



## تجزیه زیستی پساب‌های حاوی مواد رنگزای صنعتی؛ کاربرد قارچ‌های پوسیدگی سفید تثبیت‌شده

فاطمه تابنده<sup>۱\*</sup>، مصطفی زحمتکش<sup>۲</sup>، کژال فرهمندی<sup>۳</sup>

۱- دانشیار، گروه مهندسی زیست فرآیند، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۴۹۶۵/۱۶۱.

۲- دانشجوی دکتری، دانشکده مدیریت آب، دانشگاه صنعتی دلف، دلف، هلند، صندوق پستی: AA۵۲۶۰۰.

۳- کارشناسی ارشد، پژوهشکده زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۴۹۶۵/۱۶۱.

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۸/۲۷ تاریخ بازبینی نهایی: ۹۶/۰۵/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۶/۱۱ در دسترس بصورت الکترونیک: ۹۶/۰۸/۰۷

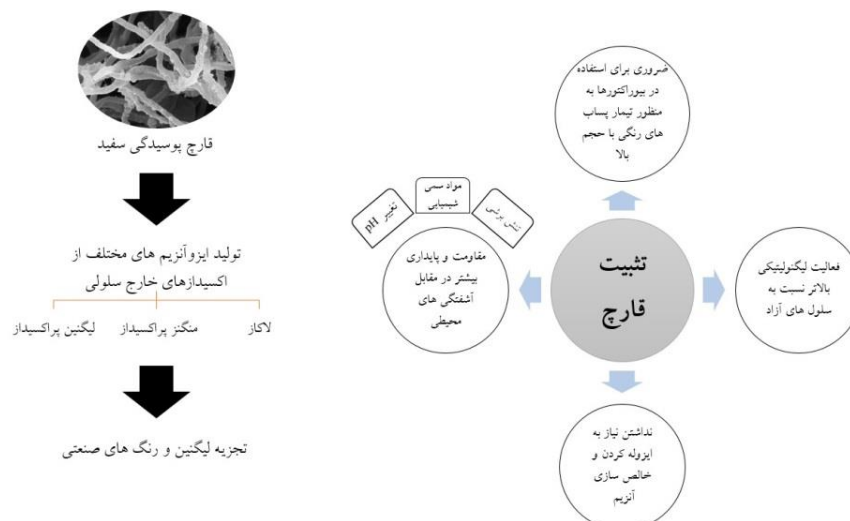
### چکیده

قارچ‌های پوسیدگی سفید، ایزوانزیم‌های گوناگونی از اکسیدازهای خارج سلولی از جمله لیگنین پراکسیداز، منگنز پراکسیداز و لاکاز تولید می‌کند که توانایی تجزیه لیگنین را دارند. سیستم تجزیه‌کننده لیگنین قارچ‌های پوسیدگی سفید به علت خاصیت غیروبیژه بودن آنزیم‌های پراکسیداز تولیدی، توانایی تجزیه طیف وسیعی از مواد سمی و سرطان‌زا از جمله مواد رنگزای صنعتی را دارا می‌باشند. مطالعات آزمایشگاهی در زمینه توانایی و فیزیولوژی سیستم لیگنولیتیک قارچ‌های پوسیدگی سفید، امکان استفاده از این قارچ‌ها برای تیمار پساب کارخانجات تولید و مصرف‌کننده مواد رنگزای صنعتی را ثابت نموده است. تثبیت این قارچ‌ها برای استفاده در راکتورهای زیستی به منظور تیمار پساب‌های رنگی با حجم‌های بالا ضروری می‌باشد. حامل‌های گوناگونی برای تثبیت این قارچ‌ها مورد آزمایش قرار گرفته‌اند. در این مقاله ضمن توجه به ویژگی‌های متابولیک و فیزیولوژیک قارچ‌های پوسیدگی سفید و سیستم لیگنولیتیک آن‌ها، به نتایج پژوهش‌هایی اشاره می‌شود که تاکنون برای حذف پساب‌های رنگی با استفاده از این قارچ‌ها به صورت آزاد یا تثبیت‌شده انجام گرفته است و چشم انداز ادامه این پژوهش‌ها ارائه می‌گردد.

### واژه‌های کلیدی

قارچ‌های پوسیدگی سفید، تجزیه زیستی پساب، مواد رنگزای صنعتی، لیگنین.

### چکیده تصویری





## Biodegradation of Wastewater Containing Industrial Dyes; Application of Immobilized White Rot Fungi

Fatemeh Tabandeh<sup>1\*</sup>, Mostafa Zahmatkesh<sup>2</sup>, Kazhal Farahmandi<sup>3</sup>

- 1- Associate Professor, Bioprocess Engineering Group, Department of Industrial and Environmental Biotechnology, Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, P.O.Box: 14965/161, Tehran, Iran.
- 2- Ph.D student, Water Management Department, Delft University of Technology, P.O.Box: 5 2600 AA Delft, Netherlands.
- 3- M.Sc. student, Department of Industrial and Environmental Biotechnology, Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, P.O.Box: 14965/161, Tehran, Iran.

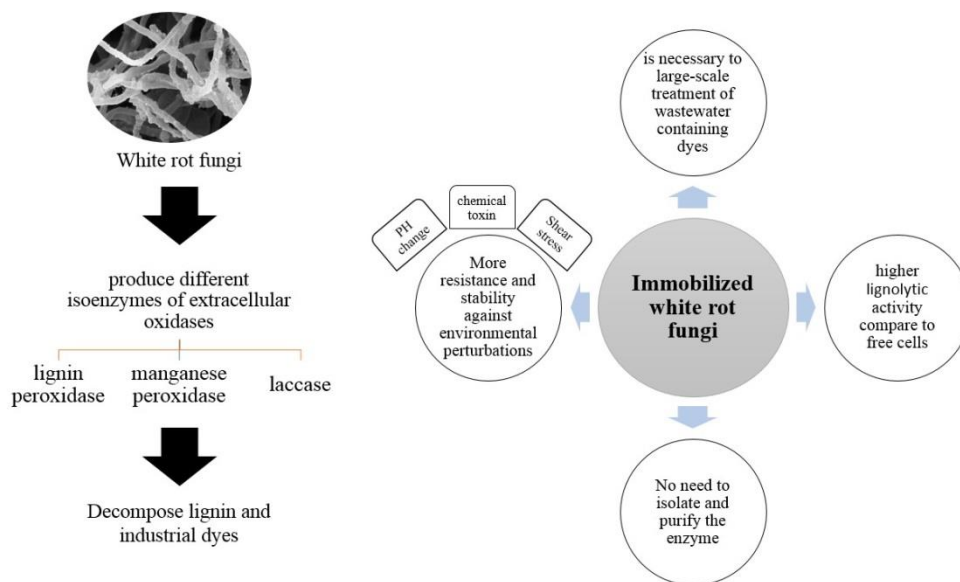
### Abstract

The white rot fungi can produce different isoenzymes of extracellular oxidases such as lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase having ability to decompose lignin. Because of the non-specific nature of peroxidases produced by lignin-degrading system of white rot fungi, they can be used for degradation of a wide range of toxic and carcinogenic materials including industrial dyes. Laboratory studies on the ability and physiology of lignolytic system of white rot fungi demonstrated that it is promising to use these fungi for wastewater treatment of those companies which produce and consume industrial dyes. For large-scale treatment of wastewater containing dyes, it is necessary to immobilize these fungi on suitable carries in bioreactors. In this article, considering the metabolic and physiological characteristics of white rot fungi and their lignolytic system, the previous studies carried out on the degradation of dye wastewater using these fungi in free or immobilized form have been mentioned and their perspective has been also presented.

### Keywords

White rot fungi, Biodegradation of wastewater, Industrial dyes, Lignin.

