وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
پژوهشگاه رنگ

available online @ www.jcst.icrc.ac.ir
نشریه علمی علوم و فناوری رنگ/ ۱۳ (۱۳۹۸)، ۱۱۷ـ۱۰۷
نوع مقاله: پژوهشی

نشریه علمی علوم و فناوری رنگ
Journal of Color Science and Technology
www.jcst.icrc.ac.ir

استفاده از واکنش اکسایش ترکیبات پلی‌فنولیک ماده رنگزای اسپرک توسط لاکاز در رنگرزی پشم

مجید نصیری برومند*[۱]، مجید منتظر[۲]، ویکتوریا دوشک[۳]

۱ـ استادیار، گروه فرش دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران، صندوق پستی: ۷۶۱۶۹۱۳۳
۲ـ استاد، دانشکده مهندسی نساجی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۵۸۷۵۴۴۱۳
۳ـ دانشیار، گروه مواد لیفی هوشمند، دانشگاه تونته، انسخده، هلند، کدپستی: ۱۹۲۸۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۱۸ در دسترس به صورت الکترونیکی از: ۱۳۹۸/۶/۴

چکیده

لاکاز ترکیبی زیست‌سازگار با توانایی کاتالیزوری جهت شروع واکنش پیوند مواد رنگزای طبیعی پلی‌فنولی آروماتیک با پشم است. اسپرک ماده رنگزای طبیعی شامل ترکیبات پلی‌فنولی آروماتیک با ساختار فلاونوییدی است که بر اساس این ویژگی لاکاز می‌تواند در فرآیند رنگرزی آن کمک کند. در تحقیق حاضر تاثیر لاکاز بر ترکیبات پلی‌فنولی اسپرک با هدف برقراری پیوند شیمیایی با لیف پشم بررسی شده است. بدین منظور عصاره اسپرک استخراج شده و تاثیر لاکاز بر آن بر اساس کروماتوگرافی جداسازی اندازه، طیف‌سنجی جذبی و اندازه‌گیری اکسیژن محلول بررسی شده است. مشخصه‌های سینتیک اکسایش ماده رنگزا در حضور لاکاز محاسبه و سپس رنگرزی کالای عمل شده با اسپرک به کمک لاکاز بررسی شده است. نتایج به دست آمده نشان دادند که لاکاز ماده‌ای مناسب برای تغییر ساختار ماده رنگزای اسپرک است و سبب بهبود درصد تثبیت رنگ و ثبات شستشویی بین ماده رنگزا و پشم می‌شود.

واژه‌های کلیدی: لاکاز، پشم، اسپرک، پیوند زدن، رنگرزی.

The Use of Laccase-Catalyzed Oxidation of Poly Phenolic Compounds of Weld in Wool Dyeing

M. Nasiri Boroumand*[1], M. Montazer[2], V. Dutschk[3]

1- Department of Carpet, Shahid Bahonar University of Kerman, P. O. Box: 76169133, Kerman, Iran
2- Faculty of Textile Engineering, Amirkabir University of Technology, P. O. Box: 158754413, Tehran, Iran
3- Intelligent Fiber Fiber Products Group, Toonte University, P. O. Box: 19282, Enschedeh, Netherlands

Received: 08-11-2018 Accepted: 08-01-2019 Available online: 26-08-2019

Abstract

Laccase is a biocompatible compound which is able to catalyze the oxidation of polyphenolic aromatic dyes and graft them to wool. Weld (Reseda Luteolla, L.) as a natural dye, contains polyphenolic aromatics with flavonoid structure and could be a substrate for Laccase. In this research, the effect of laccase on Weld and its use to make a covalant bond between wool and polyphenols compounds of Weld was studied. For this purpose the colourant compounds of Weld were extracted and the effect of laccase on it was studied by UV-Vis spectrophotometry, Size-exclusion chromatography and measuring the changes in the dissolved concentration of the oxygen co-reactant. Kinetic of Laccase-Catalyzed Oxidation of weld was studied and the effect of laccase on weld-dyed wool was surveyed. The results showed that Weld is a suitable substrate for laccase and the use of laccase can improve the dye fixation, and dye fastness against washing. J. Color Sci. Tech. 13(2019), 107-117© Institute for Color Science and Technology.

Keywords: Laccase, Wool, Weld, Grafting, Dyeing.

***Corresponding author: nasiri@uk.ac.ir**

۱ـ مقدمه

مواد رنگزای طبیعی، غیرسمی و زیست‌تخریب‌پذیر هستند و پساب آنها سبب آلودگی محیط‌زیست نمی‌شود. اسپرک ماده رنگزای شناخته شده با مهم‌ترین جزء رنگی لوتئولین است. رنگ زرد حاصل از اسپرک مربوط به وجود ترکیبات فلاونوییدی لوتئولین و آپیجنین و گلوکزیدهای آنهاست. سه ترکیب لوتئولین، لوتئولین- ۳'، ۷- دی گلوکزید و لوتئولین- ۷-گلوکزید بیش از ۸۰٪ کل فلاونوییدهای اسپرک را تشکیل می‌دهند [۵-۱].

آنزیم‌ها کاتالیزورهای طبیعی با خواص فیزیکی‌ـ شیمیایی، کاتالیزوری و زیستی متفاوت هستند که به کارگیری آنها در صنایع مختلف مطلوب است [۶، ۷]. از آنزیم‌ها برای بهبود رنگ‌پذیری نایلون۶ [۸]، نایلون۶۶ [۹] و پشم [۱۰] استفاده شده است. لاکاز (EC1.10.3.2)، نام عمومی است که به خانواده اکسیدکننده‌های حاوی مس[1] نسبت داده می‌شود و در دسته آنزیم‌های اکسیدورداکتاز[2] قرار دارد [۱۱]. از قابلیت احیاکنندگی لاکاز به جهت تغییر رنگ کالای جین و ایجاد ظاهر ویژه بر آن استفاده شده است [۱۲]. این آنزیم می‌تواند ترکیبات اورتو یا پارا دی هیدروکسی آروماتیک را به عنوان یک پیش‌ماده[3] مناسب به ترکیبات کینونی اکسید کند. ترکیبات کینونی حاصل می‌توانند به واکنش ادامه داده و با آمین‌های نوع اول واکنش افزایشی هسته‌دوستی دهند. واکنش افزایشی هسته‌دوستی آمین‌ها به کینون‌ها به خوبی شناخته شده است. واکنش جفت‌شدن[4]، واکنشی است که در آن دو مولکول آلی به کمک یک کاتالیزور به یکدیگر متصل می‌شوند. پیوند زدن[5] معمولا به جفت‌شدن مولکول‌های کوچک به بسپارهای طبیعی یا مصنوعی اشاره دارد [۱۳].

لاکاز می‌تواند از طریق جفت‌کردن اکسایشی[6] در ساخت مواد رنگزا شرکت کند [۱۴]. لاکاز جهت افزودن کارایی‌های جدید به الیاف نساجی به کار برده شده است. ترکیبات پلی‌فنولی آروماتیک حاوی گروه‌های اورتو یا پارا دی هیدروکسی توسط لاکاز به کینون‌های آنها اکسید و با سازوکار افزایشی نوکلئوفیلی به گروه‌های آمین و تیول‌های آزاد لیف پشم متصل شده و بر این اساس مولکول‌هایی با ساختار آروماتیک دی هیدروکسی به ساختار لیف پشم پیوند می‌شوند [۱۸-۱۵]. با استفاده از لاکاز پیوند شدن کیتوسان و کتچین بر سلولز انجام شده است. بررسی‌ها نشان داده که در اثر اکسایش به واسطه لاکاز تعدادی از گونه‌های پلی‌فنولی موجود در سلولز به کینون‌ها تبدیل شده که با واکنش افزایشی مایکل[7] با هسته‌دوست‌هایی مثل هیدروکسیل یا آمین آزاد مزدوج شده‌اند [۱۹].

