمامی آزمایشات به صورت مستقل سه بار تکرار شد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده‌اند. در مقایسه آزمایش‌ها از t-student با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS Statistics 25 مطالعه شد.

### بررسی خصوصیات هیدروژل

ساختارهای متخلخلی را با اندازه و شکل منافذ متفاوت، با توجه به چگالی پیوندهای عرضی (زمان واکنش آنزیمی) نشان دادند (شکل ۸).

تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از هیدروژل‌های کیتوزان و ژلاتین با تخم جارو لئوفیلیزه‌شده،



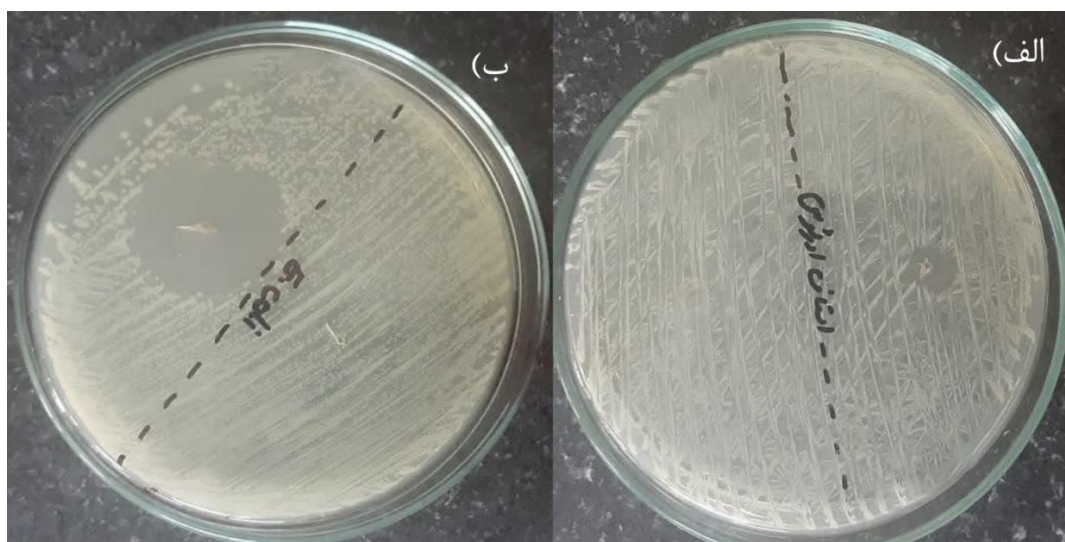
شکل ۸: الف) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از هیدروژل‌های کیتوزان و ژلاتین با تخم جارو. ب) مورفولوژی هیدروژل تولید شده.  
Figure 8: a) Scanning electron microscope (SEM) images of chitosan and gelatin hydrogels with broomrape. b) Morphology of the produced hydrogel.

مشاهده می‌شود عصاره جارو اثر ضد میکروبی بر سویه‌های گرم مثبت و گرم منفی دارد؛ اما وقتی درون هیدروژل بدون آنزیم لاکاز قرار می‌گیرد به دلیل عدم اتصال‌های مناسب خاصیت ضد میکروبی بسیار کاهش می‌یابد. آنزیم لاکاز به دلیل خاصیت اکسیدکنندگی که دارد باعث اتصالات جانبی و محکم بین کیتوزان و ژلاتین و پلی‌فنل استفاده‌شده می‌شود؛ بنابراین، از حذف پلی‌فنل در جریان تولید هیدروژل جلوگیری می‌کند و خاصیت ضد میکروبی افزایش می‌یابد.

بررسی فعالیت آنزیم قبل از تثبیت (۴۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) و بعد از تثبیت در هیدروژل کیتوزان و ژلاتین (۲۸۰ واحد بر میلی‌لیتر) نشان داد فعالیت آنزیم در حین تثبیت کاهش می‌یابد.