### Graphical abstract



## ۱- مقدمه

روند رو به رشد تولید و مصرف مواد رنگزای صنعتی به دلیل ساده و مقرون به صرفه بودن نسبی فرآیند تولید و در عین حال پایداری و استقامت این مواد رنگزا در مقابل نور، دما و شوینده‌ها و همچنین حمله‌های میکروبی و تنوع ساختاری و رنگی گسترده آن‌ها در مقایسه با مواد رنگزای طبیعی، پساب کارخانه‌های تولید و مصرف‌کننده این مواد رنگزا را با مشکلی جدی روبه رو کرده است. مواد رنگزا معمولاً در غلظت‌های بیشتر از ۱ mg/l قابل توجه هستند و این در حالی است که برای مثال، غلظت ماده رنگزا در پساب کارخانجات نساجی حدود ۳۰۰ mg/l گزارش شده است [۱]. سالانه بیش از  $7 \times 10^5$  تن ماده رنگزا در قالب حدود ۱۰,۰۰۰ ماده مختلف در سراسر دنیا تولید می‌شود که حدود ۱۰٪ آن وارد پساب کارخانجات می‌شود [۲]. حضور ماده رنگزا در آب مانع از نفوذ نور خورشید می‌شود و در نتیجه فتوسنتز را مختل کرده و زندگی و رشد جانداران آبی را با خطر روبرو می‌کند. به علاوه حلالیت گازها در آب در حضور رنگ محدود می‌شود که این نیز به نوبه خود محدودیت دیگری بر چرخه محل ورود پساب خواهد داشت [۳]. از سوی دیگر بسیاری از مواد رنگزای صنعتی به خودی خود سمی و سرطان‌زا هستند و یا در نتیجه متابولیسم‌های میکروبی باعث تولید ترکیبات آروماتیک سرطان‌زا می‌شوند [۴]. همچنین پساب‌های حاوی مواد رنگزا مصنوعی علاوه بر اینکه باعث ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی می‌شوند، برای سیستم‌های محیط‌زیست و سلامت عمومی نیز خطرناک می‌باشند [۵]. از این رو حذف این مواد رنگزا از پساب‌ها امری ضروری است. تنوع گروه‌های مختلف رنگی به دلیل استفاده از گروه‌های کروموفوری متفاوت (مانند آزو، آنتراکوئینون، تری‌متان و فتالوسیانین) در ساختار آنها می‌باشد. مواد رنگزا آزو (مونوازو، دی‌آزو، تری‌آزو و پلی‌آزو)، آنتراکوئینون، فتالوسیانین و تری‌آریل‌متان از لحاظ کمی مهم‌ترین گروه‌های رنگی هستند. در جدول ۱ گروه‌های کروموفوری این مواد رنگزا نشان داده شده‌اند. سایر گروه‌ها شامل دی‌آریل‌متان، لاکتون، آمینوکتون، هیدروکسی‌کتون و مواد رنگزا با ساختارهای نامشخص مثل مواد رنگزا گوگردی می‌باشند. همینطور بسته به نوع فناوری که در کاربرد آن‌ها در صنایع مختلف به کار گرفته می‌شود دسته‌بندی آن‌ها تغییر می‌کند مانند رنگ‌آمیزی راکتیو، مستقیم، دیسپرس و غیره [۶]. طبق طبقه‌بندی CI، ده گروه کاربردی از مواد رنگزا ارائه شده است. این ده گروه عبارتند از: مواد رنگزای اسیدی، راکتیو، کمپلکس فلزی، مستقیم، بازی، دندانه‌ای، دیسپرس، رنگدانه‌ای، خمره‌ای<sup>۱</sup> و گوگرد. رنگ‌های حلالی<sup>۲</sup> و درخشان‌کننده‌های نوری<sup>۳</sup> نیز از دیگر گروه‌های رنگی مهم هستند که البته به لحاظ میزان کاربرد در رتبه‌هایی پائین‌تر از ده گروه اشاره شده قرار می‌گیرند.

## ۲- روش‌های حذف مواد رنگزا

روش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی مختلفی برای حذف مواد رنگزا از پساب‌های دارای ترکیبات رنگی مورد استفاده قرار گرفته است. عوامل گوناگونی تعیین‌کننده نوع روش مورد استفاده برای حذف ماده رنگزا می‌باشند که معمول‌ترین و شاید مهم‌ترین آنها نوع ماده رنگزا، ترکیبات موجود در پساب و هزینه مواد، تجهیزات و انرژی مورد نیاز برای فرآیند حذف ماده رنگزا باشد [۶]. روش‌های کنونی که برای رنگبری از پساب‌های حاوی ماده رنگزا مورد استفاده قرار می‌گیرند دارای محدودیت‌های جدی، مانند هزینه‌های عملیاتی بالا یا تولید محصولات جانبی مضر می‌باشند [۷]. در جدول ۲ فرآیندهای غیرزیستی مختلف که برای تیمار پساب‌های رنگی به کار می‌روند، همراه با نقاط قوت و ضعف آنها به طور خلاصه آورده شده‌اند. روش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی مختلفی برای حذف مواد رنگزا از پساب‌های دارای ترکیبات رنگی مورد استفاده قرار گرفته است. تصفیه شیمیایی شامل روش‌های زیادی نظیر ته‌نشین و لخته‌سازی می‌باشد که در حذف مواد رنگزا از پساب موثر است. زیرا برای تصفیه کردن می‌تواند کاربرد گسترده‌ای داشته باشد. اما این را باید در نظر گرفت که با توجه به اینکه هزینه این روش به دلیل مصرف بالای واکنش‌گرها و انرژی ورودی بالاست و همچنین با مشکلاتی جهت حذف لجن باقیمانده از فرآیند تصفیه همراه است، امکان استفاده از این روش را محدود می‌کند. از مهم‌ترین روش‌های حذف فیزیکی می‌توان به روش‌های صاف‌کردن و جذب اشاره کرد. از اشکالات اصلی فرآیند صاف‌کردن عمر مفید محدود، گرفتگی و هزینه بالای آنها است گردد [۸]. در مقابل، جذب یک فرآیند موثر، متعادل برای حذف مواد رنگزا و کنترل اکسیژن مورد نیاز زیستی<sup>۴</sup> پساب‌ها است. از کاربردی‌ترین جاذب مورد استفاده برای حذف آلاینده‌ها از پساب، کربن فعال می‌باشد. از معایب این روش می‌توان هزینه نسبتاً بالا، مشکلات تولید دوباره، عملکرد غیرانتخابی و عدم حذف مواد رنگزای خمره‌ای و دیسپرس را نام برد. با روش‌های غشایی می‌توان به کاهش سریع اکسیژن مورد نیاز شیمیایی<sup>۵</sup> و خارج شدن مواد رنگزا از غشا رسید ولی باید به این نکته توجه داشت که تشکیل بارگذاری ذرات نیاز به دفع دارد گردد [۹]. اکسایش شیمیایی به روش فنتون از روش‌های مؤثر در حذف مواد رنگزا از آب‌های آلوده می‌باشد. مهم‌ترین امتیاز این روش آهن به کار رفته، غیرسمی و در دسترس است و آب اکسیژنه مصرفی باعث ایجاد مشکل زیست‌محیطی نمی‌شود. از معایب روش مذکور، قیمت بالای آب اکسیژنه می‌باشد. همچنین بازیابی و جمع‌آوری یون آهن پس از اتمام فرآیند از محیط که به عنوان کاتالیزور استفاده می‌شود، از دیگر معایب این روش به شمار می‌رود.

<sup>4</sup> Biological Oxygen Demand (BOD)

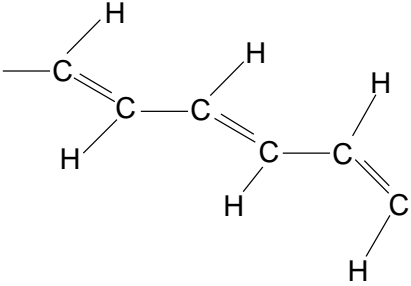
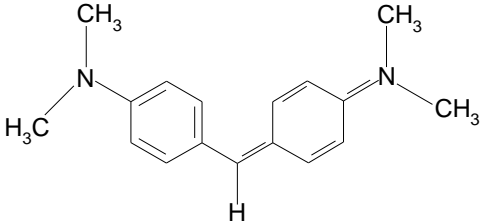
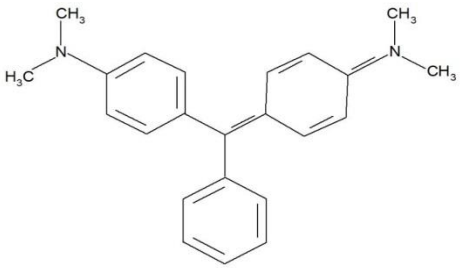
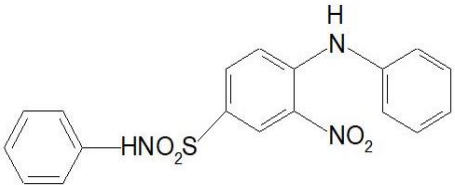
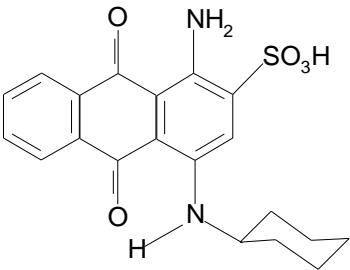
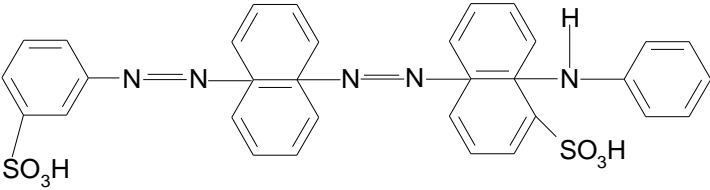
<sup>5</sup> Chemical Oxygen Demand (COD)

<sup>1</sup> Vat dyes

<sup>2</sup> Solvent dyes

<sup>3</sup> Fluorescent Brighteners

جدول ۱- ساختار برخی از گروه‌های رنگی صنعتی پرمصرف [۳۳].