لاکازها براساس توانایی در تولید مواد رنگزا از مواد بیرنگ با وزن مولکولی کم، به عنوان جایگزینی برای فرآیندهای رنگرزی معمول پیشنهاد شده اند. از سوی دیگر قابلیت رنگرزی کالای پشمی در شرایط ایمن برای لیف با کمک این آنزیم از ترکیبات اولیه بی‌رنگ همچون هیدروکینون نشان داده شده است. این فرآیندها نسبت به روش‌های معمول رنگرزی پشم با مصرف زیاد آب، مواد کمکی، اسید و انرژی، صرفه اقتصادی دارد [۲۰]. محصول واکنش در حضور لاکاز پیش ماده‌های بی‌رنگ ۲، ۵- دی آمینو بنزن سولفونیک اسید و کتچول در رنگرزی پنبه استفاده شده است [۲۱]. استفاده از رسورسینول[8] به جای کتچول سبب تغییر رنگ شده که نشان می‌دهد موقعیت گروه‌های هیدروکسیل در حلقه پلی‌فنولی بر رنگ نهایی موثر است [۲۲].

همچنین جهت رنگرزی پنبه، ابتدا آن را آمینه کرده و سپس پلی‌کتچول‌های حاصل از اکسایش لاکاز را با پیوند کووالانسی به گروه‌های آمین متصل کرده‌اند [۲۳]. در رنگرزی سلولز به واسطه لاکاز با توجه به ترکیب فنولی، رنگ‌های سفید (هیدروکینون)، زرد (۲- متوکسی - ۵- نیتروفنول)، نارنجی (اسید فرولیک[9]) و قرمز (گوآیکول[10]) به دست آمده است [۲۴].

رنگرزی پشم از طریق پد کردن با هیدروکینون و سپس عمل در محلول لاکاز در حضور دندانه کرم انجام شده است. لاکاز سبب اکسایش هیدروکینون جذب شده به رادیکال مربوط شده که بسپارش بعدی سبب تولید محصول رنگی با ساختار مزدوج شده است و عمق رنگ با انتخاب مقدار هیدروکینون قابل تغییر است [۲۰]. به علاوه رنگدانه حاصل از اثر لاکاز بر ۱۵ ترکیب فنولی طبیعی برای رنگ کردن مو استفاده شده که ترکیب کردن اولیه‌های فنولی سبب تنوع در فام با ثبات عالی در برابر شستشو شده است [۲۵]. بسپارش اسید گالیک[11] در حضور لاکاز انجام و در محل برای رنگرزی پشم، ابریشم، نایلون و پنبه استفاده شده که در نتیجه آن فاکتور محافظت در برابر امواج فرابنفش و ویژگی ضد اکسید شدن بیشتر شده است [۲۶]. رنگرزی سلولز از طریق محصول اکسایش آنزیمی فلاونوییدهای طبیعی مورین[12] و کورستین[13] بررسی شده است. لاکاز سبب واکنش بسپارش فلاونوییدها شده و محلول پر رنگ تولید شده که توانسته پنبه سفیدگری نشده را رنگرزی کند. ترکیبات فلاونوییدی موجود در پارچه

1- Multi-copper oxidases
2- Oxidoreductase
3- Substrate
4- Coupling reaction
5- Grafting
6- Oxidation coupling
7- Michael reaction
8- Resorcinol
9- Ferulic acid
10- Guaiacol
11- Gallic acid
12- Morin
13- Quercetin

سفیدگری نشده به عنوان محلی برای پیوند شدن مواد رنگزای حاصل از بسپارش و افزایش ثبات شستشویی بوده‌اند [۲۷]. محصول بسپارش آنزیمی روتین[1]، مورین و کورستین برای رنگرزی پنبه نیز استفاده شده است. اکسایش ترکیبات فلاونوییدی ذکر شده به واسطه لاکاز سبب تولید کینون‌های مرتبط شده که ناپایدار بوده و به محصولات با وزن مولکولی زیاد یا رنگدانه‌های قهوه‌ای (ملانین[2]) بسپارش می‌شوند. ثبات شستشویی و سایشی پنبه رنگرزی شده خوب بوده است. با استفاده از پنبه سفیدگری نشده به دلیل وجود ترکیبات فلاونوییدی ثبات شستشویی بیشتری حاصل شده است. همچنین با افزایش دمای رنگرزی ثبات شستشویی افزایش یافته است [۲۸]. بر این اساس، استفاده از لاکاز به عنوان یک ترکیب زیست‌سازگار در پیوند مواد رنگزای طبیعی پلی‌فنلی به پشم مناسب به نظر می‌رسد. هدف از تحقیق حاضر بررسی واکنش کاتالیزوری اکسایش ماده رنگزای اسپرک با استفاده از لاکاز با هدف ایجاد پیوند شیمیایی با کالای پشمی است.

۲ـ بخش تجربی

۲ـ۱ـ مواد

لاکاز مورد استفاده از نوع *Trametes Versicolor* است که به همراه استات سدیم بدون آب، هیدروکسید سدیم، متانل و کتچول از شرکت سیگما-آلدریچ (آلمان) خریداری گردید. شوینده غیریونی مارلیپال ۲۴,۶۰[3] از شرکت ساسول (آلمان) و اسید استیک ۹۶٪ از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد.

۲ـ۲ـ روش کار

۲ـ۲ـ۱ـ آماده‌سازی

پارچه پشمی خریداری شده از شرکت ایران مرینوس، دارای بافت ساده، تراکم تاری و پودی ۱۷ و ۲۰ نخ در سانتی‌متر، قبل از عملیات رنگرزی با شوینده غیریونی در دمای ۶۰ °C به مدت ۳۰ دقیقه شستشو و در دمای محیط خشک شده است. استخراج ترکیبات فلاونوییدی اسپرک به کمک جوشاندن در آب: متانل با نسبت ۸:۲ به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد [۱]. بر این اساس ۱۰ گرم ماده رنگزا در محلول ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۳۲۰ میلی‌لیتر متانل به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده و پس از سرد شدن با کاغذ فیلتر Whatman شماره ۵۴۱ با اندازه منافذ ۲۲ μm با استفاده از پمپ خلا صاف شد. عصاره حاصل پس از خشک شدن در دمای ۴۵ °C جمع‌آوری و در ۴ °C نگهداری شد. محلول‌های بافر استات سدیم با توجه به مقادیر جدول ۱ تهیه شد.

