Immobilization of Laccase Enzyme on Silica-Coated Iron Oxide Nanoparticles and Comparison of Stability and Activity of Free and Immobilized Laccase

Elham Razmi[1], Ahmad Jonidi Jafari[2,3], Ali Esrafili[3,4], Emad Dehghanifard [5,6], Roshanak Rezaei Kalantari[2,3*]

1. M.Sc, Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Research Center for Environmental Health Technology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Associate Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5. Assistant Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran
6. Research Center for Health, Safety and Environment (RCHSE), Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

**** E-mail: rezaei.r@iums.ac.ir***

Received: 26 Jun 2018 ; Accepted: 25 Sep 2018

ABSTRACT

Background: Laccase enzyme is capable of oxidizing many resistant and non-biodegradable environmental pollutants, so it has been studied frequently in recent years and is widely used in biodegradation of contaminants. Despite its abundant applicability, due to its short life span, non-recovery, thermal instability and instability in organic environments, its widespread use is very limited. The present study aimed to increase the stability of laccase by immobilizing it on silica coated iron oxide nanoparticles.

Materials and Methods: Fe_3O_4 nanoparticles were synthesized based on the co-precipitation method and after coating with silica, their surface was modified by amine groups. The enzyme was then immobilized by covalent binding using glutaraldehyde. Specifications of synthesized nanoparticles and immobilized enzyme were investigated using X-ray diffraction (XRD), Field Emission Scanning Electron Microscopy (FESEM), and Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX).

Results: Results of successful laccase immobilization on nanoparticles showed that laccase immobilization significantly increased storage and thermal stability, maintaining activity in a wider range of temperature and pH than free laccase.

Conclusion: The immobilization of laccase on silica-coated iron oxide nanoparticles can reduce the barriers and challenges of various enzymes by increasing its efficiency and stability.

Keywords*:* Laccase, Immobilization, Silica-coated iron oxide nanoparticles, Enzyme Activity

[Downloaded from jehe.abzums.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/jehe.6.1.111]

مجله مهندسی بهداشت محیط، پاییز ۱۳۹۷، سال ٦، شماره ۱: ۱۱۱-۱۲٤

تثبیت آنزیم لکاز بر روی نانوذرات اکسید آهن پوشیده با سیلیس و مقایسه پایداری و فعالیت آنزیم لکاز آزاد و تثبیت‌شده

الهام رزمی[۱]، احمد جنیدی جعفری[۲،۳]، علی اسرافیلی[۳،٤]، عماد دهقانی فرد[٥،٦]، روشنک رضایی کلانتری[۲،۳*]

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

[۲] استاد، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

[۳] مرکز تحقیقات تکنولوژی بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

[٤] دانشیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

[٥] استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

[٦] مرکز تحقیقات بهداشت، ایمنی و محیط (RCHSE)، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/٤/٥ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۳

چکیده

زمینه و هدف : آنزیم لکاز قادر به اکسید کردن بسیاری از آلاینده‌های زیست محیطی مقاوم و غیرقابل تجزیه بیولوژیکی می‌باشد، به همین جهت در سال‌های اخیر مورد مطالعات زیادی قرار گرفته است و به طور گسترده‌ای در زمینه تجزیه بیولوژیکی آلاینده‌ها استفاده می‌شود. به‌رغم قابلیت‌های کاربردی فراوان آن، به علت طول عمر کوتاه، عدم بازیابی، ناپایداری حرارتی و ناپایداری در محیط‌های آلی، استفاده گسترده از آن‌ها بسیار محدود شده است. مطالعه حاضر، با هدف افزایش پایداری لکاز توسط تثبیت آن بر روی نانوذرات اکسید آهن پوشش‌دار شده با سیلیس انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: نانوذرات Fe_3O_4 به روش هم‌ترسیبی سنتز شدند و پس از پوشش‌دار شدن با سیلیس، سطح آن‌ها توسط گروه‌های آمین اصلاح گردید. در ادامه تثبیت آنزیم به روش ایجاد پیوند کووالانسی با استفاده از گلوتارآلدهید انجام پذیرفت. مشخصات نانوذرات سنتز شده و آنزیم تثبیت‌شده به کمک تکنیک پراش اشعه ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FESEM) و طیف‌سنجی تفکیک انرژی (EDX) بررسی شد.

یافته‌ها : نتایج مطالعه تثبیت موفق لکاز بر روی نانوذرات را نشان داد ضمن اینکه تثبیت لکاز به‌طور چشمگیری سبب افزایش پایداری ذخیره‌سازی و حرارتی، حفظ فعالیت در محدوده وسیع‌تری از دما و pH در مقایسه با لکاز آزاد گردید.

نتیجه‌گیری: تثبیت لکاز بر روی نانوذرات اکسید آهن پوشش‌دار شده با سیلیس می‌تواند با افزایش کارآیی و پایداری آن، موانع و چالش‌های پیش روی کاربردهای متنوع این آنزیم را کاهش دهد.

کلمات کلیدی: لکاز، تثبیت، نانوذرات اکسید آهن پوشش‌دار شده با سیلیس، فعالیت آنزیم

* **نویسنده مسئول:** گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران
ایمیل: rezaei.r@iums.ac.ir - تلفن تماس: ۰۲۱-۸۸۶۰۷۹۴۶

[Downloaded from jehe.abzums.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/jehe.6.1.111]

مقدمه

لکازها (بنزن‌دی‌ال: اکسیژن اکسیدوردوکتاز، EC 1.10.3.2) آنزیم‌های برون سلولی و چند مسی هستند که متعلق به یک گروه بزرگ‌تر از آنزیم‌ها هستند که اصطلاحاً خانواده اکسیدازهای آبی چند مسی نامیده می‌شود. نام لکاز از محل اصلی پیدا شدن آن در ماده ترشح‌شده از یک درخت ژاپنی به نام *Rhus vernicifer* گزارش‌شده توسط Yoshid در ۱۸۸۳ برگرفته‌شده است. لکازها البته در گیاهان دیگر و نیز حشرات و باکتری‌ها نیز یافت می‌شوند، اما به‌طور گسترده در گونه‌های مختلف قارچی حضور دارند [۱،۲]. آنزیم‌های لکاز به دلیل توانایی اکسید کردن بسیاری از ترکیبات فنلی و غیرفنلی و همچنین تعداد زیادی از ترکیبات غیرقابل تجزیه بیولوژیکی مانند آفت‌کش‌ها، PAHs و رنگ‌ها، پتانسیل بالایی برای کاربرد در تصفیه فاضلاب‌ها و پاک‌سازی خاک‌های آلوده به این ترکیبات دارند. تجزیه آلاینده‌های کاتالیز شده توسط آنزیم‌ها به‌عنوان یک‌راه مقرون‌به‌صرفه و دوستدار محیط‌زیست و بسیار کارآمد مطرح می‌شود [۳-۵].