ساختار مواد رنگزا	نام
 <p>The structure shows a linear chain of five carbon atoms with alternating single and double bonds. The terminal carbons are bonded to hydrogen atoms, and the internal double bonds are in a cis configuration.</p>	پلی‌ان و پلی‌متین
 <p>The structure consists of two benzene rings connected by a central carbon atom. Each benzene ring has a dimethylamino group (-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) at the para position relative to the central carbon. The central carbon is also bonded to a hydrogen atom.</p>	Michler's hydrol ( مواد رنگزای دی‌آریل‌متین)
 <p>The structure features a central carbon atom bonded to three benzene rings. One benzene ring is at the para position, and the other two are at the ortho positions. Each of the two ortho benzene rings has a dimethylamino group (-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) at the para position.</p>	مالاشیت سبز ( مواد رنگزای تری‌آریل‌متین)
 <p>The structure shows a central benzene ring with a nitro group (-NO<sub>2</sub>) and a sulfonamide group (-SO<sub>2</sub>NH-) at the para position. The sulfonamide group is further connected to another benzene ring.</p>	Foron yellow ( مواد رنگزای نیترو و نیتروزو)
 <p>The structure is a complex polycyclic system with a central benzene ring fused to other rings. It features a sulfonic acid group (-SO<sub>3</sub>H), an amino group (-NH<sub>2</sub>), and a piperidine ring.</p>	NY3 ( مواد رنگزای آنتراکینونیک)
 <p>The structure consists of two benzene rings connected by a central carbon atom. Each benzene ring has a sulfonic acid group (-SO<sub>3</sub>H) at the para position. The central carbon is also bonded to a hydrogen atom.</p>	INI3 ( مواد رنگزای دی‌آزو)

جدول ۲- مزایا و معایب روش‌های غیرزیستی حذف مواد رنگزا از پساب [۳۴].

معایب	مزایا	شرح روش	روش فیزیکی / شیمیایی
تولید لجن	رنگزدایی با بازده نسبتا بالا از رنگ‌های محلول و نامحلول	واکنش اکسایش با استفاده از $Fe^{+2}-H_2O_2$	واکنش گرهای فنتن
نیمه‌عمر کوتاه (۲۰min)	کاربرد در فاز گازی: بدون تغییر حجم	واکنش اکسایش با استفاده از گاز ازن	ازن‌زنی
محصولات جانبی-هزینه بالا	بدون تولید لجن	واکنش با استفاده از $UV-H_2O_2$	اکسایش فوتوشیمیایی
رها کردن آمین‌های حلقوی	آغازگر و سرعت‌دهنده به شکست پیوند آزو	واکنش با استفاده از $Cl^*$ برای حمله به گروه آمینی	اکسایش با NaOCl
هزینه بالای الکتروسیسته	غیرمضر بودن ترکیبات شکسته شده	واکنش اکسایش با استفاده از الکتروسیسته	تخریب الکتروشیمیایی
بسیار گران	حذف طیف وسیعی از مواد رنگزا	حذف ماده رنگزا بوسیله جذب سطحی	کربن اکتیو
تولید لجن با غلظت بالا	حذف طیف وسیعی از مواد رنگزا	جداسازی فیزیکی	صاف کردن غشایی
عدم توانایی برای حذف تمام انواع مواد رنگزا	احیا و بازیابی: از بین نرفتن جاذب	حذف ماده رنگزا بوسیله رزین تعویض یون	تعویض یون
حجم بالای لجن تولیدی	صرفه اقتصادی	لخته‌سازی با اضافه کردن سولفات آهن و کلراید آهن	لخته‌سازی الکتروسینتیکی

پوسیدگی سفید<sup>۱</sup>، قارچ‌های مولد پوسیدگی قهوه‌ای<sup>۲</sup> و قارچ‌های مولد پوسیدگی نرم<sup>۳</sup> طبقه‌بندی می‌شوند. از این سه گروه قارچ‌های مولد پوسیدگی سفید با قارچ‌های ریشه سفید که اکثر آن‌ها به قارچ‌های رشته‌ای یا سیدومیست‌ها تعلق دارند، مهم‌ترین عوامل پوسیدگی چوب به شمار می‌آیند. قارچ‌های ریشه سفید لیگنین را بطور گسترده‌ای تجزیه می‌کنند و قادر به تجزیه سلولز و همی سلولز هستند. صدها گونه ریشه سفید بوسیله پاتولوژیست‌های گیاهی شناسایی شده‌اند. گونه فانروکیت کرایوسپوریوم شناخته شده‌ترین گونه قارچ‌های پوسیدگی سفید می‌باشد [۱۱]. در میان قارچ‌های تجزیه‌کننده لیگنین، قارچ‌های پوسیدگی سفید طیف وسیعی از ترکیبات آروماتیک را تجزیه می‌کنند. این خاصیت به دلیل فعالیت غیراختصاصی آنزیم‌های تجزیه‌کننده لیگنین از جمله لیگنین پراکسیداز و منگنز پر ژاکسیداز و لاکاز می‌باشد. تجزیه مواد رنگزا توسط قارچ‌های پوسیدگی سفید اولین بار در سال ۱۹۸۳ گزارش شد و پس از آن موضوع بسیاری از تحقیقات گردید. تمامی مواد رنگزا با هر نوع ساختار شیمیایی توسط قارچ‌ها اکسیده شده‌اند ولی تفاوت‌های عمده‌ای بین توانایی گونه‌های مختلف قارچی در

اکسایش روشی است که در آن حذف آلودگی‌ها به وسیله مواد اکسیدکننده انجام می‌شود. اگر مقدار پساب کم و غلظت آلاینده زیاد باشد، این فرآیند به تنهایی می‌تواند موثر باشد. از معایب این روش نسبتا گران بودن مواد اکسیدکننده می‌باشد. همچنین در این روش معمولا گونه‌های موجود در محلول به صورت غیرانتخابی اکسید می‌شوند که از دیگر معایب این روش می‌باشد [۱۰]. استفاده از باکتری در تیمار زیستی پساب‌های حاوی مواد رنگزا ممکن است باعث تولید آمین‌های حلقوی شود که بدون رنگ بوده و به شدت سرطان‌زا می‌باشند. این محصولات معمولا از سمیت بیشتری نسبت به موادی که از آنها حاصل شده‌اند برخوردار می‌باشند [۶]. لذا کارایی محدودی در تیمار پساب‌های رنگی دارند و در مقابل طیف وسیعی از مواد رنگزا موثر نمی‌باشند [۶]. از این رو تحقیقات برای یافتن فناوری‌هایی موثر و پربازده فنی، اقتصادی و بی‌ضرر برای محیط‌زیست برای حذف مواد رنگزا از پساب‌ها مورد توجه محققین زیست فناوری قرار گرفته است.

### ۳- تجزیه‌زیستی مواد رنگزا توسط قارچ

قارچ‌های پوسیدگی، مسئول فساد چوب بر اساس نوع پوسیدگی حادث شده در چوب توسط این ارگانیسم‌ها به سه گروه اصلی قارچ‌های مولد

<sup>1</sup> White rot fungi

<sup>2</sup> Brown rot fungi

<sup>3</sup> Soft rot fungi

پیچیده‌تر حمله می‌کند [۱۹]. مسیر متابولیسی پیشنهادی برای شکستن طیف وسیعی از ترکیبات آروماتیک توسط گونه قارچی فانروکیت کریزوسپوریوم شامل فرآیند اکسایش توسط پراکسیدازها و سپس شکستن حلقه آروماتیک و پیوندهای شیمیایی است. البته شدت معدنی شدن ترکیبات کاملاً به ساختار آنها بستگی دارد [۱۲]. شکل ۱، سازوکار پیشنهادی برای عملکرد آنزیم‌های لیگنین پراکسیداز و منگنز پراکسیداز را نشان می‌دهد. غیرفعال شدن آنزیم‌ها، یکی از مهم‌ترین نگرانی‌ها در سیستم‌های لیگنینولیتیک می‌باشد، چرا که با غیرفعال شدن تدریجی آنزیم‌ها بازده کل فرآیند رنگبری به شدت کاهش می‌یابد. این مشکل، با طراحی محیط کشت مناسب که بازایی و برگشت به حالت فعال آنزیم را ممکن سازد، تا حدودی برطرف می‌شود. محیط‌های تعریف شده اختصاصی برای رشد این قارچ‌ها و بیان آنزیم‌های لیگنینولیتیک توسط آنها، شرایط را برای بازایی پیوسته آنزیم فراهم کرده اند. علاوه بر آن، تنش برشی، از محدود کننده‌های اصلی سیستم لیگنین پراکسیدازی قارچ فانروکیت کریزوسپوریوم به حساب می‌آید. سلول‌های تثبیت‌شده، فعالیت لیگنینولیتیکی بالاتری نسبت به سلول‌های آزاد نشان داده‌اند. سلول‌های تثبیت‌شده در مقابل آشفتگی‌های محیطی مانند تنش‌های برشی، تغییرات pH و یا مواجهه با مواد سمی شیمیایی، مقاومت و پایداری بیشتری از خود نشان می‌دهند. این مزایا در کنار مزایای عمومی تثبیت میکروارگانیسم‌ها مانند افزایش سطح تماس میکروارگانیسم با مواد مغذی و افزایش سرعت یا میزان رشد، تثبیت قارچ‌ها را در سیستم‌های تجزیه‌کننده مواد رنگزا، اجتناب‌ناپذیر نموده است.