جدول ۱: مواد مورد استفاده جهت تهیه بافر استات.

pH	استات سدیم ۰,۱ N (*ml*)	اسید استیک ۰,۱ N (*ml*)
۳,۶	۱۵	۱۸۵
۳,۸	۲۴	۱۷۶
۴	۳۶	۱۶۴
۴,۲	۵۳	۱۴۷
۴,۴	۷۴	۱۲۶
۴,۶	۹۸	۱۰۲
۴,۸	۱۲۰	۸۰
۵	۱۴۱	۵۹
۵,۲	۱۵۸	۴۲
۵,۴	۱۷۱	۲۹

۲ـ۲ـ۲ـ تعیین فعالیت لاکاز و بررسی سنتیک واکنش

تعیین فعالیت لاکاز با استفاده از روش شرکت سیگما آلدریچ انجام و فعالیت آنزیم بر حسب U بیان شد. در مورد لاکاز یک واحد U مقدار آنزیمی است که بتواند یک میکرومول از کتچول را به مدت یک دقیقه در pH= ۴,۵ و دمای ۲۵ °C به ۱,۲- بنزوکینون تبدیل کند [۲۹]. اندازه‌گیری تغییر جذب کتچول در مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از طیف‌سنج جذبی Carry 100 Bio (Varian) در طول موج ۴۱۵ *nm* با افزودن ۵۰ μl از محلول ۰,۱ *g/l* لاکاز به ۹۹۹ μl محلول ۰,۱ *M* کتچول انجام شد. محلول کتچول قبل از افزودن لاکاز بدون رنگ و پس از آن زرد شد. محاسبه فعالیت آنزیم مطابق رابطه‌های ۱ و ۲ انجام شد. لازم است که بیشترین مقدار *Abs/min* استفاده شود.

$$Volumetric\ Activity\ \left(\frac{U}{ml}\right) = \frac{\frac{Abs}{min} \times Vtot \times F}{1 \times d \times Vpr} \qquad (۱)$$

$$Specific\ Activity\ (U/mg) = \frac{Volumetriic\ Activity}{Konzpr} \qquad (۲)$$

توضیح علایم اختصاری رابطه‌های ۱ و ۲ در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲: علایم اختصاری استفاده شده در رابطه‌های ۱ و ۲.

Abs/min	Abs/min $_{(sample)}$-Abs/min $_{(blank)}$
F	ضریب رقیق‌سازی[4]
V_{tot}	حجم مخلوط واکنش
1	ثابت جذب (در *nm* ۴۱۵ برابر با ۱ $cm^2/\mu mol$)
d	طول مسیر نگهدارنده طیف‌سنج[5] *(cm)*
V_{pr}	حجم آنزیم در نمونه *(ml)*
$Konz_{pr}$	غلظت آنزیم اضافه شده *(mg/ml)*

1- Rutin
2- Melanin
3- Marlipal 24/60

4- Dilution Factor
5- cuvette

مقدار لازم از عصاره ماده رنگزا در بافر pH=۵ و دمای ۴۵ ºC حل و سپس ۰٫۱ *g/l* لاکاز به محلول افزوده و عملیات به مدت ۹۰ دقیقه همراه با هم‌زدن در سرعت ۱۰۰۰*rpm* انجام شد [۳۰]. در حین آزمایش برای جبران مصرف اکسیژن محلول در آب جریان هوا به‌طور پیوسته دمیده شد. برای بررسی تغییرات به وجود آمده در ماده رنگزا از روش‌های طیف‌سنجی جذبی و کروماتوگرافی جداسازی براساس اندازه[1] استفاده شد.کروماتوگرافی جداسازی وزنی توسط HPLC Pump 64, Autosampler UV Photometer, RI detector K-2301 (Knauer) انجام شد. همچنین برای بررسی سینتیک اکسایش ماده رنگزا در حضور لاکاز، تغییرات مقدار اکسیژن محلول با استفاده از دستگاه اندازه‌گیر اکسیژن محلول در آب HQ30d Portable Meter Kit (Hacht) تعیین شد.

۲ـ۲ـ۳ـ رنگرزی و عمل نمودن پارچه پشمی با لاکاز

پارچه پشمی به مدت ۱٫۵ ساعت در دمای ۸۵ ºC در محلول ماده رنگزا با *L:G*=۵۰:۱ قرارداده شد. برای جداکردن مواد رنگزای سطحی، کالا در محلول حاوی ۱٪ شوینده غیریونی، با *L:G*=۲۰:۱ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴۰ ºC شسته و سپس در دو مرحله آبکشی شد [۳۱].

برای بررسی اثر لاکاز بر رنگرزی، پارچه پشمی رنگرزی شده در محلول بافر pH=۵ و ۰٫۱ *g/l* لاکاز به مدت ۹۰ دقیقه عمل شد و سپس برای جدا کردن رنگ‌های سطحی در محلول حاوی ۰٫۵٪ شوینده غیریونی و ۰٫۵٪ شوینده آنیونی و با نسبت ۲۰ برابر حجم حمام به وزن کالا به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴۰ ºC شسته شده و پس از دو مرحله آبکشی دردمای محیط خشک گردید.

۲ـ۲ـ۴ـ بررسی تغییرات ایجاد شده در رنگ

با استفاده ازدستگاه رنگ‌سنج انعکاسی Colorimeter CS-5 (Applied colour system)، منحنی انعکاسی نمونه‌ها در بازه ۷۰۰-۴۰۰ نانومتر با فواصل ۱۰*nm* اندازه‌گیری شد. با استفاده از رابطه ۳ (کیوبلکا مانک) مقدارقدرت رنگی پارچه (K/S) درکمترین مقدار انعکاس تعیین شد.

$$K/S = (1 - R)^2/2R \qquad (۳)$$

در این رابطه K ضریب جذب، S ضریب تفرق و R انعکاس نمونه می‌باشد. مقدار K/S در طول موجی که جسم پشت پوش کمترین مقدار انعکاس را دارد قدرت رنگی را نشان می‌دهد. مقادیر معرفه‌های رنگی هر نمونه تحت منبع نوری D_{65} در فضای رنگی $L^*a^*b^*$ اندازه گیری شد. در این سیستم رنگی L^* درجه روشنایی، a^* درجه قرمزی یا سبزی و b^* درجه آبی یا زردی را نشان می‌دهند.

برای اندازه‌گیری مقدار رنگ تثبیت شده بر کالا، هر نمونه با یک نمونه هم وزن از پارچه پشمی رنگ نشده در محلول دارای ۲٫۵ ٪ شوینده غیریونی و ۲٫۵ ٪ شوینده آنیونی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰ ºC با نسبت حجم حمام به وزن کالا ۲۰ شسته شد و پس از آبکشی و خشک کردن نمونه در دمای محیط، مشخصات رنگی آن توسط کالریمتر انعکاسی اندازه‌گیری شد. درصد رنگ تثبیت شده بر کالا (%F) با توجه به رابطه ۴ محاسبه شد که $(K/S)_a$ و $(K/S)_b$ مقدار (K/S) نمونه قبل و بعد از شستشو را نشان می‌دهند [۳۲, ۲۱].

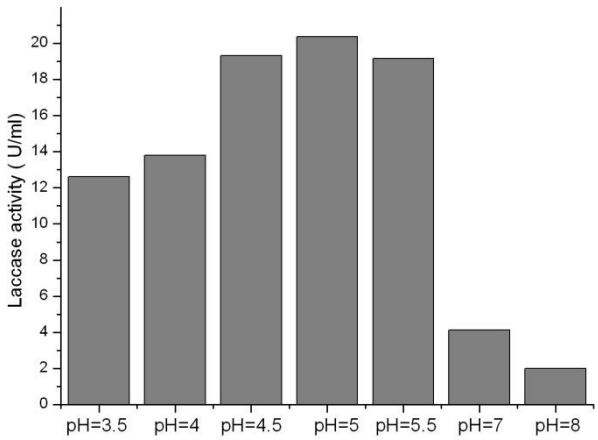
$$\%F = ((K/S)_a / (K/S)_b) \times 100 \qquad (۴)$$

طیف‌سنج تبدیل فوریه زیرقرمز برای بررسی نوع پیوند ایجاد شده بین ماده رنگزا و پشم استفاده شد. طیف‌سنجی زیر قرمز توسط دستگاه Perkin Elmer Spectrum 100 series (Perkin) انجام گردید. طیف‌های زیرقرمز قبل از بررسی با توجه به قله ۱۲۳۰ cm^{-1} مرتبط با آمید نوع اول نرمالایز شدند [۳۳].