آنزیم‌ها پروتئین‌های قابل انحلال هستند که نمی‌توانند به‌آسانی مورد استفاده مجدد قرار گیرند. همچنین، آن‌ها در دماهای بالا، pH بسیار زیاد یا در حضور حلال‌های آلی، ناپایدار هستند [۶]. در حال حاضر، طول عمر کوتاه و عدم بازیابی آنزیم‌ها استفاده از آن‌ها را محدود کرده است. با توجه به اهمیتی که آنزیم لکاز در بیوتکنولوژی و کاربردهای فراوان آن در صنعت دارد بهبود پایداری این آنزیم می‌تواند کاربردهای عملی آن را بیشتر کند [۶،۷]. به‌منظور افزایش پایداری آنزیم‌ها ، روش‌های مختلفی ازجمله تثبیت آنزیم به کار برده می‌شود. تثبیت آنزیم می‌تواند موجب کاهش مقدار مصرفی آنزیم‌ها، افزایش طول عمر راکتورهای آنزیمی، قابلیت استفاده مجدد از آنزیم و کاهش هزینه‌های کاربردی شود. در تثبیت آنزیم ، مولکول‌های آنزیم از طریق جذب فیزیکی یا ایجاد اتصال کووالانسی با استفاده از مواد شیمیایی ازجمله گلوتارآلدهید بر روی بستری با سطح زیاد متصل شده و یا درون ژل یا ساختارهای میکروکپسول،کپسوله می‌شوند [۸،۹]. تاکنون مطالعات بسیار گسترده‌ای در مورد تثبیت لکاز بر روی بسترهای مختلف نظیر کربن فعال، سیلیکا، کائولینیت، بسترهای پلیمری و غشاها، دانه‌های پلی‌اکریلونیتریل، شیشه، کیتوزان و .... صورت گرفته است که هر کدام از این بسترها دارای مزایا و معایبی بوده است [۱۰،۱۱].اما اخیراً، فناوری نانو در بهبود روش‌های تثبیت آنزیم بسیار مؤثر بوده است.کاهش اندازه مواد حامل آنزیم سبب بهبود کارآیی آنزیم تثبیت‌شده می‌شود. درروش اتصال آنزیم به سطح، ذرات ریزتر می‌توانند سطح بزرگتری برای اتصال آنزیم‌ها فراهم کنند. استفاده از نانوذرات به‌عنوان بستر تثبیت آنزیم به علت نسبت سطح به حجم بسیار زیاد درنتیجه افزایش میزان بارگذاری آنزیم و حداقل محدودیت در نفوذ سوبسترا به سطح آنزیم، می‌تواند بسیار کارآمد باشد [۹،۱۲].

یکی از مشکلات استفاده از آنزیم‌ها ، جداسازی و بازیابی آنزیم تثبیت‌شده می‌باشد که تکنولوژی جداسازی مغناطیسی یک تکنولوژی نویدبخش می‌باشد. جداسازی و بازیابی آنزیم تثبیت‌شده بر روی نانوذرات مغناطیسی از محیط واکنش می‌تواند با استفاده از یک میدان مغناطیسی خارجی به‌آسانی انجام شود. در میان بسیاری از مواد نانوذرات اکسید آهن به دلیل خواص مغناطیسی قوی، سمیت کم و سازگاری زیستی با مواد بیولوژیکی بسیار مورد توجه می‌باشند و زمانی که برای تثبیت آنزیم مورداستفاده قرار گیرد، می‌تواند بر حالت چرخش الکترون محصول میانی در واکنش آنزیمی اثر بگذارد که

[Downloaded from jehe.abzums.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/jehe.6.1.111]

می‌تواند اثر مغناطیسی القاء شده ایجاد کند. و بنابراین اثر قابل‌توجهی بر فعال‌سازی آنزیم القاء می‌کند. فقط به دلیل القاء اثرات مغناطیس، آنزیم تثبیت‌شده بر نانوذرات مغناطیسی تحمل pH بالاتر دارد. علاوه بر این پایداری حرارتی، میزان پایداری آنزیم و فعالیت آنزیم در این حالت به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد [۹، ۱۳، ۱۴]. تشکیل پوشش سیلیکای عامل دار شده بر سطوح نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 می‌تواند مانع تجمعشان در مایع شود و پایداری شیمیایی و همچنین سازگاری زیستی آن‌ها را اصلاح کند. سطح هیدروفیل نانوذرات سیلیکا می‌تواند به اتصال آنزیم در محلول آبی کمک کند [۱۳]. از دیگر مزایای نانوذرات مغناطیسی سیلیس به عنوان بستر تثبیت آنزیم قابلیت استفاده مجدد بهتر آن‌ها در مقایسه با سایر بسترها و در نتیجه کاهش هزینه‌ها می‌باشد برای مثال، مطالعه‌ی قابلیت استفاده مجدد از لکاز تثبیت‌شده بر روی ژل آلژینات-ژلاتین توسط مقربی و همکاران نشان داد که بعد از ۷ دوره استفاده از آنزیم تثبیت‌شده میزان فعالیت باقی‌مانده لکاز به شدت کاهش یافت و حدود ۲۰٪ از فعالیت باقی‌مانده است [۱۵]. در حالی که مطالعه امین و همکاران بر روی قابلیت استفاده مجدد از لکاز تثبیت‌شده بر نانوذرات مغناطیسی سیلیس نشان داد میزان فعالیت باقی‌مانده بعد از ۱۱ بار استفاده مجدد تقریبا برابر ۷۱٪ بوده است [۱۶].

بر پایه آنچه یاد شد هدف از این مطالعه تثبیت آنزیم لکاز بر روی نانوذرات اکسید آهن پوشش‌دار شده با سیلیس به‌منظور رفع معایب و محدودیت‌های فوق‌الذکر آنزیم لکاز آزاد جهت کاربردهایی چون پالایش محیط‌زیست بوده است. در راستای این هدف، فعالیت و پایداری آنزیم لکاز آزاد و تثبیت‌شده بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

آنزیم لکاز حاصل از قارچ Trametes versicolor و 2,2-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) که به عنوان مدیاتور در مطالعه حاضر استفاده گردید و 3-aminopropyltrimethoxysilane(APTES) به‌منظور عامل دار کردن نانوذرات سنتز شده و همچنین گلوتارآلدهید ۲۵ ٪ به‌عنوان عامل ایجادکننده پیوند کووالانسی میان بستر و آنزیم در تثبیت لکاز از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شدند. $FeCl_2.4H_2O$ و $FeCl_3.6H_2O$ برای سنتز نانوذرات اکسید آهن ، Tetraethyl orthosilicate(TEOS) به‌عنوان منبع سیلیس در پوشش‌دار کردن نانوذرات اکسید آهن استفاده شد ، با درجه خلوص آزمایشگاهی از شرکت مرک تهیه گردید.

سنتز نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی(Fe_3O_4)

به‌منظور سنتز نانوذرات Fe_3O_4 بر اساس روش هم ترسیبی کلرید آهن ٦ آبِ ($FeCl_3.6H_2O$) و کلرید آهن چهار آبِ ($FeCl_2.4H_2O$) با نسبت مولی ۲ به ۱ به همراه ۲۰ میلی‌لیتر HCL و ۸۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، تحت گاز نیتروژن و دمای ۸۰ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت مخلوط شدند. سپس ۱٤۰میلی‌لیتر آمونیاک ($NH_3.H_2O$) به محلول حاصل اضافه گردید و به مدت ۲٤ ساعت به روی همزن قرار گرفت. پس از اتمام زمان اختلاط نانوذرات تشکیل‌شده(Fe_3O_4) با مگنت جداسازی شده و چند مرتبه با آب مقطر و اتانول شستشو داده شدند [۱٤].

پوشش‌دار کردن نانوذرات Fe_3O_4 با سیلیس

تترا اتیل اورتو سیلیکات (TEOS) به‌عنوان منبع سیلیس برای پوشش نانوذرات اکسید آهن استفاده گردید. به این منظور ۵ میلی‌لیتر از TEOS توسط اتانول به حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و بسیار آهسته با نانوذرات Fe_3O_4 به‌دست‌آمده از مرحله قبل بدون شرایط خلأ و گرمادهی مخلوط شدند. پس از ۲٤ ساعت اختلاط، نانوذرات حاصل

[Downloaded from jehe.abzums.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/jehe.6.1.111]

($Fe_3O_4@SiO_2$) چند مرتبه با آب مقطر و اتانول شستشو داده شدند [14].