#### ۴- تثبیت قارچ‌ها برای تجزیه‌زیستی مواد رنگزا

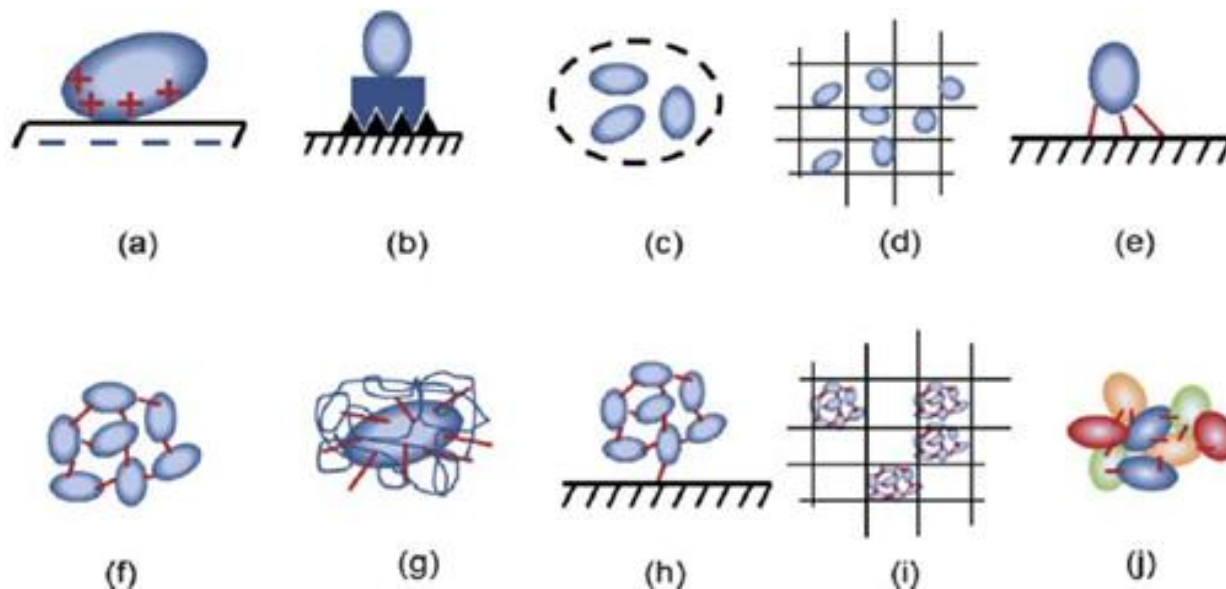
سلول‌ها و آنزیم‌های تثبیت‌شده از سال ۱۹۷۰ مورد توجه قرار گرفتند. علاقه اولیه به سلول‌های تثبیت‌شده به خاطر امکان استفاده از آن‌ها به جای آنزیم‌های تثبیت‌شده بود، که نیاز به جداسازی و خالص‌سازی آنزیم را برطرف می‌ساخت. در ابتدا بیشتر مطالعات بر روی تثبیت سلول‌های باکتریایی انجام شد و به مرور مخمرها و قارچ‌ها نیز مورد توجه قرار گرفتند [۲۰]. سلول‌های قارچی تثبیت‌شده چندین مزیت نسبت به سلول‌های آزاد دارند از جمله: امکان استفاده‌های مکرر از توده سلولی تولیدی، جداسازی ساده جامد-مایع و کمینه‌بودن میزان انسداد در مسیر جریان‌های دائم در سیستم‌های تثبیت‌شده [۲۱]. به علاوه، سلول‌های تثبیت‌شده فعالیت بالاتری از خود نشان می‌دهند تثبیت سلول‌های قارچی روی بستر جامد به شکل لایه نازک، باعث می‌شود سطح تماس این سلول‌ها با محیط مغذی و اکسیژن افزایش یابد. به طور خلاصه می‌توان گفت با تثبیت سلولی روی پایه جامد، می‌توان زمینه رشد بهتری برای قارچ فراهم ساخت و همچنین مقدار آنزیم بیشتری تولید می‌گردد [۲۲].

ارتباط با تجزیه مواد رنگزا وجود دارد [۶]. مطالعات اولیه نشان داده است که تجزیه لیگنین توسط قارچ‌های پوسیدگی سفید اکسیدشونده و غیراختصاصی است. از آنجا که لیگنین یک پلیمر غیرمحلول و پیچیده است، لذا روشن ساختن سازوکار اکسایش آن توسط آنالیز محصولات حاصل از تجزیه مشکل می‌باشد. به همین دلیل تحقیقات اولیه بر روی متابولیسم سوبستراهای مدل دایمری لیگنین متمرکز شده است و نشان داده است که تعداد متعددی از واکنش‌های اکسیدشونده توسط سیستم تجزیه‌کننده لیگنین کاتالیز می‌شود. لیگنین توسط این ارگانیسم فقط در طی متابولیسم ثانویه<sup>۱</sup> که با کاهش یا حذف نیتروژن یا کربن و یا گوگرد در محیط کشت آغاز می‌گردد، تجزیه می‌شود. این به دلیل وجود آنزیم‌های لیگنینولیتیک در شرایط فقر غذایی (متابولیسم ثانویه) در قارچ‌های پوسیدگی سفید می‌باشد. مثلاً در مورد سویه مشهور فانروکیت کریزوسپوریوم، معمولاً برای افزایش بیان آنزیم، از شرایط فقر نیتروژن در آزمایش‌ها استفاده می‌شود. جدول ۳، آنزیم‌های شناخته شده سیستم لیگنینولیتیک این قارچ‌ها و سوبستراها و واکنش‌های حاصل از آنها را نشان می‌دهد. آنزیم‌های لیگنینولیتیک اصلی مسئول تخریب لیگنین عبارتند از: لیگنین پراکسیداز (ligninase, LiP, EC 1.11.1.14)، منگنز پراکسیداز (MnP, EC 1.11.1.13) و لاکاز (benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2). ورسایل پراکسیدازها (VPs)، گروه جدیدی از پراکسیدازهای لیگنینولیتیک شناخته شده حاوی هم هستند که به لحاظ ساختار و خاصیت‌های عملیاتی، تلفیقی از آنزیم‌های لیگنین و منگنز پراکسیداز می‌باشند. به علاوه، آنزیم‌هایی که در تولید پراکسیدهدیروژن دخالت دارند، مانند گلیوکسال اکسیداز (GLOX) و آرپل الکل اکسیداز (AAO) (EC 1.1.3. 7) نیز متعلق به سیستم لیگنینولیتیک این قارچ‌ها در نظر گرفته می‌شوند [۱۵-۱۲]. از مهم‌ترین آنزیم‌هایی که در حذف مواد رنگزا موثرند، می‌توان به لاکازها اشاره کرد. لاکازها اکسایش ترکیبات فنولی مختلف را با استفاده از مولکول اکسیژن که به عنوان گیرنده الکترون عمل می‌کند، کاتالیز می‌کند [۱۶]. لاکازها اگرچه سوبستراهای اختصاصی کمی دارند و توانایی تجزیه طیف وسیعی از پساب‌های مواد رنگزای صنعتی را دارند [۱۷]. ولی سوبستراهای مختلفی دارد که از یک لاکاز به لاکاز دیگر متفاوت می‌باشد. از جمله این سوبستراها: دی فنل اکسیداز، مونوفنل مثل ۲، ۶-دی متوکسی فنول یا گایاکول هستند که سوبستراهایی بهتر از فنل می‌باشند [۱۸]. همه‌ی سوبستراها نمی‌توانند مستقیماً به وسیله لاکازها اکسید شوند که یا به دلیل اندازه‌ی بزرگ آن‌ها می‌باشد که نمی‌توانند به ناحیه فعال آنزیم نفوذ کنند و یا به دلیل پتانسیل بالای اکسایش-کاهش آن‌ها می‌باشد. برای غلبه بر این موانع، ترکیبات واسطه شیمیایی استفاده می‌شود که توسط لاکازها اکسیده می‌شوند که رادیکال‌های فعال تولید می‌کنند که به نوبه خود قبل از برگشتن به حالت اصلی خود، به لایه‌های تحتانی

<sup>1</sup> Idiophase

جدول ۳- آنزیم‌های مربوط به سیستم لیگنینولیتیک قارچ‌های پوسیدگی سفید [۳۵].