۳ـ نتایج و بحث

۳ـ۱ـ مقایسه فعالیت لاکاز در pHهای مختلف

فعالیت ۰٫۱ *g/l* لاکاز در محلول با pH مختلف اندازه‌گیری شد. نتایج (شکل ۱) نشان می‌دهد که بیشترین فعالیت آنزیم در pH بین ۴٫۵ تا ۵٫۵ است. فعالیت آنزیم در pH خنثی و قلیایی به شدت کم شده است. در محدوده قلیایی یون‌های هیدروکسیل به عنوان یک بازدارنده عمل می‌کنند. به علاوه پیوند هیدروژنی در ساختار آنزیم ممکن است با تغییر pH تحت تاثیر قرار گرفته و فعالیت آنزیم کاهش یابد. با توجه به نتایج، عملیات آنزیمی در محلول بافر استات ۰٫۱ N با pH=۵ دنبال شده است.



شکل ۱: فعالیت لاکاز در pH های مختلف.

1- Size-exclusion chromatography

۳ـ۲ـ بررسی تاثیر لاکاز بر اسپرک

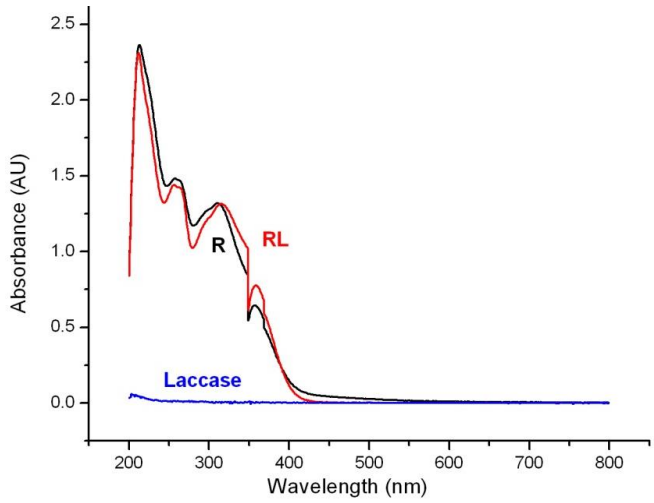
طیف جذبی مواد رنگزای اسپرک قبل و بعد از عمل با لاکاز در شکل ۲ آورده شده است. در طیف ماده رنگزای اسپرک قله‌هایی در ۲۱۳*nm*، ۲۵۷*nm*، ۳۱۱*nm* و ۳۵۸*nm* مشاهده می‌شود. پس از عمل با لاکاز شدت جذب در محدوده ۳۱۰-۳۹۰*nm* بیشتر شده و شدت قله ۳۵۸*nm* افزایش یافته است که به دلیل بسپارش اکسایشی پلی‌فنل‌ها به واسطه لاکاز می‌باشد [۳۸- ۳۴، ۲۸، ۲۷]. جفت شدن اکسایشی منجر به ایجاد ترکیب‌های با وزن مولکولی زیاد می‌شود که به دلیل داشتن ساختارهای بزرگ مزدوج در طول زنجیر و جذب نور در محدوده ۳۰۰-۴۰۰*nm* پررنگ می‌باشند [۲۷]. شکل ۲ محلول ماده رنگزا قبل و بعد از عمل با لاکاز را نیز نشان می‌دهند. رنگ محلول پس از عمل با لاکاز از زرد به قهوه‌ای تغییر کرده که نشان دهنده تشکیل رنگدانه‌های رنگی در اثر جفت‌شدن اکسایشی است. این واکنش‌ها در بیوسنتز لیگنین، تانن‌ها و ملانین‌ها گزارش شده‌اند [۳۹، ۳۶].

همچنین تغییر رنگ فلاونویید‌ها به دلیل واکنش بسپارش اکسایشی کاتالیست شده با لاکاز از زرد به قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره گزارش شده است [۲۷]. در اثر لاکاز پلی‌فنل‌های دارای ساختار اورتو- دی هیدروکسی به کینون‌ها تبدیل شده که بلافاصله پلیمریزه شده و ترکیبات بسیار پیچیده با وزن مولکولی زیاد و یا رنگدانه‌های قهوه‌ای را تولید می‌کنند [۲۷].

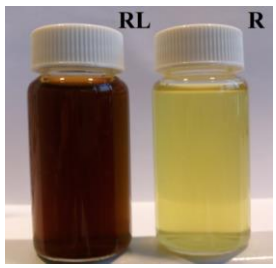
لاکاز می‌تواند اکسایش اورتو و پارادی فنل‌ها، آمینوفنل‌ها، پلی‌فنل‌ها، پلی‌آمین‌ها، لیگنین‌ها، آریل دی‌آمین‌ها و برخی یون‌های غیرآلی را با احیاء مولکول اکسیژن به آب کاتالیست کند که در اثر این واکنش‌ها اکسیژن محلول مصرف می‌شود [۴۰]. تغییر مقدار اکسیژن محلول ماده رنگزای طبیعی در حضور لاکاز با بافر pH=۵ و دمای ۴۵ °C اندازه‌گیری شد. اکسیژن محلول اسپرک پس از افزودن لاکاز به سرعت مصرف شده (شکل ۳ الف) که نشان می‌دهد اسپرک پیش ماده مناسبی برای لاکاز است.

شکل ۳ ب نشان می‌دهد که: ۱- در غلظت ثابت لاکاز، سرعت مصرف اکسیژن با افزایش غلظت ماده رنگزا بیشتر شده که تاییدکننده انجام واکنش اکسایش ماده رنگزا با لاکاز است [۴۱]؛ ۲- در غلظت ثابت ماده رنگزا، سرعت مصرف اکسیژن با افزایش غلظت لاکاز بیشتر شده و با افزایش غلظت ماده رنگزا مقدار بیشتری از لاکاز برای مصرف اکسیژن محلول لازم بوده است. بنابراین پیشرفت واکنش کاتالیز شده به غلظت ماده رنگزا و لاکاز وابسته است [۴۲].

نسبت لازم لاکاز به اسپرک برای پیشرفت کامل واکنش با توجه به شکل ۴ محاسبه شده است. برای اندازه‌گیری مقدار ماده رنگزا که موجب مصرف کل اکسیژن محلول می‌شود، لاکاز به مقدار بیش از انتظار به محلول اضافه شده است. با توجه به شکل ۴ الف غلظت ۰٫۶ g/l اسپرک موجب مصرف کل اکسیژن محلول می‌شود. تصویر ۴ ب نشان می‌دهد که در این غلظت ماده رنگزا، مقدار $۲٫۳۷۵\times۱۰^{-۳}$ g/l لاکاز کافی است. براساس محاسبات، کمینه نسبت لازم از لاکاز به اسپرک برای پیشرفت کامل واکنش $۹٫۷۵\times۱۰^{-۳}$ به دست آمده است.