آمین دار کردن نانوذرات $Fe_3O_4@SiO_2$

به‌منظور اصلاح سطح نانوذرات با گروه‌های آمین، محلول تولوئن و متانول با نسبت ۱ به ۱ (۳۰۰ میلی‌لیتر از هرکدام) و ۱۰ میلی‌لیتر از ۳-آمینو پروپیل تری اتوکسی سیلان (APTES) به ۳ گرم از نانوذرات مرحله قبل افزوده گردید و مخلوط حاصل به مدت ۳۰ تا ٤٥ دقیقه در حمام اولتراسونیک در دمای ۸۰ درجه سلسیوس جهت یکنواخت سازی و افزایش پراکندگی بیشتر نانوذرات قرار داده شد. پس‌ازآن مخلوط فوق‌الذکر به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۷۰ درجه سلسیوس و تحت گاز نیتروژن به روی همزن قرار گرفت. پس از اتمام زمان اختلاط نانوذرات $Fe_3O_4@SiO_2$-NH_2 با اتانول و آب شستشو داده شدند [14, 17].

تثبیت آنزیم لکاز بر روی نانوذرات $Fe_3O_4@SiO_2$-NH_2

تثبیت آنزیم با استفاده از محلول گلوتارآلدهید به‌عنوان عامل ایجادکننده پیوند کووالانسی میان بستر و آنزیم انجام شد. به این منظور ۱ میلی‌لیتر از محلول گلوتارآلدهید ۲/۵ ٪ به ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات (۰/۱ مولار) حاوی ۵۰ میلی‌گرم نانوذرات $Fe_3O_4@SiO_2$-NH_2 افزوده و به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر قرار گرفت پس‌ازآن نانوذرات توسط آهنربا جدا شده و سه مرتبه با آب مقطر و سه مرتبه با بافر فسفات به‌صورت یک‌درمیان شستشو داده شد تا گلوتارآلدهید اضافی حذف شود. پس از آن محلول آنزیم لکاز با غلظت ۰/٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به نانوذرات اضافه شده و به مدت ۸ ساعت در دمای ۵-۳ درجه سلسیوس به روی شیکر قرار داده شد. پس از اتمام زمان اختلاط نانوذرات با مگنت جدا شدند و با آب مقطر و بافر فسفات شستشو داده شده و در بافر فسفات در دمای ٤ درجه سلسیوس ذخیره شدند [12, 18].

تعیین مشخصات نانوذرات سنتزشده

مشخصات نانوذرات سنتزشده با روش‌های متداول در متون تعیین گردید. به‌منظور مطالعه‌ی ساختار کریستالی نانوذرات سنتز شده از تکنیک پراش اشعه ایکس (XRD) با استفاده از پرتو Cu Ka در ولتاژ ٤٠ kV و جریان ۳۰ mA بهره گرفته شد. مورفولوژی نانوذرات سنتزشده قبل و بعد از تثبیت آنزیم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FESEM) مدل MIRA3TESCAN-XMU مشاهده شد. همچنین ترکیب عناصر موجود در نانوذرات سنتز شده قبل و بعد از تثبیت لکاز با استفاده از طیف‌سنجی تفکیک انرژی (EDX) تعیین گردید.

سنجش فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت‌شده

فعالیت کاتالیستی آنزیم لکاز آزاد و تثبیت‌شده با استفاده از ABTS به‌عنوان سوبسترا تعیین شد. مخلوط واکنش حاوی ۲ میلی مولار ABTS و مقدار مناسب لکاز آزاد یا تثبیت‌شده در بافر فسفات در pH برابر ۵ آماده گردید و در دمای ۲۵درجه سلسیوس با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه انکوباسیون شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون، نانوذرات با استفاده از آهنربا از محلول جدا شدند و تغییر در میزان جذب در طول‌موج ٤٢٠ nm با دستگاه اسپکتروفتومتر CECIL UV/VIS مدل ۷۱۰۰ اندازه‌گیری شد. فعالیت لکاز با استفاده از ضریب خاموشی مولار برای ABTS برابر $36000 M^{-1} cm^{-1}$ محاسبه شد. یک واحد فعالیت آنزیم بیان‌کننده مقدار آنزیمی است که بتواند در شرایط pH برابر ۵ و دمای ۲۵ درجه سلسیوس یک میکرومول از سوبسترا را در یک دقیقه اکسید نماید [19].

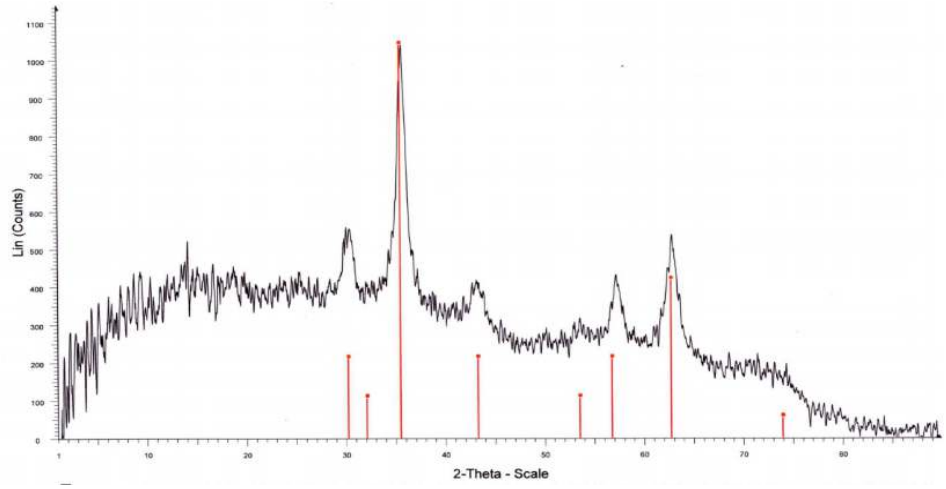
یافته‌ها

[Downloaded from jehe.abzums.ac.ir on 2026-11-13]

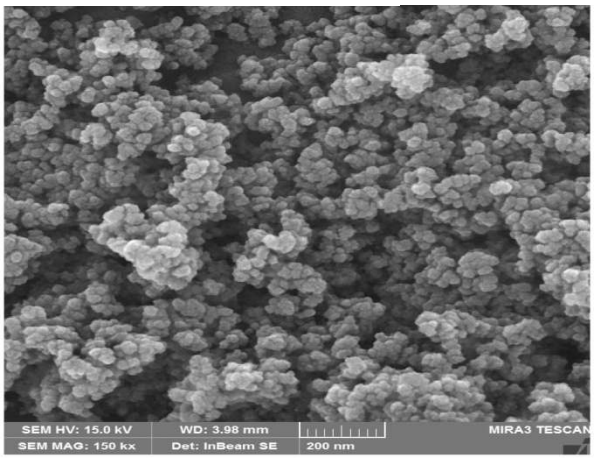
[DOI: 10.29252/jehe.6.1.111]