واکنش	سوپسترا، حدواسط	کوفاکتور	آنزیم
اکسایش حلقه آروماتیکی به رادیکال کاتیونی	وراتریل الکل	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	لیگنین پراکسیداز (LiP)
اکسایش Mn <sup>+2</sup> به Mn <sup>+3</sup> ؛ اکسایش ترکیبات فنولی توسط Mn <sup>+3</sup> به رادیکال‌های فنوکسیل	اسیدهای آلی، اسیدهای Mn، چرب غیراشباع	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	منگنز پراکسیداز (MnP)
اکسایش Mn <sup>+2</sup> به Mn <sup>+3</sup> ، اکسایش ترکیبات فنلی و غیرفنلی و مواد رنگزا	وراتریل الکل، ترکیبات شبیه Mn، به لیگنین و منگنز پراکسیداز	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ورستایل پراکسیداز (VP)
اکسایش فنل‌ها به رادیکال‌های فنوکسیل	فنل‌ها، حدواسط‌ها مانند: ABTS	O <sub>2</sub>	لاکاز
-	گلی‌اکسال، متیل‌گلی‌اکسال	-	گلی‌اکسال‌اکسیداز (GLOX)
-	الکل‌های آروماتیک (آنیسیل، وراتریل الکل)	-	آریل‌الکل‌اکسیداز (AAO)
-	طیف وسیعی از مواد آلی	-	دیگر آنزیم‌های تولید کننده H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>



شکل ۱- شمای روش‌های تثبیت: (a) جذب سطحی یونی، (b) جذب سطحی با میل ترکیبی بالا، (c) کپسوله کردن، (d) به دام انداختن سلول/آنزیم در یک ماتریکس یا پلیمر، (e) پیوند کووالانسی، (f) تثبیت با کمک مواد اتصال دهنده عرضی (cross linking)، (g) تثبیت با نانوذله، (h) تثبیت با روش‌های e و f، (i) تثبیت روش‌های d و f، (j) تثبیت آنزیم‌ها با اتصال دهنده‌های عرضی مختلف [۷۵].

سلول‌های آزاد از خود نشان می‌دهند [۲۴- ۲۶]. در ضمن، تثبیت سلول‌ها گر انرژی محیط مایع را کاهش داده و باعث بهبود سیستم به لحاظ رئولوژی می‌گردد و اکسیژن رسانی و انتقال جرم را بهبود می‌بخشد [۱۱]. تثبیت سلول‌های نوترکیب، به دلیل شرایط پایدار و به دور از تنش و تقسیم سلولی کنترل و محدود شده، پایداری ژنتیکی این سلول‌ها را بهبود می‌بخشد [۲۷]. انواع روش‌های تثبیت آنزیم یا سلول به صورت شمایی در شکل ۱ نشان داده شده است. البته روش به دام انداختن

با توجه به اینکه فعالیت آنزیمی این قارچ‌ها در انتهای مرحله رشد و آغاز متابولیسم ثانویه صورت می‌گیرد [۲۳] و همچنین با توجه به کاهش سرعت رشد و یا توقف آن در این فاز، لازم است از خروج سلول‌ها در طول فرآیند پیوسته مخصوصاً در نرخ رقیق‌سازی بالا، جلوگیری شود. یکی از راهکارهای موثر در این زمینه، تثبیت روی بستر جامد می‌باشد. سلول‌های تثبیت‌شده نسبت به محرک‌های محیطی مانند pH، دما و یا غلظت‌های شیمیایی سمی مقاومت و انطباق‌پذیری بالاتری نسبت به

## ۵- طراحی راکتور زیستی برای حذف زیستی مواد رنگزا با استفاده از قارچ تثبیت‌شده

برای رشد و بیان لیگنینولیتیک سلول‌های قارچی تثبیت شده، انتخاب بیوراکتوری با شرایط مناسب لازم است تا حساسیت قارچ به تنش مکانیکی لحاظ شود. هرچند که قارچ به صورت تثبیت شده استفاده می‌شود و عمل تثبیت مقداری تنش وارده به میکروارگانیسم را دفع می‌کند، اما خود حامل ممکن است در اثر وارد آمدن تنش بالا آسیب دیده و باعث رها شدن سلول‌های قارچی شود که به نوبه خود باعث افت بازده سیستم می‌شود. بیشترین تنش در سیستم‌های معمول راکتور زیستی، مربوط به تنش حاصل از هم‌زدن مکانیکی در راکتور زیستی هم‌زدن<sup>۱</sup> می‌باشد. تنش حاصل از هم‌زدن مکانیکی در این راکتورهای زیستی، هم به حامل و هم به خود سلول‌ها صدمه می‌زند، مگر آنکه دور هم‌زدن بسیار پایین باشد که در آن صورت عمل هم‌زدن به خوبی صورت نمی‌گیرد و ذرات حامل نیز در تانک ته نشین می‌شوند [۲۹]. راکتورهای زیستی بستر ثابت و بستر سیال و انواع راکتورهای زیستی ستون حباب‌دار<sup>۲</sup> و هوا بالابر<sup>۳</sup> گزینه‌هایی برای فرآیند تجزیه مواد رنگزا توسط قارچ‌های تثبیت‌شده هستند [۳۰].

در مورد راکتورهای زیستی بستر ثابت، با توجه به هندسه حامل‌های مورد استفاده، اگر حامل‌ها در فضای محدودی به صورت فشرده ثابت شوند، باعث هم‌پوشانی قسمت اعظم سطح تماس آنها با محیط کشت شده و میزان زیادی از سطح تماس آنها هدر خواهد رفت و عملاً بازده تثبیت به شدت کاهش می‌یابد. هر چند که میزان تنش وارده به ذرات حامل بسیار کم است [۳۱]. معمولاً راکتورهای را که عمل سیال شدن حامل‌ها با گاز انجام گرفته و فاز مایع به صورت جزئی به راکتور وارد می‌شود را راکتورهای بستر سیال می‌نامند. در راکتورهای هوا بالابر، معمولاً فاز جامد-مایع به حرکت درآمده توسط فاز گاز، توسط تیغه‌هایی با جریان‌های برگشتی در طول راکتور هدایت می‌شود. این امر، تنش را در این نوع راکتورهای زیستی بالا می‌برد، به علاوه، میزان دبی هوای مورد نیاز برای این راکتورها بسیار بالاتر از راکتورهای ستون حباب‌دار می‌باشد و اندازه ذرات (حامل) جامد نیز معمولاً در این راکتورها باید کوچک ( $> 2\text{mm}$ ) باشد. در راکتورهای زیستی ستون حباب‌دار، عمل هوادهی و هم‌زدن، هم‌زمان و با ورود فاز گاز به راکتور انجام می‌شود. عمل هم‌زدن در این راکتورها، توسط حباب‌های هوا که در طول بستر راکتور به بالا می‌روند انجام می‌گیرد. در این بیوراکتور که هم هم‌زدن محیط کشت و سیالیت نسبی حامل‌های غوطه‌ور در محیط کشت اتفاق می‌افتد و همچنین در تمام طول مدت کشت، هوا در محیط کشت دمیده می‌شود، میزان هوادهی کافی خواهد بود. از سویی میزان هم‌زدن محیط با تنظیم مقدار هوای ورودی میسر خواهد بود. دبی هوا تا حدی خواهد بود که آستانه سیالیت ذرات حامل (فاز جامد) میسر گردد.