### خاصیت ضد میکروبی هیدروژل

فعالیت ضد میکروبی هیدروژل‌های ساخته‌شده به روش آنزیمی در برابر باکتری‌های گرم مثبت *S. aureus* و *L. monocytogenes* و گرم منفی *E. coli* در جدول ۲ آورده شده است. هیدروژل‌ها پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، رشد هر سه سویه را مهار کردند. همان‌گونه که در شکل ۹



شکل ۹: اثر ضد میکروبی عصاره تخم جارو به تنهایی بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، الف) استافیلوکوکوس آرتوس و ب) اشریشیا کولی  
Figure 9: Antimicrobial effect of broomrape seed extract alone on Gram-positive and Gram-negative bacteria: a) *Staphylococcus aureus* and b) *Escherichia coli*.

جدول ۲: فعالیت ضد میکروبی هیدروژل‌های ساخته شده بدون آنزیم لاکاز و پس از افزودن آنزیم لاکاز (افزودن آنزیم مانع از حذف پلی فنل در مراحل تولید هیدروژل می‌شود)

Table 2: Antimicrobial activity of hydrogels made without laccase enzyme and after adding laccase enzyme. (Adding the enzyme prevents the removal of polyphenols during hydrogel production)

Microorganism	: Antimicrobial activity ZOI (mm) With Laccase	: Antimicrobial activity ZOI (mm) Without laccase
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	20	5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27664	15	5
<i>Listeria monocytogenes</i> PTCC 1163	8	4

در این پژوهش، امکان تولید آنزیم لاکاز از مخمر به عنوان یک منبع زیستی مقرون به صرفه و کارآمد بررسی و بهینه سازی شد. نتایج غربالگری اولیه نشان دادند سویه های مخمري منتخب قادر به توليد لاکاز با سطح قابل توجهی از فعالیت آنزیمی هستند. این یافته با مطالعات پیشین هم راستا است که مخمرهایی نظیر *یاروویا لیپولیتیکا*<sup>۶</sup> و *پیچیا پاستوریس*<sup>۷</sup> را به عنوان تولیدکنندگان بالقوه لاکاز معرفی کرده اند (۱۸).

### بحث و نتیجه گیری

جدایه های مخمر با بهترین پتانسیل لاکاز در این کار از فضولات باغ وحش جدا شدند. مخمرها در پاسخ خود به چندین ترکیب شاخص، تنوع نشان دادند که مطابق با گزارش بالداریان ۲۰۰۴ بود (۱۶) که این را می توان به تمایل آنزیم به گروه های مختلف سوبستراها (ارتو و پارا-دی فنول ها) نسبت داد. تشکیل رنگ قهوه ای تیره میکروب های مثبت به دلیل محصول واکنش پذیر کینون تولید شده در طول واکنش بوده است که اغلب به طور خود به خود پلیمریزه می شوند و رنگدانه های ملانوئیدی قهوه ای تیره یا سیاه را تشکیل می دهند (۱۷).

<sup>6</sup> *Yarrowia lipolytica*

<sup>7</sup> *Pichia pastoris*

در دمای بالا می‌تواند به‌دلیل تغییر ترکیب غشای سلولی و تحریک کاتابولیسم پروتئین باشد.

بهینه‌سازی شرایط کشت منجر به افزایش معنی‌دار در بازده تولید لاکاز (فعالیت از ۲۵ به ۶۰ واحد در میلی‌لیتر) شد. عوامل کلیدی از جمله نوع و غلظت منابع کربن و نیتروژن و دمای انکوباسیون به‌عنوان پارامترهای مؤثر شناسایی شدند. شرایط بهینه موجب افزایش حدود ۲ تا ۳ برابری فعالیت آنزیم نسبت به شرایط کنترل شدند که نشان‌دهنده تأثیر مستقیم این عوامل بر بیان آنزیم و پایداری آن در محیط است.