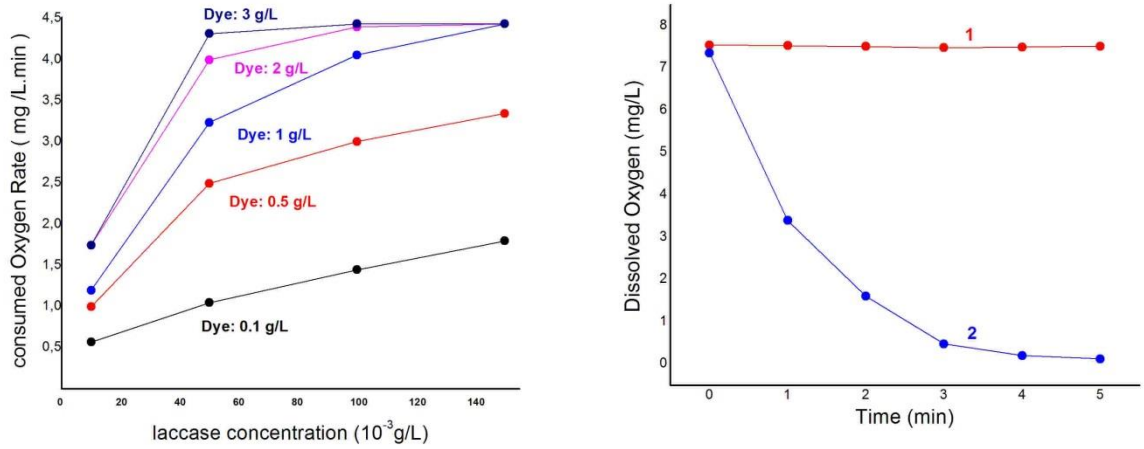


الف



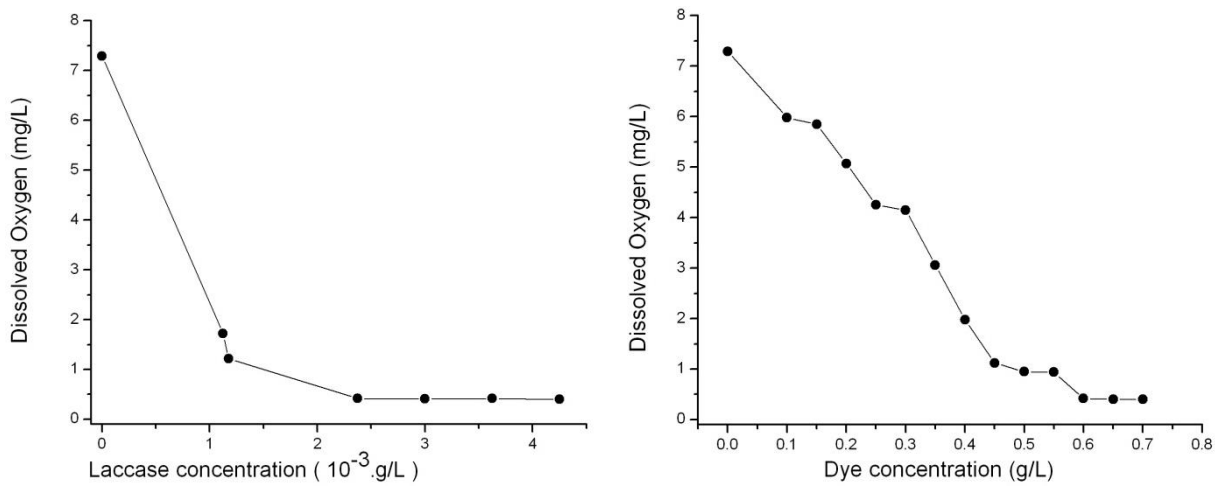
ب

شکل ۲: الف) طیف جذبی اسپرک (R) و اسپرک عمل شده با لاکاز (RL) و لاکاز (Laccase) و ب) تصویر اسپرک (R) و اسپرک عمل شده با لاکاز (RL).



ب الف

شکل ۳: الف) تغییرات غلظت اکسیژن در محلول ۱) ۲٫۵ g/l اسپرک ۲) ۲٫۵ g/l اسپرک و ۰٫۱ g/l لاکاز و ب) سرعت مصرف اکسیژن محلول با غلظت مختلف اسپرک و لاکاز



ب الف

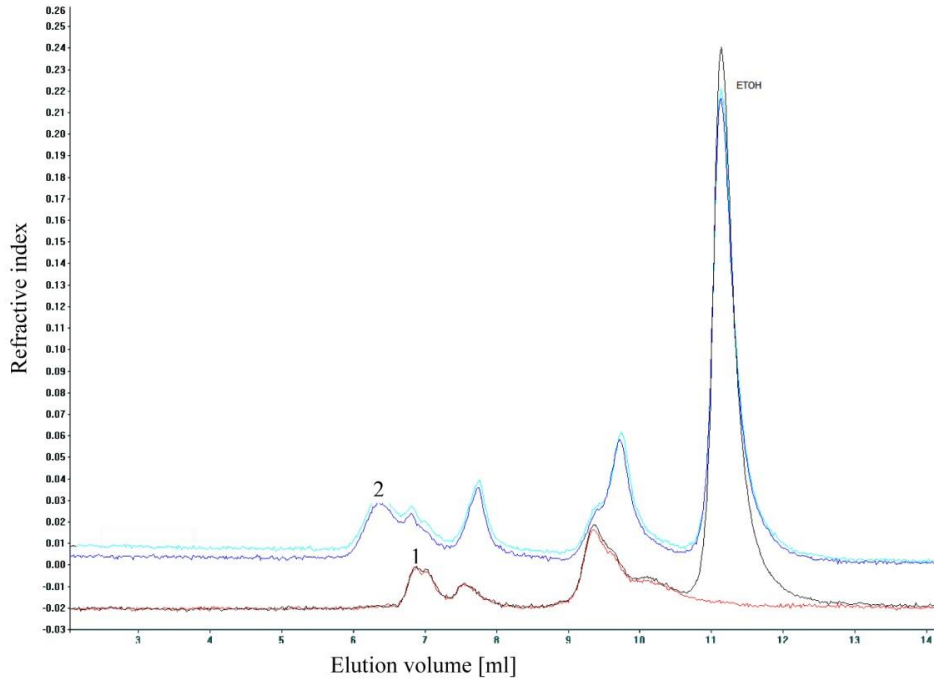
شکل ۴: الف) غلظت اکسیژن در محلول *g/l* ۰٫۳ لاکاز با غلظت مختلف اسپرک و ب) غلظت اکسیژن در محلول *g/l* ۰٫۶ اسپرک با غلظت مختلف لاکاز.

کروماتوگرافی جداسازی براساس اندازه[1] یک روش کروماتوگرافی است که مولکول‌ها بر اساس اندازه و وزن مولکولی جدا می‌شوند [۴۳]. تصویر ۵ کروماتوگرافی ماده رنگزای اسپرک قبل و بعد از عمل با لاکاز را نشان می‌دهد. وزن مولکولی قله بیشینه با توجه به استاندارد محاسبه شده و افزایش وزن مولکولی پس از عمل با لاکاز تا ۳ برابر وزن اولیه مشاهده شده است. این افزایش به دلیل انجام واکنش بسپارش به دلیل کاربرد لاکاز به همراه ترکیبات پلی‌فنلی است [۴۶-۴۴].

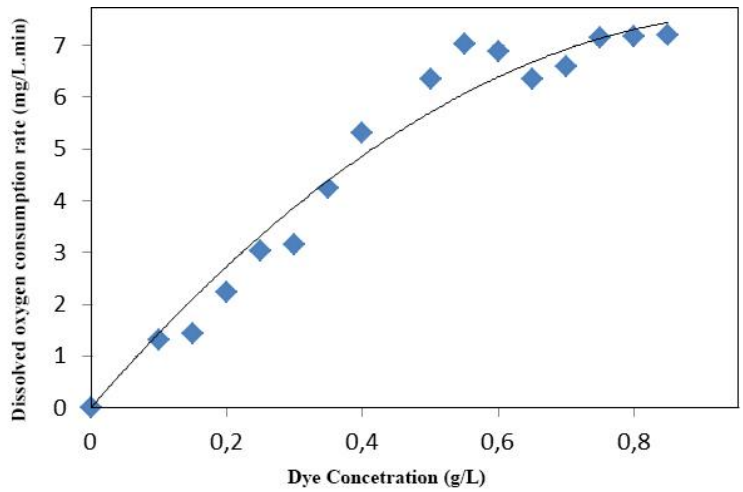
1- Size-Exclusion Choromatography

۳ـ۳ـ سنتیک واکنش اکسایش اسپرک با لاکاز

سنتیک واکنش آنزیمی، با اندازه‌گیری سرعت واکنش اکسایش ماده رنگزا در حضور لاکاز و با توجه به سرعت مصرف اکسیژن محلول و فرض تاثیرگذار نبودن غلظت اکسیژن محلول در سرعت اولیه واکنش بررسی شده است [۱۷]. تغییر سرعت واکنش آنزیمی در برابر غلظت پیش ماده با مقدار ثابت آنزیم و منحنی حاصل از رگرسیون در شکل ۶ آمده است. رگرسیون این منحنی با توجه به اعداد به دست آمده از اندازه‌گیری سرعت مصرف اکسیژن در غلظت‌های مختلف ماده رنگزا انجام شده است.