مشخصات نانوذرات سنتزشده

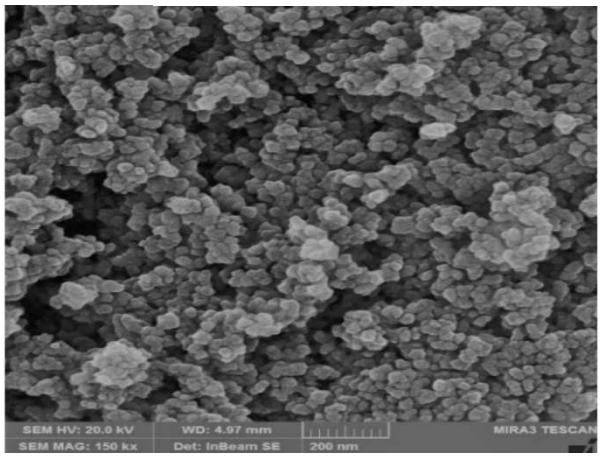
الگوی طیف پراش اشعه ایکس نـانوذرات $Fe_3O_4@SiO_2$ که نشان‌دهنده ساختار کریستالی نانوذرات سنتز شده می‌باشـد در شکل (۱) قابـل مشـاهده اسـت. در شـکل‌هـای (۲) و (۳) تصاویر FESEM نانوذرات سنتز شده به ترتیب قبل و بعـد از تثبیت آنزیم ارائه شده‌اند که نشان دهنده مورفولوژی نانوذرات سنتز شده می‌باشند. عناصر موجود در نانوذرات قبل و بعـد از تثبیت آنزیم توسط آنالیز EDX در شکل‌های (٤) و (٥) نشـان داده شده‌اند.



شکل ۱: الگوی طیف پراش اشعه ایکس نانوذرات $Fe_3O_4@SiO_2$



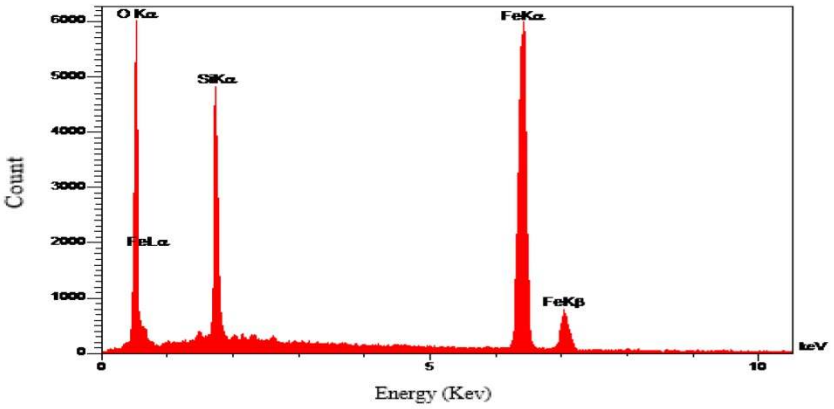
شکل ۲: تصویرFESEM نانوذرات $Fe_3O_4@SiO_2$ قبل از تثبیت لکاز



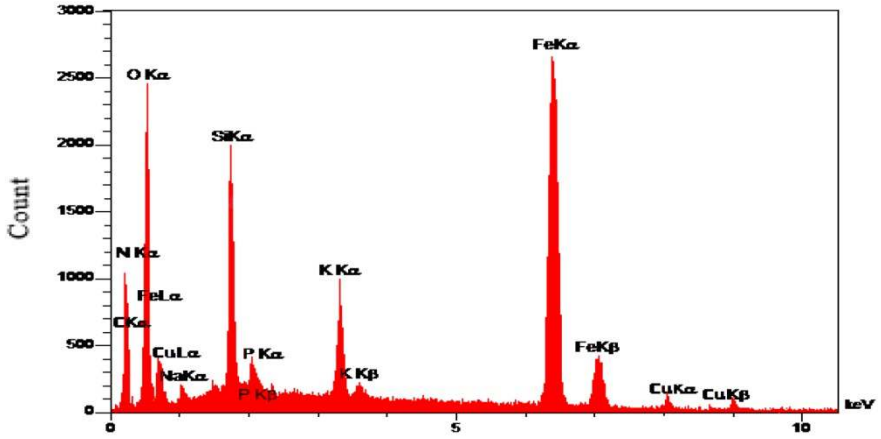
شکل ۳: تصویر FESEM نانوذرات $Fe_3O_4@SiO_2$ بعد از تثبیت لکاز

[Downloaded from jehe.abzums.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/jehe.6.1.111]



شکل ٤: طیف سنجی تفکیک انرژی قبل از تثبیت لکاز



شکل ۲: طیف سنجی تفکیک انرژی بعد از تثبیت لکاز

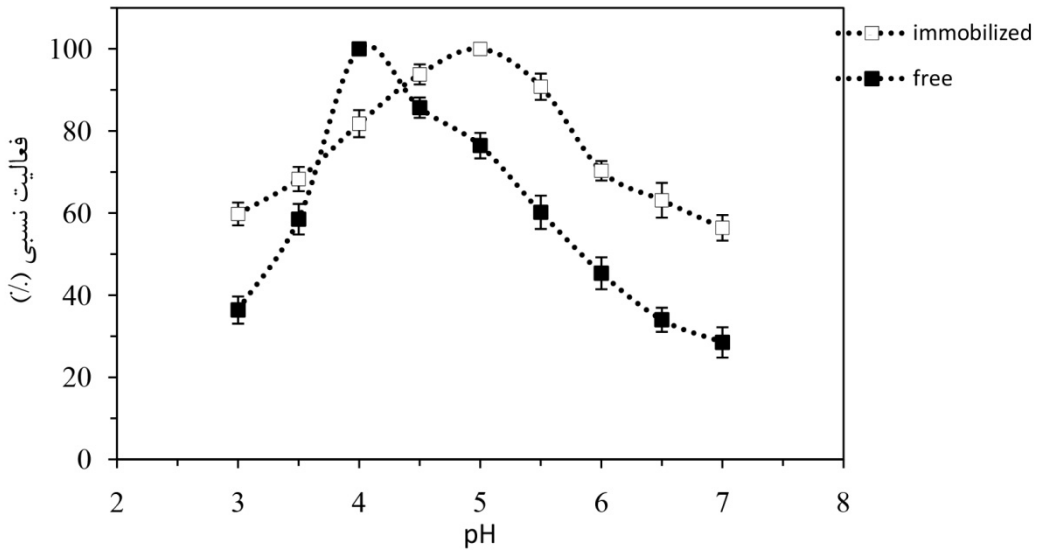
تأثیر pH و دما بر روی فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت‌شده

فعالیت کاتالیستی آنزیم‌ها به‌شدت تحت تأثیر pH و دما است به همین جهت روند تغییر فعالیت آنزیم در شرایط مختلف pH و دما ارزیابی شده است. تأثیر تغییرات pH بر فعالیت آنزیم، در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در محدوده pH برابر۳ تا ۷ سنجش شد. همچنین تأثیر دما بر فعالیت آنزیم لکاز آزاد و تثبیت‌شده، در pH برابر ۵ و در محدوده دمایی ۲۰ تا ۷۰ درجه سلسیوس اندازه‌گیری شد و نتایج حاصله به ترتیب در نمودارهای (۱) و (۲) گزارش‌شده است. طبق نمودارهای مذکور بیشینه فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت‌شده به ترتیب در pH برابر ٤ و ٥ و در دمای ٤٠ و ٥٠ درجه سلسیوس حاصل گردید.