در بخش دوم مطالعه، لاکاز تولیدشده به‌عنوان عامل زیست‌کاتالستی در سنتز هیدروژل به کار گرفته شد. استفاده از لاکاز در واکنش اتصال متقاطع<sup>۱۲</sup> پلیمرهایی مانند پلی‌وینیل الکل یا پلی‌ساکاریدهای مشتق‌شده، منجر به تشکیل شبکه‌های سه‌بعدی پایدار و یکنواخت می‌شود. بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی هیدروژل‌ها از جمله درجه تورم، پایداری مکانیکی، زیست‌سازگاری سلولی و قابلیت رهایش کنترل‌شده، نشان داد محصول نهایی از کیفیت مطلوبی برخوردار است و توانایی استفاده در سامانه‌های دارورسانی یا مهندسی بافت را دارد.

انواع مختلف زخم‌های مزمن منشأ یا علت مشترکی ندارند؛ با این حال، آنها دارای عفونت باکتریایی و غلظت‌های بالای متالوپروتئازهای ماتریکس (MMPS)، میلوپراکسیداز (MPO) و گونه‌های اکسیداتیو واکنشی هستند که باعث تخریب بیش‌ازحد ماتریکس خارج سلولی (ECM) و فاکتورهای رشد می‌شوند. در زخم‌های درحال بهبود، متالوپروتئازهای ماتریکس‌ها توسط مهارکننده‌های طبیعی خود خنثی می‌شوند (۲۵)؛ درحالی‌که در زخم‌های مزمن، نسبت پروتئازها / مهارکننده‌ها مختل می‌شود و بیشتر این آنزیم‌ها مهار نمی‌شوند. عدم تعادل پروتئاز-آنتی‌پروتئاز

عصاره چای سبز و عصاره تخم جارو بعد از گلوکز به‌عنوان بهترین سوبسترا برای تولید لاکاز شناخته شدند. در گزارشی از Wakil et al. (2016) سبوس برنج و باگاس نیشکر بهترین سوبسترا برای مخمر *کلویرومایسس* Dw1<sup>۸</sup> شناخته شده‌اند (۱۸). به‌طور کلی گزارش‌ها نشان داده‌اند بیشتر این ضایعات به‌دلیل ترکیبات آروماتیک یا فنلی محلول در آب فعالیت لاکاز را افزایش می‌دهند (۱۹).

عصاره مخمر و سولفات آمونیوم بهترین منبع نیتروژن برای تولید لاکاز شناخته شد. در گزارشی نیتروژن معدنی نترات سدیم بهترین منبع نیتروژن برای تولید لاکاز شناخته شده است (۲۰). این با گزارشی مبنی بر اینکه یک منبع نیتروژن معدنی، نترات آمونیوم، تولید بالای لاکاز را در قارچ‌های پوسیدگی سفید افزایش می‌دهد، مطابقت دارد (۲۱). علاوه بر این، بهترین فعالیت لاکاز را توسط پلئوروتوس اوستراتوس<sup>۹</sup> با سولفات آمونیوم به‌عنوان منبع نیتروژن نشان دادند (۲۲).

تأثیر دماهای مختلف انکوباسیون در این مطالعه نشان داد دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد بهترین دما برای تولید لاکاز است. همچنین در گزارشی آمده است با افزایش دمای انکوباسیون بالاتر از ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای مخمر *کلویرومایسس* Dw1 و ۲۵ درجه سانتی‌گراد برای پیچیا Dw2، کاهش تدریجی در تولید لاکاز مشاهده شد (۱۸). گزارش‌های مشابهی ارائه شده است که دمای بهینه برای تولید لاکاز در *ماراسمیوس*<sup>۱۰</sup>، دمای ۳۱ درجه سانتی‌گراد (۲۱) و ۲۵ درجه سانتی‌گراد دمای بهینه برای تولید لاکاز در قارچ خوراکی *شیزوفیلوم کامیون*<sup>۱۱</sup> (۲۳) و *پلئوروتوس اوستراتوس* بود (۲۴) که با گزارش ما مطابقت دارد. کاهش

<sup>8</sup> *Kluyveromyces* sp. Dw1

<sup>9</sup> *Pleurotus . ostreatus* HAI 493

<sup>10</sup> *Marasmius* sp.