شکل ۵: کروماتوگرافی جداسازی براساس اندازه ۱) اسپرک و ۲) اسپرک عمل شده با لاکاز.



شکل ۶: سرعت واکنش در برابر غلظت اسپرک.

مدل سنتیکی میکائلیس- منتن[1] (رابطه ۵) شناخته‌شده‌ترین مدلی است که برای بررسی سینتیک واکنش‌های آنزیمی استفاده می‌شود. محاسبات مشخصه‌های سنتیک در یک غلظت ثابت از آنزیم انجام می‌شود. K_m ثابت تعادلی میکائلیس- منتن[2] و V_{max} بیشینه سرعت واکنش اکسایش است [۴۷]. K_m غلظت پیش ماده (ماده رنگزا) در هنگام نصف سرعت بیشینه واکنش ($\frac{Vmax}{2}$) می‌باشد. مقادیر این دو با توجه به رابطه ۶ و شیب و عرض از مبدا خط حاصل از مقادیر $\frac{1}{[V]}$ در برابر $\frac{1}{[S]}$ محاسبه و در جدول ۳ آورده شده است. اهمیت محاسبه V_{max} و K_m در آن است که با داشتن این مقادیر می‌توان سرعت واکنش را در هر مقدار از پیش‌ماده بدست آورد. از سویی مقدار K_m با تمایل[3] آنزیم و پیش‌ماده رابطه عکس دارد به‌طوری که مقدارکمتر K_m تمایل

1- Michaelis-Menten
2- Michaelis–Menten saturation constant
3- Affinity

بیشتر آنزیم به پیش‌ماده را نشان می‌دهد [۴۷].

$$V = Vmax.\frac{[S]}{[S]+Km} \quad (۵)$$

$$\frac{1}{[V]} = \frac{Km}{Vmax}.\frac{1}{[S]} + \frac{1}{[Vmax]} \quad (۶)$$

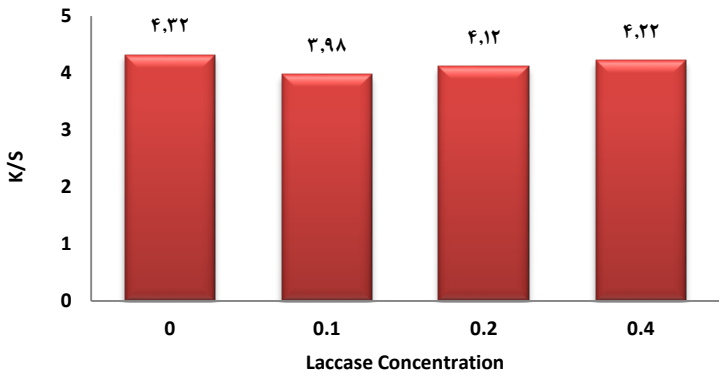
جدول ۳: مشخصه‌های سینتیک واکنش اکسایش اسپرک توسط لاکاز.

K_m (mg/l)	V_{max} (mg/l.min)
۲۹۳	۷,۶۱

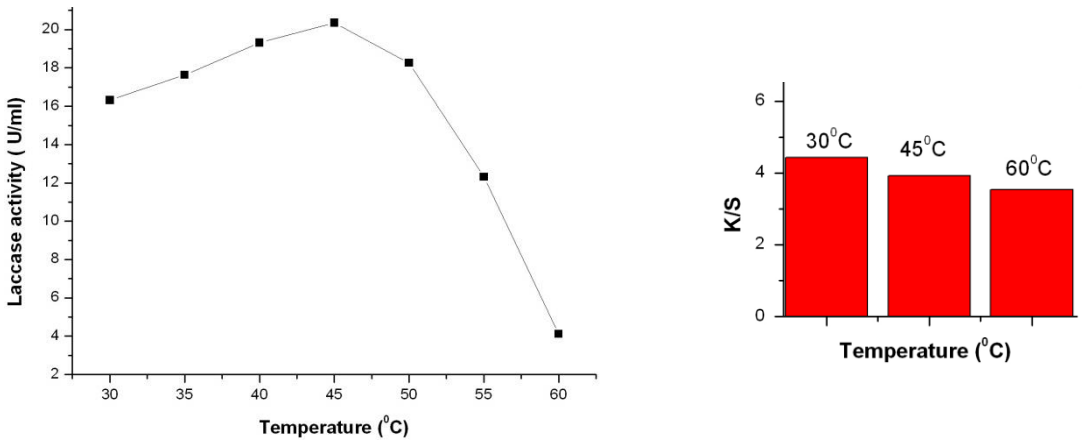
۳ـ۴ـ اثر لاکاز بر رنگرزی پشم با اسپرک

استفاده از لاکاز به عنوان یک ترکیب زیست‌سازگار و یک ماده موثر در پیوند ماده رنگزای طبیعی به لیف مناسب به نظر می‌رسد. انتظار می‌رود که مواد رنگزای طبیعی پلی‌فنل با ساختارهای آروماتیک اورتو یا پارا دی‌هیدروکسی که در ماده رنگزای انتخاب شده به وفور یافت می‌شوند بوسیله لاکاز به لیف پشم پیوند شوند [۵-۱]. نتایج اندازه‌گیری قدرت رنگی در شکل ۷ آمده است. پس از عمل کردن پشم رنگرزی شده در محلول لاکاز، قدرت رنگی به مقدار جزئی کاهش یافته است. افزایش غلظت لاکاز تاثیر چندانی بر قدرت رنگی نداشته است.

تاثیر دمای محلول لاکاز بر قدرت رنگی در شکل ۸ آمده است. با افزایش دما قدرت رنگی کاهش بیشتری یافته است. بیشترین کاهش قدرت رنگی در دمای ۶۰ °C و در شرایط کمینه فعالیت لاکاز رخ داده که نشان می‌دهد کاهش قدرت رنگی به دلیل تاثیر لاکاز بر ماده رنگزا نیست و چون با افزایش دما رابطه مستقیم دارد می‌تواند به دلیل خروج مولکول‌های ماده رنگزا به محلول باشد.



شکل ۷: قدرت رنگی پشم رنگرزی شده با اسپرک پس از عمل در غلظت‌های مختلف لاکاز در دمای ۴۵ °C



الف ب

شکل ۸: (الف) قدرت رنگی پشم رنگرزی شده با اسپرک پس از عمل در محلول لاکاز در دماهای ۳۰°C، ۴۵ °C و ۶۰ °C و (ب) فعالیت لاکاز در دماهای مختلف.