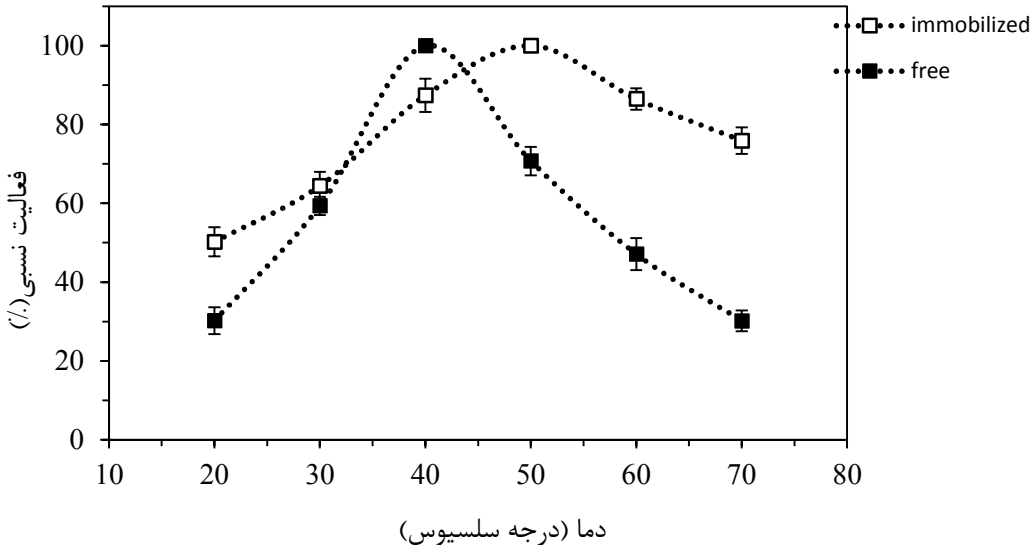
* **نویسنده مسئول:** گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران
ایمیل: rezaei.r@iums.ac.ir - تلفن تماس: ۰۲۱-۸۸۶۰۷۹۴۶

[Downloaded from jehe.abzums.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/jehe.6.1.111]



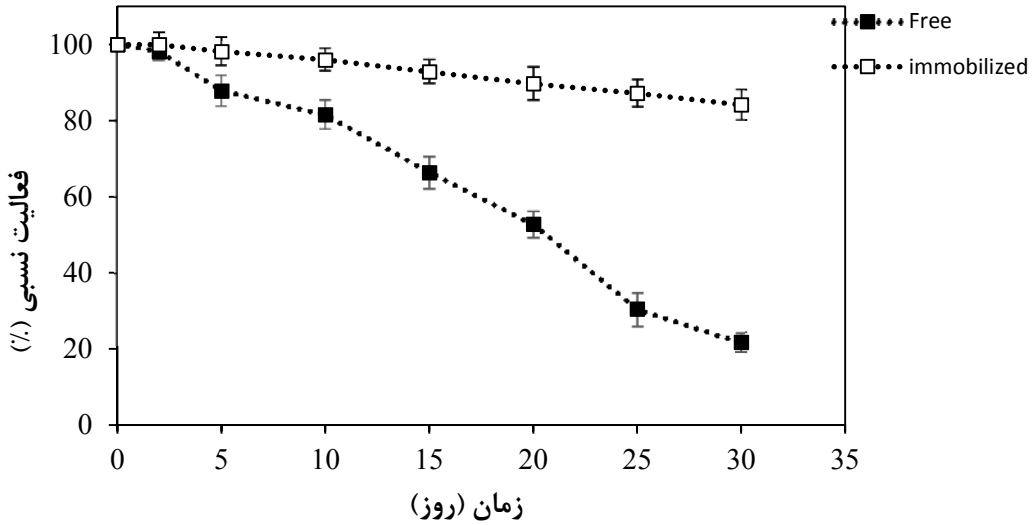
نمودار ۱: تأثیر pH بر فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده در دمای ۲۵ درجه سلسیوس



نمودار ۲: تأثیر دما بر فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده در pH برابر ۵

[Downloaded from jehe.abzums.ac.ir on 2026-11-13]

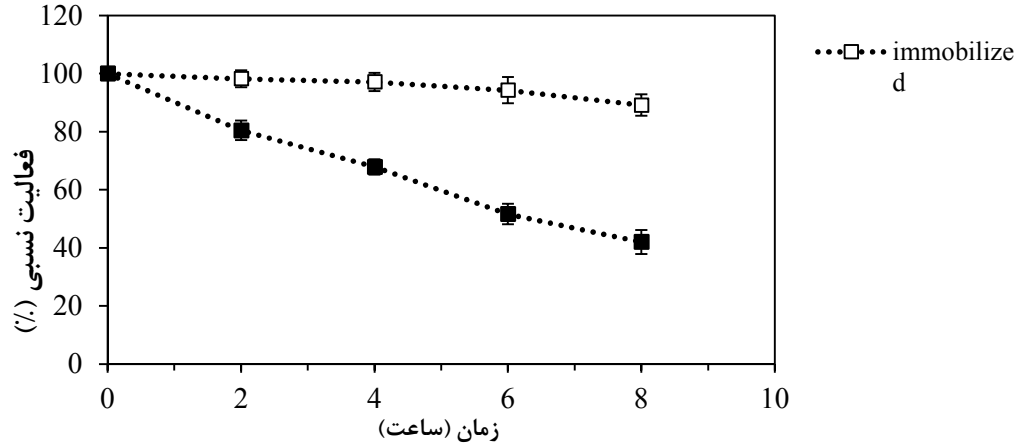
[DOI: 10.29252/jehe.6.1.111]



نمودار ۳: ثبات ذخیره سازی آنزیم آزاد و تثبیت شده

پایداری ذخیره‌سازی آنزیم آزاد و تثبیت‌شده

نمودار (۳)، نتایج ثبات ذخیره‌سازی در مدت ۳۰ روز را ارائه می‌نماید. جهت بررسی پایداری آنزیم آزاد و تثبیت‌شده در طی دوره ذخیره‌سازی در بافر فسفات (pH=۵، ۰/۱ M) در دمای ٤°C، فعالیت لکاز آزاد و تثبیت‌شده به‌طور روزانه موردسنجش قرار گرفت. بستر حاوی آنزیم تثبیت‌شده به‌طور روزانه برداشت‌شده و میزان فعالیت آن توسط محلول ABTS سنجیده شد. فعالیت باقی‌مانده بر اساس درصد فعالیت باقی‌مانده به اولیه گزارش شده است. بر اساس این نمودار آنزیم آزاد بعد از ۳۰ روز تقریباً ۲۰ ٪ از فعالیت اولیه را دارد درحالی‌که آنزیم تثبیت‌شده بیش از ۸۰ ٪ از فعالیت اولیه را حفظ نموده است.