<sup>11</sup> *Schizophyllum commune*

<sup>12</sup> crosslinking

و گونه‌های اکسیداتیو عفونت باکتریایی، محیط زخم مزمن را اصلاح می‌کنند و هم خاصیت ضدباکتریایی دارند.

پیوند هیدروژنی و برهمکنش‌های یونی - آبگریز بین عصاره فنلی و بیوپلیمرها منجر به ساختار ورقه‌ای شکل بدون پیوندهای عرضی می‌شود (۹، ۲۹)؛ اما همان‌طور که در نتایج مشاهده شد، هیدروژل‌های پیوند عرضی شده آنزیمی، ساختاری متخلخل با افزایش اندازه منافذ به‌عنوان تابعی از میزان پیوندهای عرضی نشان دادند که در سیستم‌های بیوپلیمری پیوند عرضی مشابه نیز مشاهده می‌شود (۶).

تحمل باکتری‌ها برای پلی‌فنول‌ها به گونه باکتری و ساختار مولکولی پلی‌فنل‌ها بستگی دارد. عصاره تخم جارو غنی از اپی‌کاتچین‌ها (EC) است که دارای فعالیت ضد میکروبی علیه *استافیلوکوکوس آرتوس* است (۲۹) و از طریق اختلال در غشای سلولی، فعالیت ضد میکروبی علیه *سودوموناس آئروژینوزا* اعمال می‌کنند (۳۰). از سوی دیگر، پیوند هیدروژنی و برهمکنش‌های یونی - آبگریز بین عصاره فنلی و بیوپلیمرها توسط آنزیم لاکاز خواص ضدباکتریایی ذاتی کیتوزان توسط فعل و انفعالات بین گروه‌های آمین کاتیونی آن و غشاهای سلولی میکروبی با بار منفی را افزایش می‌دهد که منجر به تغییر نفوذپذیری دیواره غشا می‌شود. گزارش شده است این مکانیسم برای همه سویه‌ها رایج است؛ اگرچه در غشای سلولی *استافیلوکوکوس آرتوس* کارآمدتر است (۳۱).

مقایسه نتایج این پژوهش با مطالعات مشابه حاکی از آن است که استفاده از لاکاز مخمیری به‌جای لاکاز قارچ‌های کپکی می‌تواند از نظر هزینه تولید، زمان رشد و ایمنی بیولوژیکی مزیت‌هایی به همراه داشته باشد (۳۲). علاوه بر این، فرایندهای زیست‌کاتالیتیکی مبتنی بر لاکاز نیاز به شرایط سخت واکنشی را کاهش می‌دهد و رویکردی سبز و پایدار در سنتز مواد زیستی ارائه می‌دهند؛ با این حال، هنوز چالش‌هایی نظیر خالص‌سازی کامل آنزیم، پایداری

توسط اسید هیپوکلرو (HOCl) تولیدشده توسط میلوپراکسیداز بیشتر تشدید می‌شود که از یک طرف مهارکننده‌های پروتئاز را غیرفعال می‌کند و از طرف دیگر فعالیت متالوپروتئازهای ماتریکس نهفته را تحریک می‌کند. علاوه بر این، بیشتر زخم‌های مزمن با چندین گونه باکتریایی، مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* کلونیزه می‌شوند (۲۶).

بنابراین، برای تحریک ترمیم زخم، یک ماده پانسمان باید همزمان هم آنزیم‌های پروتئولیتیک و اکسیداتیو را در محل زخم کنترل کند و هم محیطی عاری از میکروارگانیسم فراهم کند و همچنین رطوبت بافت را در حین جذب ترشحات اضافی حفظ کند. بیوپلیمرهایی با خواص ذاتی ضد میکروبی یا بهبوددهنده التیام، مانند کیتوزان و کلاژن / ژلاتین، برای درمان زخم پیشنهاد شده‌اند و اگرچه بسیاری از آنها در بازار موجود هستند (۸)، تنها تعداد کمی از آنها به‌عنوان پانسمان زخم‌های مزمن تجاری شده‌اند. کیتوزان‌های با منشأ حیوانی و قارچی، خطی و تا حدی استیل (۱→۴)-۲-دئوکسی-دی-گلوکان با خواص ذاتی ضد میکروبی هستند (۲۷). از سوی دیگر، ژلاتین (کلاژن دناتوره شده) علاوه بر تضمین چسبندگی و رشد سلول (۲۸)، می‌تواند به‌عنوان یک سوبسترای رقیب برای چندین پروتئاز موجود در محل زخم عمل کند و در نتیجه آنها را از هضم ماتریکس خارج سلولی منحرف کند.