آنزیم/سلول از پرکاربردترین و ساده‌ترین روش‌ها می‌باشد. جذب سطحی شامل اتصال فیزیکی آنزیم‌ها (یا سلول) بر روی سطح حامل است. مواد حامل ممکن است غیرآلی (به عنوان مثال آلومینا، سیلیکا، ژل فسفات کلسیم، شیشه) و یا آلی (نشاسته، کربوکسی متیل سلولز، DEAE سلولز، DEAE-سفادکس) باشند. جذب مولکول‌های آنزیم (در سطح حمایتی ساکن) شامل نیروهای ضعیف مانند نیروهای واندروالسی و پیوندهای هیدروژنی می‌باشد. بنابراین، آنزیم جذب‌شده به راحتی می‌تواند با تغییرات جزئی در pH، قدرت یونی و یا درجه حرارت خارج شود. این یک نقطه ضعف برای استفاده‌های صنعتی از آنزیم تثبیت شده با روش جذب سطحی است. تثبیت آنزیم‌ها را می‌توان با ایجاد پیوند کووالانسی بین گروه‌های شیمیایی از آنزیم‌ها و گروه‌های شیمیایی از سطح حامل به دست آورد. این روش به طور گسترده‌ای استفاده می‌شود. با این حال، پیوند کووالانسی اغلب با از دست دادن بخشی از فعالیت آنزیم همراه است. سطح حامل ساکن اغلب نیازمند پیش تیمارهایی به شکل حمایتی از پیش فعال شده) قبل از اتصال به آنزیم می‌باشد. محصور کردن سلول/آنزیم یا کپسوله کردن، نوعی از به دام انداختن است. روند شکل گیری آن بدین صورت می‌باشد که ذرات کروی از مایع یا سوسپانسیون در یک غشای نیمه‌تراوا محصور می‌شوند. این غشا ممکن است پلیمری، لیپیدی بر پایه لیپوپروتئین یا غیریونی طبیعی باشد. همچنین آنزیم‌ها و سلول‌ها را می‌توان با به دام انداختن فیزیکی در داخل یک پلیمر یا یک بستر ژل تثبیت کرد. اندازه منافذ بستر به گونه‌ای است که سلول و آنزیم‌ها باقی می‌مانند و نمی‌توانند از این منافذ رد شوند ولی مولکول‌های سوبسترا و محصول می‌توانند عبور کنند. این روش نوعی به دام انداختن شبکه‌ای است که سلول و آنزیم‌ها با نیروهای قوی تثبیت می‌شوند. ممکن است غیرفعال‌شدگی در طول فرآیند تثبیت به علت تغییر در pH، دما و یا افزودن حلال ایجاد شود. بستر مورد استفاده برای فرآیند به دام انداختن آنزیم‌ها شامل ژل پلی آکریل آمید، کلاژن، ژلاتین، نشاسته، سلولز، لاستیک و سیلیکون می‌باشند. از مشخصه‌های اتصال سلول/آنزیم به سلول/آنزیم، عدم وجود سطح جامد برای تثبیت آنزیم‌ها و سلول‌ها می‌باشد. مولکول‌های آنزیم/سلول به وسیله مواد اتصال‌دهنده عرضی باعث تثبیت سلول/آنزیم می‌شوند. این مواد در واقع با مولکول‌های آنزیم و یا سلول واکنش می‌دهند و پلی بین گروه‌های عاملی آنها برقرار می‌کنند که این ستون اصلی، باعث نگهداری مولکول‌های آنزیم و یا سلول می‌شود. گلوکارآلدئید، دی آزو بنزیدین هگزامتیلن دیازوسیانات و تولوئن ایزوتیوسیانات دی از انواع اتصال‌دهنده‌های عرضی می‌باشند [۲۸]. جدول ۴ رنگ‌بری از چندین ماده رنگزا مصنوعی مختلف توسط سیستم‌های قارچی تثبیت‌شده بر حامل‌های مختلف را نشان می‌دهد. همان گونه که در جدول ۴ مشاهده می‌شود قارچ پوسیدگی سفید فانوکیت کریزوسپوریوم در منابع مختلف با روش به دام‌اندازی و یا دیگر روش‌های مختلف تثبیت، در انواعی از حامل‌های معدنی و آلی، طبیعی یا مصنوعی تثبیت‌شده و برای تجزیه زیستی مواد رنگزا به کار برده شده است.

<sup>1</sup> Stirred Tank Reactors (STR)

<sup>2</sup> Bubble column

<sup>3</sup> Air lift bioreactors



جدول ۴- فهرست حامل‌های مورد استفاده برای تثبیت میکروارگانیسم جهت حذف مواد رنگزای صنعتی.

مرجع	ماده رنگزا	میکروارگانیسم	حامل تثبیت
[۳۶]	Remazol Brilliant Blue R	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	اسفنج نایلونی
[۳۷]	Poly R-478	<i>Trametes versicolor</i>	دانه‌های هیدروژل پلی وینیل الکل
[۳۸]	Orange II	Unidentified <i>basidiomycetous</i>	دانه‌های آلژینات
[۳۹]	Everzol Turquoise Blue G	<i>Coriolus versicolor</i>	صفحات پلاستیکی
[۴۰]	Poly R-478	<i>P. chrysosporium</i>	اسفنج نایلونی، فوم پلی یورتان، ساقه ذرت
[۴۱]	Poly R-478	<i>P. chrysosporium</i>	تراشه چوب، پوسته گندم، هسته انگور
[۴۲]	Poly R-478	<i>P. chrysosporium</i>	فوم پلی یورتان
[۴۳]	acid Fuchsine, Congo Red, Indigo Carmine	<i>T. versicolor</i>	سبوس جو
[۴۴]	Amaranth	<i>T. versicolor</i>	پوسته گندم، کنف، پلی اتیلن ترفتالات، فوم پلی یورتان، چوب آناناس
[۴۵]	Remazol Brilliant Blue R	<i>Irpex lacteus</i>	فوم پلی یورتان، چوب آناناس
[۴۶]	Poly R-478	<i>P. chrysosporium</i>	ساقه خوشه انگور، اسفنج نایلونی
[۴۷]	Basic Blue 22	<i>Phanerochaete sordida</i>	صفحه پلاستیکی
[۴۸]	Reactive Black 5	<i>Funalia trogii</i>	اسفنج استوانه‌ای لیفا
[۴۹]	Reactive Black 5	<i>Bjerkandera adusta</i>	الیاف پلاستیکی
[۵۰]	Carpet dye effluent	<i>T. versicolor</i>	الیاف کنفی
[۵۱، ۵۲]	Indigo Carmine, Lanaset Marine	<i>T. hirsuta</i>	اسفنج استیل ضدزنگ
[۵۳]	Sella Solid Blue	<i>T. hirsuta</i>	اسفنج استیل ضدزنگ
[۵۴]	Remazol Brilliant Blue R, Ethyl Violet, Methyl Violet, Methyl Green, Brilliant Cresyl Blue, Methylene Blue, Poly R-478, Congo Red, Trypan Blue, Amido Black	<i>Pleurotus pulmonarius</i>	ساقه ذرت
[۵۵]	Indigo Carmine, Phenol Red	<i>T. hirsuta</i>	دانه‌های آلژینات
[۵۶]	real textile effluent	<i>Pleurotus sajor-caju</i>	باگاس چغندر قند
[۵۷]	Direct Black 38, Direct Brown 2, Direct Red 23, Direct Blue 15, Direct Orange 26, Direct Green 6, Tartrazine, Chrysophenin and Congo Red	<i>P. chrysosporium</i>	پومیس فعال-ZrOCl <sub>2</sub>
[۵۸]	Methyl violet, Congo Red, Acid Orange, Acid Red 114, Vat Magenta, Methylene Blue and Acid Green	<i>P. chrysosporium</i>	دانه‌های آلژینات
[۵۹]	Amaranth	<i>T. versicolor</i>	دانه‌های آلژینات
[۵۳]	Lissamine Green B	<i>T. hirsuta</i>	نارگیل
[۶۰]	Levafix Blue, Remazol Brilliant Red.	<i>T. versicolor</i> , <i>P. chrysosporium</i>	تراشه چوب آناناس، الیاف نخل خرما
[۶۱]	Methylene Blue	<i>P. chrysosporium</i>	ماده معدنی کیسیریس
[۶۲]	Reactive Blue 4, Reactive Red 2	<i>T. versicolor</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>P. sajor-caju</i> , <i>P. chrysosporium</i> , <i>Pleurotus flabellatus</i>	چوب درخت توس، اسفنج لویا
[۶۳]	Malachite Green	<i>Fomes sclerodermeus</i>	پوسته گندم
[۶۴]	Acid Black 52	<i>F. trogii</i>	دانه‌های آلژینات

جدول ۴ (ادامه) - فهرست حامل‌های مورد استفاده برای تثبیت میکروارگانیسم جهت حذف مواد رنگزای صنعتی.

مرجع	ماده رنگزا	میکروارگانیسم	حامل تثبیت
[۶۵]	Indigo Carmine, Bromophenol Blue, Methyl Orange, Poly R- 478	<i>T. hirsuta</i>	پوسته پرتقال
[۶۶]	Reactive Orange 16	<i>I. lactus</i>	فوم پلی یورتان
[۶۷]	Remazol Brilliant Blue R, Reactive Orange 16, Copper(II) phthalocyanine	<i>Dichomitus squalens</i>	چوب آناناس، فوم پلی یورتان
[۶۸]	Reactive Orange 16	<i>I. lacteus</i>	فوم پلی یورتان
[۶۹]	Malachite Green	<i>C. versicolor, f. antarcticus</i>	سیوس گندم
[۷۰]	Reactive Black 5	<i>Trametes pubescens</i>	اسفنج استیل ضدزنگ
[۷۱]	Congo Red	<i>Schizophyllum sp.</i>	پوسته برنج
[۷۲]	Reactive Brilliant Red K-2BP	<i>P. chrysosporium</i>	فوم پلی یورتان
[۷۳]	Reactive Black 5	<i>T. pubescens</i>	پوست تخمه آفتاب‌گردان

#### ۶- نتیجه‌گیری

انواع راکتورهای زیستی برای تصفیه پساب‌های رنگی توسط سلول‌های قارچی تثبیت‌شده در حامل‌های مختلف قابل استفاده است، هر چند نوع راکتور زیستی با توجه به نوع حامل، سلول قارچی و همچنین با در نظر گرفتن مزایا و معایب راکتور زیستی، انتخاب می‌شود. با این حال در مجموع، راکتورهای زیستی بستر ثابت به دلیل کم‌ترین تنش به سلول‌های تثبیت‌شده، برای این منظور بهترین پیشنهاد می‌باشند.