نمودار ٤: پایداری حرارتی آنزیم آزاد و تثبیت شده در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و pH برابر ۵ در مدت ۸ ساعت

پایداری حرارتی آنزیم آزاد و تثبیت‌شده

بدین منظور فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت‌شده در فواصل

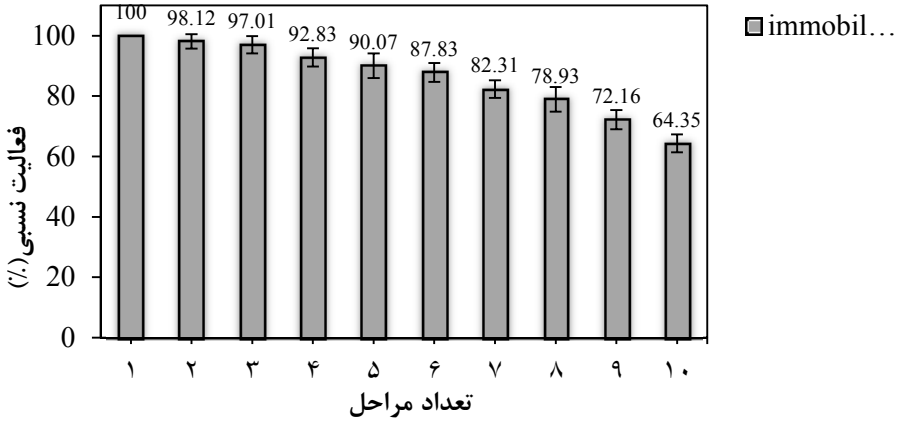
[Downloaded from jehe.abzums.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/jehe.6.1.111]

زمـانی ۲ سـاعت پـس از قـرار گـرفتن در دمـای ۵۰°C موردسـنجش قـرار گرفـت. در نمـودار (٤)، نتـایج پایـداری حرارتی آنزیم آزاد و تثبیت‌شده قابل‌مشاهده است. طبق نمودار مذکور آنزیم آزاد بعد از ۸ ساعت قرار گرفتن در دمـای ۵۰°C تقریباً ۷۰ ٪ از فعالیت اولیه را ازدست‌داده است درحالی‌کـه در آنزیم تثبیت‌شده تقریباً ۱۰ ٪ از فعالیت اولیه کاهش‌یافته است.

قابلیت استفاده مجدد آنزیم تثبیت‌شده

یکی از مهم‌ترین مزایای تثبیت آنزیم توانایی استفاده مجدد از آن است. به همین دلیل در این مطالعه نیز ایـن خصوصـیت آنزیم تثبیت‌شده نیز بررسی گردید. به این منظور تعداد دفعاتی که آنزیم تثبیت‌شـده قـادر بـه اکسیداسـیون ABTS بـه‌عنـوان سوبسـترا بـود، موردمطالعـه قـرار گرفـت. پـس از هـر بـار اکسیداسیون ABTS، آنزیم تثبیت‌شـده پـس از جداسـازی بـا استفاده از آهنربا، چند مرتبه توسط بـافر فسـفات و آب مقطـر شستشو داده شد و مجدداً در محلول تازه ABTS قرار گرفت. نتایج این بخش از مطالعه در نمودار ۵ گزارش‌شـده اسـت بـر اساس این نمودار پس از ۱۰ مرتبه استفاده از آنزیم تثبیت‌شـده تقریباً ٦٤٪ از فعالیت آنزیم باقی‌مانده است.



نمودار ۵: قابلیت استفاده مجدد آنزیم تثبیت شده

بحث

در شکل (۱) پیک‌های ایجاد شده در زوایای ۳۰/۲، ۳۲/۱، ۳۵/۷ ، ٤۳/۲، ٥٦/۸، ٦۲/۸، ۷٤ درجه طبق اسـتاندارد BS EN 13925-1: 2008 نشـان‌دهنـده کریسـتال‌هـای مکعبـی Fe_3O_4 می‌باشد. همچنین حداکثر پیک در زاویه ۳۵/۷ درجه مشـاهده مـی‌شـود. در پـژوهش Hu و همکـاران نتـایج آنـالیز XRD نانوذرات $Fe_3O_4@SiO_2$، ٦ پیک در محدوده ۲۰ تا ۷۰ درجـه منطبق با نتایج مطالعه حاضـر نشـان داد و بلنـدترین پیـک در زاویه ۳۵/۵۸ درجه مشاهده‌شده است. همچنین آن‌ها گـزارش کردند که هیچ پیک دیگری در این محدوده مشـاهده نکردنـد که نشان‌دهنـده سـاختار اسـپینل تـک فـاز نـانوذرات Fe_3O_4 می‌باشد [۲۰].در مطالعه Wang و همکاران نیز نتایج آنالیز XRD نانوذرات $Fe_3O_4@SiO_2$ مشـابه مطالعـه حاضـر گـزارش‌شـده است که مؤید ساختار اسپینل مکعبی بـرای نـانوذرات مـذکور می‌باشد [۱٤].

در شـکل (۲) کـه تصـویر SEM قبـل از تثبیـت را نشـان می‌دهد، مورفولوژی کروی نـانوذرات $Fe_3O_4@SiO_2$ و کمـی تراکم مشهود است. همچنین در شکل (۳) مشـاهده مـی‌شـود بعد از تثبیت آنزیم مورفولوژی نانوذرات تغییر نکرده است. در طیف‌سنجی EDX با اندازه‌گیری انرژی پرتوهای X منتشرشده از نمونه، امکان بررسی کمی و کیفی نمونه میسـر مـی‌شـود و می‌توان نوع و میزان عناصر موجود در نمونه را مشخص کرد .

[Downloaded from jehe.abzums.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/jehe.6.1.111]

شکل (٤) وجود عناصر آهن، اکسیژن و سیلیس را در نانوذرات سنتز شده تأیید می‌کند و در شکل (٥) مشاهده می‌شود که علاوه بر۳ عنصر فوق‌الذکر عناصر نیتروژن، کربن و مس نیز وجود دارند که این مطلب تصدیق حضور آنزیم بر روی نانوذرات $Fe_3O_4@SiO_2$ بعد از تثبیت آنزیم می‌باشد. حضور عناصر فسفر، پتاسیم و سدیم به دلیل بافر مورداستفاده می‌باشد [١٠].

تأثیر pH بر فعالیت لکاز آزاد و تثبیت‌شده

ازآنجاکه آنزیم‌ها پلیمرهای چند یونی هستند، انتظار می‌رود که pH، خواص آن‌ها را تحت تأثیر قرار دهد [٢١]. هرگونه تغییر شکل در ساختار آنزیم تحت شرایط اسیدی یا قلیایی منجر به کاهش فعالیت آنزیم خواهد شد [٢٢]. معمولاً روند تغییر فعالیت لکاز در pH های متفاوت دارای شکل زنگوله‌ای می‌باشد و لکازهای با منشأ متفاوت دارای pH اپتیمم در محدوده ١١-١ می‌باشند. اما اغلب لکازهای قارچی در pH اسیدی بهتر عمل می‌کنند [٢٣، ٢٤]. در اکسیداسیون فنل، pH بهینه برای لکاز استخراج‌شده از گیاهان، برابر ٩ و برای لکاز تولیدشده از قارچ ٧-٣ بوده است [٢٥]. نتایج مطالعه حاضر نیز منطبق با مطالب فوق می‌باشد. در نمودار (١) ملاحظه می‌گردد که فعالیت نسبی آنزیم لکاز آزاد و تثبیت‌شده در محدوده pH برابر ٣ تا ٧ از شکل زنگوله‌ای تبعیت می‌کند و حداکثر فعالیت لکاز آزاد و تثبیت‌شده به ترتیب در pH برابر ٤ و ٥، نمایان شده است. تغییر pH بهینه بعد از تثبیت به تعاملات یونی بین آنزیم و سطح بستر منسوب شده است [١٤، ٢٠]. همچنین نمودار (١) گویای این مطلب می‌باشد که آنزیم تثبیت‌شده نسبت به آنزیم آزاد کمتر تحت تأثیر تغییرات pH قرارگرفته است. دلیل مقاومت آنزیم تثبیت‌شده در برابر تغییرات pH، در متون مورد بررسی، وجود پیوند کووالانسی بین بستر و آنزیم ذکرشده است. پیوند کووالانسی ترکیب پایداری رابین مولکول‌های آمین سطح بستر و لکاز ایجاد می‌نماید که می‌تواند از دناتوراسیون اسیدی یا قلیایی آنزیم جلوگیری نماید [٢٠، ٢٦، ٢٧]. نتایج مشابهی در رابطه با فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت‌شده در متون گزارش‌شده است. در مطالعه Wang و همکاران حداکثر فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت‌شده بر روی نانوذرات مغناطیسی سیلیس مزوحفره به ترتیب در pH برابر ٤ و ٥ مشاهده شد [١٤]، Liu و همکاران نیز تغییر pH بهینه از ٣ برای آنزیم آزاد به ٤ برای آنزیم تثبیت‌شده بر روی نانوذرات کربن مزوحفره مغناطیسی را گزارش کردند همچنین آنزیم آزاد در pH برابر ٧ تقریباً ٩٠٪ فعالیت خود را از دست داد درحالی‌که آنزیم تثبیت‌شده فقط ٥٠٪ از فعالیتش را ازدست‌داده بود [٢٧]. در مطالعه دهقانی‌فرد و همکاران میزان فعالیت لکاز آزاد و تثبیت‌شده بر روی سیلیکای متخلخل در محدوده pH برابر ٨-٣ مقایسه گردید و نتایج آنها نشان داد بیشترین میزان فعالیت در هر دو حالت در pH اسیدی برابر ٥ به دست آمد و بنا به گزارش آنها در pH برابر ٨ در حالی که لکاز آزاد تقریبا غیرفعال گردیده، فعالیت نسبی آنزیم تثبیت شده برابر ٧٠-٦٠٪ بوده است [٢٨].