عصاره پلی‌فنلی تخم جارو<sup>۱۳</sup> در یک فرایند یک مرحله‌ای در شرایط واکنش ملایم توسط لاکاز اکسید می‌شود تا کیتوزان و ژلاتین به‌صورت کووالانسی به هم متصل شوند. در نظر گرفته شده است که پلی‌فنل‌ها نقش دوگانه‌ای در هیدروژل ایفا می‌کنند؛ هم به‌صورت «غیرفعال» - به‌عنوان یک عنصر ساختاری و هم به‌صورت «فعال» - با کاهش فعالیت‌های مضر متالوپروتئازهای ماتریکس، میلوپراکسیداز

<sup>13</sup> *Kochia scoparia*

از مخمر را برجسته می‌کند، بلکه افق‌های تازه‌ای برای بهره‌برداری از منابع میکروبی ارزان‌قیمت در زیست‌فناوری باز می‌گشاید؛ با این حال، انجام مطالعات بیشتر در زمینه خالص‌سازی، مهندسی آنزیمی و بررسی عملکرد در مقیاس نیمه‌صنعتی می‌تواند مسیر تجاری‌سازی این دستاورد را هموارتر کند.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی با عنوان تأثیر لاکاز قارچی بر خنثی‌کردن آنتی‌بیوتیک ره‌اشده در محیط و بررسی اثر این فرایند بر سلول‌های انسانی مصوب صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور با کد ۴۰۰۳۳۶۷ است که با حمایت دانشگاه اصفهان اجرا شده است.

### ملاحظات اخلاقی

نویسندگان این مقاله پژوهشی تمام نکات اخلاقی اعم از سرقت ادبی، عدم انتشار دوگانه و تحریف داده‌ها را رعایت کرده‌اند.

بلندمدت هیدروژل در محیط فیزیولوژیک و بررسی سمیت در مدل‌های درون‌تنی وجود دارد که نیازمند تحقیقات گسترده‌تر و توسعه در مقیاس نیمه‌صنعتی و صنعتی هستند. همچنین، مهندسی سویه‌های مخمری از طریق روش‌های مولکولی می‌تواند به بهبود بیان ژن لاکاز و افزایش فعالیت آنزیمی منجر شود (۳۳).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان دادند مخمر استفاده‌شده قابلیت بالایی در تولید آنزیم لاکاز دارد؛ به‌ویژه پس از بهینه‌سازی شرایط کشت، پارامترهایی مانند دما، منبع کربن و نیتروژن تأثیر معناداری بر تولید آنزیم داشتند که با مطالعات پیشین روی قارچ‌ها و باکتری‌ها هم‌خوانی دارد؛ اما استفاده از مخمر به‌عنوان منبع تولید لاکاز، مزایایی همچون سرعت رشد بالا، ایمنی زیستی و هزینه پایین‌تر تولید را به همراه دارد. استفاده از این آنزیم در ساخت هیدروژل‌های زیست‌سازگار، گامی نوآورانه در جهت توسعه سامانه‌های نوین دارورسانی، ترمیم بافت و تصفیه زیستی محسوب می‌شود. ترکیب لاکاز با ساختارهای پلیمری در فرایند سنتز هیدروژل، موجب ایجاد شبکه‌های سه‌بعدی با خواص مکانیکی و زیستی قابل کنترل شد. این هیدروژل‌ها از نظر زیست‌سازگاری، تورم و پایداری ساختاری، عملکرد مطلوبی از خود نشان می‌دهند و می‌توانند به‌عنوان حامل‌های مؤثر در کاربردهای پزشکی و محیط زیستی به کار روند. نتایج این پژوهش نه تنها کاربرد صنعتی لاکازهای تولیدشده