چنانچه جدول ۴ نشان می‌دهد رنگ کالای رنگرزی شده با عملیات در محلول لاکاز قهوه‌ای شده است. همچنین درصد تثبیت رنگ و ثبات شستشویی نمونه رنگرزی شده با اسپرک با عمل نمودن در لاکاز افزایش یافته است. این افزایش می‌تواند به دو دلیل باشد:

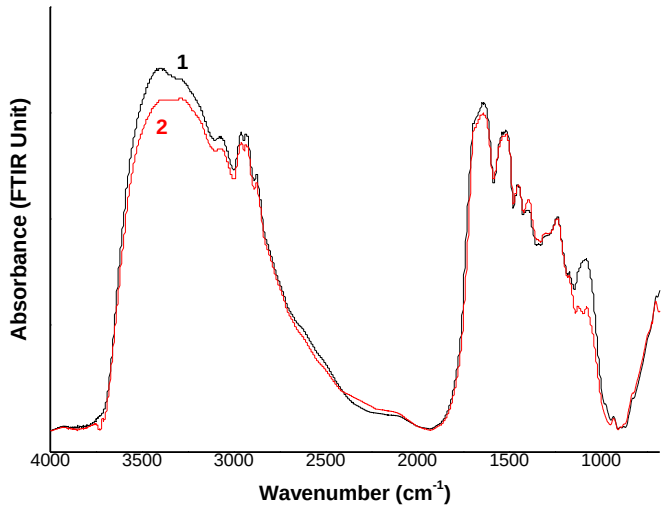
۱ـ اندازه مولکول ماده رنگزا در داخل لیف به دلیل بسپارش بزرگ‌تر شده که درنتیجه حلالیت و خروج آن کاهش یافته است. ساختار پلی‌فنلی ماده رنگزای اسپرک شناخته شده ولاکاز قادر به اکسایش ترکیب پلی‌فنلی به کینون‌های مربوطه است. گونه‌های کینونی بسیار فعال هستند که با هم واکنش داده و ترکیب بسپاری با وزن مولکولی زیاد تولید می‌کند که حلالیت کمتری نسبت به ترکیب اولیه دارد [۱۳، ۳۰، ۳۹].

۲ـ لاکاز سبب اتصال ماده رنگزا به پشم می‌شود. با توجه به ساختار پلی فنولی تشکیل دهنده ماده رنگزای اسپرک، لاکاز موجب اکسایش آنها به کینون‌های مربوط شده است. گونه‌های کینونی ماده رنگزا که به واسطه لاکاز تولید می‌شوند می‌توانند با واکنش افزایشی مایکل با گروه‌های هسته‌دوست ترکیبات پروتئینی پیوند یابند [۴۴، ۴۸، ۴۹]. اکسایش گروه‌های فنولی و تغییر در سیستم مزدوج ماده رنگزا موجب تغییر در رنگ نهایی می‌شود. در اثر لاکاز مقدار قرمزی پشم رنگرزی شده افزایش و مقدار زردی آن کاهش یافته است. مقدار روشنایی نیز کاهش یافته که می‌تواند به دلیل مهاجرت مولکول‌های رنگزا به محلول آنزیم باشد. تغییر رنگ پنبه از سفید به قهوه ای به دلیل اثر لاکاز بر فلاونوییدهای آن گزارش شده است [۲۷]. در اینجا نیز لاکاز با اکسایش پلی‌فنل‌های ماده رنگزای طبیعی جذب شده به پشم موجب تغییر رنگ شده است.

شکل ۹ طیف FT-IR پشم رنگرزی شده را قبل و بعد از عمل با لاکاز نشان می دهد. در اثر عمل کردن پشم رنگرزی شده با لاکاز شدت جذب در ناحیه $۳۳۰۰ cm^{-1}$ تا $۳۵۰۰ cm^{-1}$ مربوط به ارتعاشات کششی N-H آمین نوع اول کاهش یافته است. این کاهش می‌تواند نشانگر کاهش تعداد آمین‌های نوع اول و تبدیل آن‌ها به آمین نوع دوم در اثر واکنش بین ماده رنگزا و پشم باشد [۱۶، ۵۰]. آمین‌های نوع دوم شدت جذب ضعیف تری نسبت به آمین‌های نوع اول دارند. جذب در محدوده $۱۲۲۰ cm^{-1}$ مربوط به C-O ترکیبات فنولی است. به دلیل مجاورت با کربن‌های غیراشباع فرکانس جذب C-O کاهش یافته است [۵۱]. کاهش شدت این محدوده نشان می‌دهد که گروه‌های هیدروکسیل فنلی پس از عمل با لاکاز کاهش یافته که با اکسایش آنها توسط لاکاز مطابقت دارد.

جدول ۴: درصد تثبیت رنگ و مشخصات رنگی پشم رنگرزی شده با اسپرک قبل و پس از عمل در لاکاز

نمونه	درصد تثبیت رنگ	ثبات شستشویی (تغییر رنگ)	ثبات شستشویی (لکه‌گذاری)	L^*	a^*	b^*
قبل از عمل در لاکاز	۲۱,۹	۱-۲	۱-۲	۷۶,۴۳	۰,۶۰	۳۶,۷۱
بعد از عمل در لاکاز	۹۰,۵	۴-۵	۴-۵	۷۲,۹۲	۷,۶۶	۲۹,۳۹



شکل ۹: طیف FT-IR پشم رنگرزی شده با اسپرک (۱) قبل و (۲) بعد از عمل با لاکاز.

۴ـ نتیجه‌گیری

ماده رنگزای اسپرک به دلیل داشتن ترکیبات پلی‌فنلی پیش‌ماده مناسبی برای اکسایش کاتالیست شده با لاکاز است که با واکنش با آن پررنگ شده و وزن مولکولی آن افزایش می‌یابد. عمل نمودن کالای رنگرزی شده با اسپرک در محلول آنزیم لاکاز سبب افزایش قدرت رنگی، درصد تثبیت رنگ و ثبات شستشویی شده است. نتایج حاصل شده احتمال ایجاد پیوند کوالانس بین ماده رنگزا و پشم در اثر وجود لاکاز به عنوان عامل موثر را تقویت می‌نماید.

۵ـ مراجع

1. D. Cristea, I. Bareau, Vilarem, Identification and quantitative HPLC analysis of the main flavonoids present in weld (Reseda luteola L.). *Dyes Pigm.* 57(2003), 267-272.
2. P. Vankar, Chemistry of natural dyes. Resonance, 5(2000), 73-80.
3. G. Favaro, Acidichromism and ionochromism of luteolin and apigenin, the main components of the naturally occurring yellow weld: A spectrophotometric and fluorimetric study. *J. Fluoresc*. 17(2007), 707-714
4. A. Villela, Fast chromatographic separation for the quantitation of the main flavone dyes in Reseda luteola (weld). *J. Chromatogr. A.*, 47(2011), 8544-8550.
5. H. Gaspar, Influence of soil fertility on dye flavonoids production in weld (Reseda luteola L.) accessions from Portugal. *J. Sep. Sci.* 32(2009), 4234-4240.
6. M. Vellard, The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. *Curr. Opin. Biotechnol*. 14(2003), 444-450.

۷. ف. نجاتی، ف. نجات زاده باراندوزی، ا. محوی، کاهش سمیت رنگ از پساب‌های صنعتی با استفاده از آنزیم هورس رادیش پراکسیداز تثبیت‌شده. *نشریه علمی پژوهشی علوم و فناوری رنگ*. (۱۳۹۲)۷،۱۴۲-۱۳۳.

۸. م. پروین زاده گشتی، ر. آصفی پور، آ. الماسیان، تاثیر آبکافت آنزیمی نایلون ۶۶ با استفاده از مخلوط آنزیم‌های پروتئاز و لیپاز بر رنگ‌پذیری. *نشریه علمی پژوهشی علوم و فناوری رنگ*. (۱۳۹۲)۷، ۱۹۳-۱۸۱.