تأثیر دما بر فعالیت لکاز آزاد و تثبیت‌شده

نمودار (٢) نشان می‌دهد که حداکثر فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت‌شده به ترتیب در دمای ٤٠ و ٥٠ درجه سلسیوس مشاهده شد. علت افزایش دمای بهینه در حالت تثبیت‌شده می‌تواند به افزایش انرژی فعال‌سازی آنزیم برای پیوند به سوبسترا در حالت تثبیت‌شده نسبت داده شود. علاوه بر این، کاهش تحرک مولکولی آنزیم تثبیت‌شده منجر به حفظ فعالیت در محدوده دمایی وسیع‌تری می‌شود [١٤، ٢٠، ٢٢]. همان‌طور که در نمودار مذکور مشاهده می‌شود، آنزیم تثبیت‌شده دردمای ٧٠ °C بیش از ٧٠٪ فعالیت اولیه خود را حفظ کرده است، درحالی‌که برای آنزیم آزاد تنها ٣٠٪ از فعالیت اولیه در این دما باقی‌مانده است. Hu و همکاران نیز دمای اپتیمم برای آنزیم آزاد ٤٠ °C و برای آنزیم تثبیت‌شده بر روی نانوذرات

[Downloaded from jehe.abzums.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/jehe.6.1.111]

مغناطیسی سیلیس 50^oC گزارش نمودند و آنـزیم تثبیـت‌شـده در دمای ۳۰ الـی ٦۰ درجـه سلسـیوس بـیش از ۷۰٪ فعالیـت اولیـه خـود را حفـظ نمـوده اسـت [۲۰]. در مطالعـه Wang و همکاران نتایج مشابه پژوهش حاضر گزارش‌شده است. آن‌هـا حداکثر فعالیت آنزیم در حالـت آزاد را در دمـای 20^oC و در حالـت تثبیـت‌شـده بـر روی نـانوذرات مغناطیسـی سـیلیس مزوحفره دمای 60^oC گزارش نمودند. ضمناً نتایج آن‌ها نشـان داد که در دمای 80^oC آنزیم تثبیت‌شده قادر به حفـظ ٦۰٪ از فعالیت اولیه خود بوده است درحالی‌که آنزیم آزاد در این دمـا تقریباً غیرفعال بوده است [۱٤]. در مطالعه روحـانی و همکـاران بررسی اثر دما بر روی فعالیت لکاز آزاد و تثبیت‌شده بـر روی نانوذرات اکسید آهـن پوشـیده بـا سـیلیس در pH برابـر ٦ در محدوده 20^oC–80^oC انجـام گرفـت و نتـایج مطالعـه نشـان داد حداکثر فعالیـت لکـاز آزاد در 35^oC و لکـاز تثبیـت شـده در 45^oC بوده درحـالی کـه دمـای 45^oC بـرای لکـاز آزاد دمـای بحرانی بوده است به علت آنکه فقط ٦۰٪ از فعالیـت اولیـه را نشان داده است. همچنـین در دمـای 80^oC لکـاز تثبیـت‌شـده تقریبا ٤٥٪ و لکاز آزاد ۸۵٪ از فعالیت اولیـه را از دسـت داده است [۱۰].

ثبات ذخیره‌سازی لکاز آزاد و تثبیت‌شده

نتـایج آزمـایش‌هـا در مطالعـه پیشـرو نشـان داد، ثبـات ذخیره‌سازی آنزیم تثبیت‌شده بر روی نـانوذرات اکسـید آهـن پوشش‌دار شده بـا سـیلیس بعـد از ۳۰ روز ذخیـره‌سـازی در مقایسه با آنزیم آزاد بسیار بالاتر می‌باشد. به‌طوری‌کـه ۸٤/۱۷٪ از فعالیت آنزیم تثبیت‌شده و فقط ۲۱/۸٪ از فعالیت آنزیم آزاد بعد از ۳۰ روز ذخیره‌سازی در دمای 4^oC باقی‌مانـده اسـت. که این امر می‌تواند به اثر تثبیـت سـاختار سـه‌بعـدی آنـزیم و همچنـین نقـش محـافظتی بسـتر، کـه تغییـرات سـاختاری بیوکاتالیست را محدود می‌کند، نسبت داده شـود [۲۹]. اظهـارات فوق در نمودار (۳) قابل‌مشاهده می‌باشد. نتایج سایر مطالعـات با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. Dai و همکـاران جهـت سنجش ثبات ذخیره‌سـازی آنـزیم لکـاز تثبیـت‌شـده بـر روی نانوذرات سیلیس مغناطیسی عملکرد آن را در حذف رنگ قبل و بعد از مدت ۵ مـاه ذخیـره‌سـازی در دمـای 4^oC ارزیـابی نمودند و نتایج آن‌ها میزان ۱۰۰٪ حذف را بـا غلظـت آلاینـده ۳۰ mg/L و ۹٦٪ حذف در غلظت آلاینـده برابـر ۵۰ mg/L را به ترتیب برای قبـل و بعـد از ذخیـره‌سـازی نشـان داد [۱۲]. در مطالعه Wang و همکاران آزمایش انجام‌شده بـه‌منظـور تعیـین ثبات ذخیره‌سـازی، نشـان داد کـه آنـزیم آزاد بعـد از ۷ هفتـه ذخیره‌سازی در دمای 4^oC بـه‌طـور کامـل فعالیـت خـود را از دست داد درصورتی‌که آنزیم تثبیـت‌شـده بـر روی نـانوذرات مغناطیسی سیلیس مزوحفره ۹۲٪ از فعالیت اولیه خود را حفظ کرده است [۱٤]. دهقانی‌فرد و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی ثبات ذخیره‌سازی لکاز تثبیت‌شده بر سیلیکای متخلخل انجـام دادند، گزارش کردند پس از ۳۰ روز ذخیره‌سازی در دمـای 4^oC لکاز آزاد ۱۵٪ و لکاز تثبیت‌شده ۸۵٪ از فعالیت اولیـه خـود را حفظ نموده اسـت [۱۱]. در مطالعـه امـین و همکـاران لکـاز تثبیت‌شده بر روی نانوذرات Fe3O4@SiO2@KIT-6 بعـد از ۲۰ روز ذخیره‌سازی در دمـای 25^oC حـدود ۷۰٪ از فعالیـت اولیه خود را حفظ نمود در حالی که لکاز آزاد در روز یازدهم ذخیره‌سازی به طور کامل فعالیتش را از دست داد [۱٦].