### References

- (1) Arregui L, Ayala M, Gómez-Gil X, Gutiérrez-Soto G, Hernández-Luna CE, Herrera De Los Santos M, et al. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microbial Cell Factories*. 2019;18(1):200. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91889-3.00008-X>
- (2) Castrovilli MC, Bolognesi P, Chiarinelli J, Avaldi L, Cartoni A, Calandra P, et al. Electrospray deposition as a smart technique for laccase immobilisation on carbon black-nanomodified screen-printed electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*. 2020;163:112299. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112299>

- (3) Viswanath B, Rajesh B, Janardhan A, Kumar AP, Narasimha G. Fungal laccases and their applications in bioremediation. *Enzyme Research*. 2014;2014(1):163242. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819860-5.00004-3>
- (4) Solano F, Garcia E, Perez D, Sanchez-Amat A. Isolation and characterization of strain MMB-1 (CECT 4803), a novel melanogenic marine bacterium. *Applied and environmental microbiology*. 1997;63(9):3499-506. <https://doi.org/10.1128/aem.63.9.3499-3506.1997>
- (5) Baldrian P. Fungal laccases—occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*. 2006;30(2):215-42. <https://doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x>
- (6) Moura MJ, Faneca H, Lima MP, Gil MH, Figueiredo MM. In situ forming chitosan hydrogels prepared via ionic/covalent co-cross-linking. *Biomacromolecules*. 2011;12(9):3275-84. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c03240>
- (7) Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7): a mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276 (44): 41279-87. <https://doi.org/10.1074/jbc.m106958200>
- (8) Muzzarelli RA. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers*. 2009;77(1):1-9. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.016>
- (9) Kim S, Nimni ME, Yang Z, Han B. Chitosan/gelatin-based films crosslinked by proanthocyanidin. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2005;75(2):442-50. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30324>
- (10) Shimada T, Saitoh T, Sasaki E, Nishitani Y, Osawa R. Role of tannin-binding salivary proteins and tannase-producing bacteria in the acclimation of the Japanese wood mouse to acorn tannins. *Journal of Chemical Ecology*. 2006;32(6):1165-80. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9078-z>
- (11) Van Vlierberghe S, Dubruel P, Schacht E. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review. *Biomacromolecules*. 2011;12(5):1387-408. <https://doi.org/10.1021/bm200083n>
- (12) Mikolasch A, Schauer F. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009;82(4):605-24. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1869-z>
- (13) Touriño S, Lizárraga D, Carreras A, Lorenzo S, Ugartondo V, Mitjans M, et al. Highly galloylated tannin fractions from witch hazel (*Hamamelis virginiana*) bark: electron transfer capacity, in vitro antioxidant activity, and effects on skin-related cells. *Chemical Research in Toxicology*. 2008;21(3):696-704. <https://doi.org/10.1021/tx700425n>