۹. م. پروین زاده گشتی، بهبود رنگپذیری منسوج نایلون ۶ با استفاده از آنزیم لیپاز. *نشریه علمی پژوهشی علوم و فناوری رنگ*. (۱۳۸۷)۲، ۱۸۰-۱۷۱.

۱۰. م. منتظر، ف. داداشیان، ک. فرهودی، تأثیر آنزیم پروتئاز در شرایط اسیدی روی خواص و رنگ‌پذیری پارچه پشمی. *نشریه علمی پژوهشی علوم و فناوری رنگ*. (۱۳۸۸)۳، ۸۰-۷۳.

11. N. Aktas, A. Tanyolaç, Kinetics of laccase-catalyzed oxidative polymerization of catechol. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*. 22(2003), 61-69.

۱۲. ع. صادقیان مریان، م. منتظر، تاثیر کاربرد آنزیمهای لاکاز و سلولاز روی رنگ جین. *نشریه علمی پژوهشی علوم و فناوری رنگ*. (۱۳۸۸)۳، ۶۴-۵۳.

13. A. Bhattacharya, B. N. Misra, Grafting: a versatile means to modify polymers: Techniques, factors and applications. *Prog. Polym. Sci.* 29(2004), 767-814.
14. C. Díaz Blanco, Dyeing properties, synthesis, isolation and characterization of an in situ generated phenolic pigment, covalently bound to cotton. *Enzyme Microb. Technol.* 44(2009), 380-385.
15. K. M. G. Hossain, Enzyme-mediated coupling of a bi-functional phenolic compound onto wool to enhance its physical, mechanical and functional properties. *Enzyme Microb. Technol.* 46(2010), 326-330.
16. K. W. Wellington, P. Steenkamp, D. Brady, Diamination by N-coupling using a commercial laccase. *Bioorg. Med. Chem.* 18(2010), 1406-1414.
17. A. Zille, Laccase kinetics of degradation and coupling reactions. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 33(2005), 23-28.
18. T. Kudanga, Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: A review. *Enzyme Microb. Technol.* 48(2011), 195-208.
19. C. Silva, Antimicrobial and antioxidant linen via laccase-assisted grafting. *React. Funct. Polym.* 71(2011), 713-720.
20. H. Shin, G. Guebitz, A. Cavaco-Paulo, "In Situ" enzymatically prepared polymers for wool coloration. *Macromol. Mater. Eng*. 286(2001), 691-694.
21. H. Hadzhiyska, Laccase-assisted dyeing of cotton. *Biotechnol. Lett.* 28(2006), 755-759.
22. T. Tzanov, Effect of some process parameters in enzymatic dyeing of wool. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 111(2003), 1-13.
23. S. Y. Kim, Enzymatic polymerization on the surface of functionalized cellulose fibers. *Enzyme Microbial Technol.* 40(2007), 1782-1787.
24. M. Schroeder, Enzymatic coating of lignocellulosic surfaces with polyphenols. *Biotechnol. J*. 2(2007), 334-341.
25. K. E. Jeon JR, Laccase-catalysed polymeric dye synthesis from plant-derived phenols for potential application in hair dyeing: Enzymatic colourations driven by homo- or hetero-polymer synthesis. *Microbial Biotechnol.* 3(2010), 324-335.
26. R. C. Sha Sha Sun, Laccase-Catalyzed Dyeing and Finishing of Textiles with Gallic Acid. *Adv. Mater. Res*. 631(2013), 608-612.
27. S. Kim, Biological coloration of Flax fabrics with Flavonoids using Laccase from Trametes hirsuta. *Eng. Life Sci.* 8(2008), 324-330.
28. S. Kim, D. Moldes, A. Cavaco-Paulo, Laccases for enzymatic colouration of unbleached cotton. *Enzyme Microbial Technol.* 40(2007), 1788-1793.
29. J. C. Szilvia Hajdok, The Laccase-catalyzed domino reaction between catechols and heterocyclic 1,3-dicarbonyls and theunambiguous structure elucidation of the products by NMR spectroscopy and X-ray crystal structure analysis. *J. Org. Chem*. 74(2009), 7230-7237.
30. M. Calafell, Bio-catalyzed coloration of cellulose fibers. *Biocat. Biotransform*. 25(2007), 336-340.
31. A. Calvimontes, Soiling degree and cleanability of differently treated polyester textile materials. *Tenside Surfactants Detergents.* 42(2005), 17-22.
32. L. G. Angelini, Agronomic potential of Reseda luteola L. as new crop for natural dyes in textiles production. *Ind. Crops Prod.* 17(2003), 199-207.
33. Kh. M. Gaffar Hossaina, Enzyme-mediated coupling of a bi-functional phenolic compound onto wool to enhance its physical, mechanical and functional properties. *Enzyme. Microbial.*

Technol. 46(2010), 326-330.
34. A. D. Broadbent, Basic principles of textile coloration, Society of Dyers and Colourists, UK, 2001.
35. L. Pereira, Environmentally friendly bleaching of cotton using laccases. *Environ. Chem. Lett.* 3(2005), 66-69.
36. M. Kurisawa, Enzymatic synthesis and antioxidant properties of poly(rutin). *Biomacromolecules.* 4(2003), 1394-1399.
37. M. Kurisawa, Laccase-catalyzed synthesis and antioxidant property of poly(catechin). *Macromol. Biosci.* 3(2003), 758-764.
38. S. Jus, G. M. Guebitz, Tyrosinase-catalysed coating of wool fibres with different protein-based biomaterials. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 20(2009), 253-269.
39. S. Ghidouche, P. H. Ducrot, Mechanistic study on the enzymatic oxidation of flavonols. *Tetrahedron Lett.* 49(2008), 619-623.
40. V. Krastanov, Fungal Laccases (Review). *Bulgarian J. Agric. Sci.* 13(2007), 75-83.
41. K. M. G. Hossain, Multifunctional modification of wool using an enzymatic process in aqueous-organic media. *J. Biotechnol.* 141(2009), 58-63.
42. N. Aktas, Tanyolaç, Reaction conditions for laccase catalyzed polymerization of catechol. *Bioresour. Technol.* 87(2003), 209-214.
43. S. Paul-Dauphin, Probing Size exclusion mechanisms of complex hydrocarbon mixtures: the effect of altering eluent compositions. *Energy Fuels*. 21(2007), 3484-3489.
44. S. Kobayashi, A. Makino, Enzymatic polymer synthesis: an opportunity for green polymer chemistry. *Chem. Rev.* 109(2009), 5288-5353.
45. H. U. Shiro Kobayashi, Enzymatic polymerization. *Chem. Rev.* 101(2001), 3793-3818.
46. R. M. Desentis-Mendoza, Enzymatic polymerization of phenolic compounds using laccase and tyrosinase from ustilago maydis. *Biomacromolecules.* 7(2006), 1845-1854.
47. H. Ma, Laccase-catalyzed oxidation of phenolic compounds in organic media. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 57(2009), 89-95.
48. M. Božič, S. Gorgieva, V. Kokol, Laccase-mediated functionalization of chitosan by caffeic and gallic acids for modulating antioxidant and antimicrobial properties. *Carbohydr. Polym*. 87(2012), 2388-2398.
49. U. G. Spizzirri, Synthesis of antioxidant polymers by grafting of gallic acid and catechin on gelatin. *Biomacromolecules*. 10(2009), 1923-1930.
50. T. H. J. Niedermeyer, M. Lalk, Nuclear amination catalyzed by fungal laccases: Comparison of laccase catalyzed amination with known chemical routes to aminoquinones. *J. Mol. Catal. B: Enzym*. 45(2007), 113-117.
۵۱. ب. موثق، نگرشی بر طیف‌سنجی، انتشارات علمی و فنی، ۱۳۹۲.