با توجه به اختلاف چگالی محیط کشت و ذرات جامد، ذرات جامد تمایل به ته‌نشین شدن دارند. برای اختلاط خوب فاز جامد، حداقل سرعت گاز ورودی باید حدود دو برابر سرعت ته‌نشینی ذرات جامد باشد. طراحی فرآیند برای استفاده از قارچ فانروکیت کریزوسپوریوم در راکتورهای زیستی مختلف به صورت محدود در گذشته انجام شده است [۳۲].

#### ۷- مراجع

- S. Goszczynski, A. Paszczynski, M. B. Pasti-Grigsby, R. L. Crawford, D. L. Crawford, "New pathway for degradation of sulfonated azo dyes by microbial peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*", *J. Bact.* 176(5), 1339-1347, 1994.
- T. Deveci, A. Unyayar, MA. Mazmanci, "Production of Remazol Brilliant Blue R decolourising oxygenase from the culture filtrate of *Funaliatrogii* ATCC 20 080 0", *J Mol Catal B: Enzyme.* 30:25 – 32, 2004
- I.M. Banat, P. Nigam, D. Singh, R. Marchant, "Microbial decolourization of textile dyes containing effluents", a review. *Bioresour Technol.* 58:217 –27, 1996.
- D. Gao, X. Wen, Y. Zeng, Y. Qian, "Decolourization of a textile-reactive dye with *Phanerochaete chrysosporium* incubated in different ways under non-sterile conditions", *WPT. I*(3), wpt2006065, 2006.
- س. احمدی اسب چین، ح. مرادی، ر. تبرکی، "مطالعه تجزیه میکروبی ماده رنگزای ایندیگوکارمین توسط باکتری گرم منفی اسینتوباکتر لوفوی"، نشریه علمی پژوهشی علوم و فناوری رنگ، ۱۰، ۶۵-۷۰، ۱۳۹۵.
- F. Zee, "Anaerobic azo dye reduction", Ph.D. thesis, Wageningen University, Netherlands, 2002.
- R. C. Minussi, S. G. De Moraes, G. M. Pastore, N. Duran, "Biodecolorization screening of synthetic dyes by four white-rot fungi in a solid medium: possible role of siderophores", *LAM.* 33, 1: 21-25, 2001.
- Namane, A. Mekarzia, K. Benrachedi, N. Belhaneche-Bensemra, A. Hellal, "Determination of the adsorption capacity of activated carbon made from coffee grounds by chemical activation with  $ZnCl_2$  and  $H_3PO_4$ ", *J HAZARD MATER.* 1,189-194, 2005.
- O. Marmagne, C. Coste, "Color removal from textile plant effluents", *Am. Dyest. Rep.* 85 15–21, 1996.
۱۰. ف. امامی، ع. تهرانی بقاء، "مطالعه ای بر روش‌های اکسیداسیون تصفیه پساب نساجی"، *مجله شیمی نساجی*، ۹۶، ۴۲-۴۵ و ۹۷، ۵۸-۶۰، ۱۳۸۹.
- P. Bonnarne, T. W. Jeffries, "Mn(II) regulation of lignin peroxidases and manganese dependent proxidases from lignin degrading white rot fungi", *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 210-217, 1990.
- M. H. Gold, M. A. Alic, "Molecular Biology of Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*", *FEMS.* 57, 3, 605-622, 1993.
- A. B. Orth, M. I. Denny, M. Tien, "Overproduction of lignin-

- degrading enzymes by an isolate of *Phanerochaete chrysosporium*.", *AEM*.57, 9, 2591-2596, **1991**.
14. K. Boominathan, C. A. Reddy, "cAMP-mediated differential regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase production in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*", *PNAS*. 89 (12): 5586-90, **1992**.
  15. D. Li, M. Alic, J. A. Brown, M. H. Gold, "Regulation of manganese peroxidase gene transcription by hydrogen peroxide, chemical stress, and molecular oxygen.", *AEM*. 61, 1, 341-345, **1995**.
  16. P. Sharma, R. Goel, N. Caplash, "Bacterial laccases", *World J Microbiol Biotechnol*. 23, 823-832, **2007**.
  17. D. D. T. Souza, R. Tiwari, A. K. Sah, C. Raghukumara, "Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes". *Enz Microb Technol*. 38, 504- 511, **2006**.
  18. P. Baldrian, "Fungal laccases occurrence and properties", *FEMS Microbiol Rev*. 30: 215–242, **2006**.
  19. D. S. Arora, R. K. Sharma, "Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications", *Appl Biochem Biotechnol*. 160,1760–1788, **2010**.
  20. D. Cullen, P. J. Kersten, "Enzymology and Molecular Biology of Lignin Degradation", *Biochemistry and Molecular Biology*. 249-273, **2004**.
  21. V. Shah, F. Nerud, "Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization.", *Can. J. Microbiol*. 48, 10, 857-870, **2002**.
  22. A. Karimi, F. Vahabzadeh, B. Bonakdarpour, "Use of *Kissiris* immobilized *phanerochaete chrysosporium* for synthetic dye decolorization – involvement of manganese peroxidase". *World J. Microbiol. Biotechnol*. 22:1251-1257, **2006**.
  23. E. Ruckenstein, X.B. Wang, "Production of lignin peroxidase by *phanerochaete chrysosporium* immobilized on porous poly (styrenevinylbenzene) carrier and its application to the degrading of 2- chlorophenol", *Biotechnol. Bioeng*. 44, 79-86, **1994**.
  24. M. H. Gold, M. A. Alic, "Molecular Biology of Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*", *FEMS*.57, 3, 605-622, **1993**.
  25. D. K. Arora, R. P. Ender, K. G. Mukerji, "Handbook of applied mycology", 4; fungal biotechnology. **1992**.
  26. G. Winkelmann, "Microbial degradation of natural products", *VCH Verlagsgesellschaft mbH*. **1992**.
  27. N. Miyata, T. Mori, K. Iwahori, M. Fujita, "Microbial decolorization of melanoidin-containing wastewaters: combined use of activated sludge and the fungus *Coriarius hirsutus*", *BIO*. 89, 2, 145-150, **2000**.
  28. S. Datta, L. R. Christena, Y. R. S. Rajaram, "Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials", *3 Biotech*. 3(1), 1-9. **2013**.
  29. K. Corbett, "Design, Preparation and Sterilization of Fermentation Media", In Moo-Young, M (ed.), *Comprehensive Biotechnology*, 1, Pergamon Press, Oxford, 127-139, **1985**.
  30. H. W. Doelle, D. A. Mitchell, C.E. Rolz, "Solid Substrate Cultivation", Elsevier, London, **1992**.
  31. M. Tavcar, K. Svobodova, J. Kuplenk, C. Novotny, A. Novotny, "Biodegradation of Azo Dye RO16 in Different Reactors by Immobilized *Irpex lacteus*", *Acta Chim. Slov*.53, 338-343, **2006**.
  32. F. Zhang, J. S. Knapp, K. N. Tapley, "Development of bioreactor systems for decolorization of Orange(II) using white rot fungus", *ENZYME MICROB TECH*. 24,48-53, **1999**.
  33. D. Wesenberg, I. Kyriakides, S. N. Agathos, "White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents", *Biotechnol. Adv*. 22, 1,161-187, **2003**.
  34. T. Robinson, G. McMullan, R. Marchant, P. Nigam, "Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative", *Bioresour Technol*. 77,247 –55. **2001**.
  35. P. Keyser, T. K. Kirk, J. G. Zeikus, "Lignolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium*: synthesized in the absence of lignin response to nitrogen starvation", *J. Bacteriol*, 135:790-797, **1978**.
  36. K. Schliephake, G.T. Lonergan, "Laccase variation during dye decolourisation in a 200 L packed-bed bioreactor". *Biotechnol Lett*. 18(8): 881-886. **1996**.
  37. E. Leidig, U. Prüsse, K. D. Vorlop, J. Winter, "Biotransformation of Poly R-478 by continuous cultures of PVAL-encapsulated *Trametes versicolor* under non-sterile conditions", *Bioprocess Biosyst Eng*. 21(1), 5-12. **1999**.
  38. F. M. Zhang, J. S. Knapp, K.N. Tapley, "Development of bioreactor systems for decolorization of Orange II using white rot fungus", *ENZYME MICROB TECH*. 24(1): 48-53, **1999**.
  39. I. K. Kapdan, F. Kargia, G.R. McMullan, "Effect of environmental conditions on biological decolorization of textile dyestuff by *C. versicolor*", *ENZYME MICROB TECH*. 26, 5, 381-387, **2000**.
  40. S. Couto, Rodríguez, I. Rivela, M. R. Munoz, A. Sanromán. "Ligninolytic enzyme production and the ability of decolourisation of Poly R-478 in packed-bed bioreactors by *Phanerochaete chrysosporium*", *BBE*. 23, 3: 287-293, **2000**.
  41. S. R. Couto, A. Domínguez, A. Sanroman, "Utilisation of lignocellulosic wastes for lignin peroxidase production by semi-solid-state cultures of *Phanerochaete chrysosporium*". *Biodegradation*. 12(5), 283-289, **2001**.
  42. I. Mielgo, M. T. Moreira, G. Feijoo, J. M. Lema. "Biodegradation of a polymeric dye in a pulsed bed bioreactor by immobilised *Phanerochaete chrysosporium*." *Water Res*. 36, 1896-1901, **2002**.
  43. S. R. Couto, M. Gundín, M. Lorenzo, M. A. Sanromán, "Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions", *PROCESS BIOCHEM*. 38, 2, 249-255, **2002**.
  44. M. Shin, T. Nguyen, J. Ramsay, "Evaluation of support materials for the surface immobilization and decoloration of amaranth by *Trametes versicolor*", *Appl Microbiol Biotechnol*. 60(1-2), 218-223, **2002**.
  45. A. Kasinath, C. Novotný, K. Svobodová, K. C. Patel, V. Šašek, "Decolorization of synthetic dyes by *Irpex lacteus* in liquid cultures and packed-bed bioreactor", *ENZYME MICROB TECH*. 32(1), 1,167-173, **2003**.
  46. S. Couto, Rodríguez, D. Moldes, A. Liébanas, A. Sanromán. "Investigation of several bioreactor configurations for laccase production by *Trametes versicolor* operating in solid-state conditions." *Biochem Eng J*.15(1), 21-26, **2003**.
  47. Y. Ge, L. Yan, K. Qinge, "Effect of environment factors on dye decolorization by *P. sordida* ATCC90872 in a aerated reactor". *PROCESS BIOCHEM*. 39(11),1401-1405, **2004**.
  48. M. A. Mazmanci, A. Ünyayar, "Decolourisation of Reactive Black 5 by *Funalia trogii* immobilised on *Luffa cylindrica* sponge", *PROCESS BIOCHEM*. 40(1), 337-342. **2005**.
  49. M. Mohorčič, J. Friedrich, A. Pavkob, "DECOLORATION OF THE DIAZO DYE REACTIVE BLACK 5 BY", *Acta Chim. Slov*. 51,619-628, **2004**.
  50. J. A. Ramsay, C. Goode, "Decoloration of a carpet dye effluent using *Trametes versicolor*", *Biotechnol Lett*. 26(3), 197-201, **2004**.
  51. S. R. Couto, M. A. Sanroman, D. Hofer, G. M. Gübitz, "Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes", *Bioresour Technol*. 95(1), 67-72, **2004**.
  52. S. R. Couto, M. A. Sanroman, D. Hofer, G. M. Gübitz, "Production of laccase by *Trametes hirsuta* grown in an immersion bioreactor and its application in the decolorization