- (14) Díaz-González M, Rocasalbas G, Francesco A, Touriño S, Torres JL, Tzanov T. Inhibition of deleterious chronic wound enzymes with plant polyphenols. *Biocatalysis and Biotransformation*. 2012;30(1):102-10. <https://doi.org/10.3109/10242422.2012.646676>
- (15) Wagner H, Ulrich-Merzenich G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*. 2009;16(2-3):97-110. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.018>
- (16) Baldrian P. Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004;63(5):560-3. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1434-0>
- (17) Ferrar P, Barbarel S, Ginger M, Walker J. Laccase-new roles for an old enzyme. *New Zealand Bioscience*. 1995;3:7-13. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(02\)00171-1](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00171-1)
- (18) Wakil S, Adebayo-Tayo B, Odeniyi O, Salawu K, Eyiolawi S, Onilude A. Production, Characterization and Purification of Laccase by Yeasts Isolated from Lignolytic Soil. *Journal of Pure & Applied Microbiology*. 2017;11(2). <https://doi.org/10.22207/JPAM.11.2.24>
- (19) Kapich A, Prior B, Botha A, Galkin S, Lundell T, Hatakka A. Effect of lignocellulose-containing substrates on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME-446. *Enzyme and Microbial technology*. 2004;34(2):187-95. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.10.004>
- (20) Buswell JA, Cai Y, Chang S-t. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiology Letters*. 1995;128(1):81-7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10232.x>
- (21) Risdianto H, Harjati M, Suhardi S, Budhi YS, editors. T. Production of laccase by *Marasmius* sp. grown in rice straw using a packed bed bioreactor. *Conference proceeding 19th Regional symposium of Chemical Engineering (RSCE 2012)*; 2012. <https://doi.org/10.22207/JPAM.11.2.24>
- (22) Stajić M, Persky L, Friesem D, Hadar Y, Wasser SP, Nevo E, et al. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006;38(1-2):65-73. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.03.026>
- (23) Adejoye OD, Fasidi I. Effect of cultural conditions on biomass and laccase production in submerged medium by *Schizophyllum commune* (Fries), a Nigerian edible mushroom. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural & Food Chemistry*. 2010;9(3). <https://doi.org/10.5897/AJPS2021.2162>
- (24) Patel H, Gupte A, Gupte S. Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a basidiomycete fungal isolate *Pleurotus ostreatus* HP-1 under solid state fermentation. *BioResources*. 2009; 4(1): 268-84. <https://doi.org/10.15376/biores.4.1.268-284>
- (25) Rocasalbas G, Francesco A, Touriño S, Fernández-Francos X, Guebitz GM, Tzanov T. Laccase-assisted formation of bioactive chitosan/gelatin hydrogel

- stabilized with plant polyphenols. *Carbohydrate polymers*. 2013;92(2): 989-96.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.045>
- (26) Fazli M, Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller K, Jørgensen B, Andersen AS, Kroghfelt KA, et al. Nonrandom distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in chronic wounds. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;7(12):4084-9.  
<https://doi.org/10.1128/jcm.01395-09>
- (27) Muzzarelli RA, Boudrant J, Meyer D, Manno N, DeMarchis M, Paoletti MG. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. *Carbohydrate Polymers*. 2012;87(2):995-1012.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.063>
- (28) Pulieri E, Chiono V, Ciardelli G, Vozzi G, Ahluwalia A, Domenici C, et al. Chitosan/gelatin blends for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2008;86(2):311-22.  
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.31492>
- (29) Masika P, Sultana N, Afolayan A. Antibacterial activity of two flavonoids isolated from *Schotia latifolia*. *Pharmaceutical Biology*. 2004;42(2):105-8.  
<https://doi.org/10.1080/13880200490510856>
- (30) Xie W, Xu P, Liu Q. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2001;11(13):169.  
[https://doi.org/10.1016/s0960-894x\(01\)00285-2](https://doi.org/10.1016/s0960-894x(01)00285-2)
- (31) Tao Y, Qian L-H, Xie J. Effect of chitosan on membrane permeability and cell morphology of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Carbohydrate Polymers*. 2011;86(2):969-74.  
<https://doi.org/10.1007/s13762-020-02992-7>
- (32) Ahmadi Khozani M, Emtiazi G, Aghaei S, Ghasemi S, Zolfaghari M. Application of fungal laccase for heavy metals precipitation using tannin as a natural mediator. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2021;18(8):2335-44.  
<https://doi.org/10.1007/s13762-020-02992-7>
- (33) Zamani, P., M.A. Amoozegar, and K. Khajeh. Cloning and Expression of Laccase Enzyme from *B. pumilus* strain GAZ23. *Journal of Microbial Biology*. 2014. 3(9):1-10.  
<https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00370> [In Persian]