- of dyes from a leather factory", Eng. Life Sci. 4, 3, 233-238, **2004**.
53. S. R. Couto, M. A. Sanromán, "Coconut flesh a novel raw material for laccase production by *Trametes hirsuta* under solid-state conditions: application to Lissamine Green B decolorization", J Food Eng. 71(2), 208-213, **2005**.
  54. G. K. Tychanowicz, A. Zilly, C. G. de Souza, R. M. Peralta, "Decolourisation of industrial dyes by solid-state cultures of *Pleurotus pulmonarius*", Prog Biochem. 39, 7: 855-859, **2004**.
  55. A. Domínguez, S. R. Couto, M.A. Sanroman, "Dye decolorization by *Trametes hirsuta* immobilized into alginate beads", WORLD J MICROB BIOT. 21(4), 405-409, **2005**.
  56. H. M. Kamida, L. R. Durrant, R. T. Monteiro, E. D. Armas, "Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*." Química Nova **2005**.
  57. N. K. Pazarlioglu, R. O. Urek, F. Ergun, "Biodecolourization of Direct Blue 15 by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*", Prog Biochem. 40(5), 1923-1929, **2005**.
  58. K. V. Radha, I. Regupathi, A. Arunagiri, T. Murugesan. "Decolorization studies of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics." PROCESS BIOCHEM 40, 10, 3337-3345, **2005**.
  59. J. A Ramsay, W. H. Mok, Y. S. Luu, M. Savage, "Decoloration of textile dyes by alginate-immobilized *Trametes versicolor*". Chemosphere 61(7), **2005**: 956-964.
  60. U. Boehmer, S. Suhardi, T. Bley, "Decolorizing Reactive Textile Dyes with White-Rot Fungi by Temporary Immersion Cultivation", Eng. Life Sci. 6(4), 417-420, **2006**.
  61. A. Karimi, F. Vahabzadeh, B. Bonakdarpour, "Use of *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on Kissiris for synthetic dye decolourization: involvement of manganese peroxidase", WORLD J MICROB BIOT. 22(12), 1251-1257, **2006**.
  62. Nilsson, Ida, Anna Möller, Bo Mattiasson, M. S. T. Rubindamayugi, Ulrika Welander. "Decolorization of synthetic and real textile wastewater by the use of white-rot fungi." Enzyme Microb Tech. 38, 1, 94-100, **2006**.
  63. L. Papinutti, N. Mouso, F. Forchiassin, "Removal and degradation of the fungicide dye malachite green from aqueous solution using the system wheat bran–*Fomes sclerodermeus*". Enzyme Microb Tech. 39(4), 848-853, **2006**.
  64. C. Park, B. Lee, E. J. Han, J. Lee, S. Kim, "Decolorization of acid black 52 by fungal immobilization.", Enzyme Microb Tech. 39, 3,371-374, **2006**.
  65. S. R. Couto, E. Rosales, M. A. Sanromán, "Decolourization of synthetic dyes by *Trametes hirsuta* in expanded-bed reactors", Chemosphere. 62(9),1558-1563, **2006**.
  66. M. Tavčar, K. Svobodová, J. Kuplenk, C. Novotný, A. Pavko, "Biodegradation of Azo Dye RO16 in Different Reactors by Immobilized *Irpex lacteus*", Acta. Chim. Slov. 53(3), **2006**.
  67. M. Šušla, Č. Novotný, K. Svobodová, "The implication of *Dichomitus squalens* laccase isoenzymes in dye decolorization by immobilized fungal cultures". Bioresour. Technol. 98(11), 2109-2115, **2007**.
  68. K. Svobodová, M. Senholdt, C. Novotný, A. Rehorek, "Mechanism of Reactive Orange 16 degradation with the white rot fungus *Irpex lacteus*", Prog. Biochem. 42, 9, 1279-1284, **2007**.
  69. L. A Diorio, A. A. Mercuri, D. E. Nahabedian, F. Forchiassin. "Development of a bioreactor system for the decolorization of dyes by *Coriolus versicolor* f. antarcticus", Chemosphere. 72, 2, 150-156, **2008**.
  70. K. Enayatzamir, H. A. Alikhani, S. R. Couto, "Simultaneous production of laccase and decolouration of the diazo dye Reactive Black 5 in a fixed-bed bioreactor", J. Hazard. Mater. 164(1), 296-300, **2009**.
  71. X. Li, R. Jia, "Decolorization and biosorption for Congo red by system rice hull-Schizophyllum sp. F17 under solid-state condition in a continuous flow packed-bed bioreactor", Bioresour. Technol. 99(15),6885-6892, **2008**.
  72. D. Gao, Y. Zeng, X. Wen, Y. Qian, "Competition strategies for the incubation of white rot fungi under non-sterile conditions", PROCESS BIOCHEM. 43(9), 937-944, **2008**.
  73. J. M. Peralta-Hernández, Y. Meas-Vong, F. J. Rodríguez, T. W. Chapman, M. I. Maldonado, L. A. Godínez, "Comparison of hydrogen peroxide-based processes for treating dye-containing wastewater: decolorization and destruction of Orange II azo dye in dilute solution", dyes pigment. 76(3). 656-662, **2008**.
  74. B. E. Wang, Y. Y. Hu, "Bioaccumulation versus adsorption of reactive dye by immobilized growing *Aspergillus fumigatus* beads". J Hazard Mater. 157(1), 1-7, **2008**.
  75. Y. H. Zhang, P. Myung, S. Chun, Y. Zhua, Z. J. A. Rollinad, "Toward Low-Cost Biomanufacturing through In Vitro Synthetic Biology: Bottom-Up Design", J. Mater. Chem. 21(47),18877-18886, **2011**.