پایداری حرارتی لکاز آزاد و تثبیت‌شده

در نمودار (٤) مشاهده می‌شود کـه رونـد کـاهش فعالیـت آنزیم در حالت تثبیـت‌شـده کنـدتر از حالـت آزاد مـی‌باشـد. به‌طوری‌که آنزیم تثبیت‌شده در دمای 50^oC بعـد از ۸ سـاعت ۱۰/۸۷±۳/۷ ٪ از فعالیت اولیه را از دسـت داد امـا در حالـت آزاد در این شرایط تقریبـاً ٤/۱۲ ± ۵۷/۹۵ ٪ از فعالیـت لکـاز کاهش یافت است. Hu و همکاران گزارش نمودند که فعالیـت آنزیم تثبیت‌شده بر روی نانوذرات سیلیس مغناطیسی بعد از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای 50^oC حدود ۹۸٪ فعالیـت اولیـه

[Downloaded from jehe.abzums.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/jehe.6.1.111]

بوده است درحالی‌که آنزیم آزاد حدود ٤٠٪ از فعالیت اولیه خود را در این شرایط را حفظ کرده است [٢٠]. در مطالعه kadam و همکاران، آنزیم لکاز تثبیت‌شده بعد از ٦ ساعت قرار گرفتن در دمای C□ ٦٠ ، ٩١٪ از فعالیت اولیه خود را حفظ نمود درحالی‌که آنزیم آزاد در این شرایط حدود ٤٠٪ از فعالیت اولیه خود را نشان داد [٣٠].در مطالعه Xu و همکاران پایداری آنزیم آزاد و تثبیت‌شده بر روی نانو فیبرهای متخلخل در دمای $80^{o}C$ – ١٠، به مدت ٣، ٨ و ٢٤ ساعت سنجش شده است و نتایج گزارش‌شده نشان‌دهنده این مطلب است که کاهش فعالیت آنزیم لکاز تثبیت‌شده نسبت به آنزیم آزاد کندتر و با شیب ملایم‌تر بوده است به‌طوری‌که میزان فعالیت ازدست‌رفته برای لکاز تثبیت‌شده بعد از ٢٤ ساعت در دمای $60^{o}C$ و $50^{o}C$ ، به ترتیب ٦٥٪ و ٢٥٪ بوده است درحالی‌که لکاز آزاد تقریباً ١٠٠٪ و ٩٥ ٪ از فعالیت اولیه خود را تحت شرایط مذکور ازدست‌داده است. آن‌ها عنوان کردند زمانی که دمای بالا منجر به غیرفعال شدن آنزیم آزاد می‌گردد در آنزیم تثبیت‌شده پیوند کووالانسی بین آنزیم و بستر می‌تواند از دناتوراسیون ساختاری آنزیم جلوگیری کند. درواقع بستر اثر حفاظت کنندگی بر روی آنزیم اعمال می‌کند [٣].

قابلیت استفاده مجدد لکاز تثبیت‌شده

قابلیت استفاده مجدد آنزیم تثبیت‌شده، یکی از پارامترهای مهم در کاهش هزینه‌های اقتصادی کاربردهای صنعتی آنزیم می‌باشد. استفاده مجدد از آنزیم منجر به تضعیف قدرت پیوند بین آنزیم و بستر می‌شود [٨]. در این مطالعه کاهش تدریجی توانایی اکسیداسیون ABTS توسط لکاز تثبیت‌شده در نمودار (٥) مشاهده می‌شود. پس از ١٠ مرتبه استفاده از لکاز تثبیت‌شده میزان فعالیت کاهش‌یافته برابر ٣± ٦٤/٣٥ ٪ می‌باشد. Fortes و همکاران در گزارش خود بیان داشتند که در تست قابلیت استفاده مجدد لکاز تثبیت‌شده بر روی نانوذرات مغناطیسی سیلیس با استفاده از ABTS به‌عنوان سوبسترا پس از ٦ مرتبه استفاده از لکاز تثبیت‌شده میزان فعالیت باقیمانده برابر ٧٥/٨ ٪از فعالیت اولیه بوده است [٣١]. در مطالعه dai و همکاران برای ارزیابی قابلیت استفاده مجدد لکاز تثبیت‌شده بر روی نانوذرات مغناطیسی سیلیس از کارآیی آنزیم در حذف رنگ Red MX-5B بهره گرفته شده است. پس از ٢٠ مرتبه استفاده از آنزیم تثبیت‌شده راندمان حذف بیش از ٨٠ ٪ گزارش‌شده است [١٢]. روحانی و همکاران در پژوهش خود به منظور مطالعه قابلیت استفاده مجدد از لکاز تثبیت‌شده بر روی نانوذرات اکسید آهن پوشیده با سیلیس از ABTS به عنوان سوبسترا استفاده نمودند و گزارش نمودند بیش از ٨٥٪ از فعالیت آنزیم پس از ٦ مرتبه استفاده از لکاز تثبیت‌شده همچنان باقی‌مانده است [١٠].

نتیجه‌گیری

طبق یافته‌های به دست آمده از این پژوهش تثبیت لکاز بر روی نانوذرات اکسید آهن پوشش‌دار شده با سیلیس منجر به بهبود پایداری آنزیم تحت شرایط مختلف محیطی در مقایسه با لکاز آزاد شده است و با نگاه به پژوهش‌های انجام شده بر روی توانایی این آنزیم در حذف و تجزیه آلاینده‌های زیست‌محیطی از قبیل هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای، ترکیبات فنلی و سایر زنوبایوتیک‌ها، می‌توان اذعان داشت بنا به دلایلی چون قابلیت استفاده مجدد و افزایش ماندگاری لکاز تثبیت‌شده و در نتیجه کاهش مقدار آنزیم مصرفی، کاربرد آن در زیست پالایی آلاینده‌ها در مقایسه با لکاز آزاد به عنوان یک راه مقرون به صرفه و کارآمدتر مطرح می‌باشد. همچنان که از مهمترین اهداف این پژوهش، تثبیت آنزیم لکاز جهت کاربرد در پالایش خاک از آلاینده‌های آلی بوده است.

[Downloaded from jehe.abzums.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/jehe.6.1.111]

سپاسگزاری

مقاله حاضر حاصل بخشی از پایان‌نامه با عنوان "ارزیابی کارایی آنزیم لکاز تثبیت‌شده در تجزیه فنانترن از محلول آبی حاصل از شستشوی خاک " در مقطع کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط مصوب دانشگاه علوم پزشکی ایران در سال ۱۳۹٤ و به کد ۲۷۵٦۰ می‌باشد. بدین‌وسیله از حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران به جهت حمایت مالی طرح تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Polaina J, MacCabe AP. Industrial enzymes: Springer; 2007.
2. Senthivelan T, Kanagaraj J, Panda R. Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: an eco-friendly approach-a review. Bioprocess Eng 2016;21(1):19-38.
3. Xu R, Si Y, Wu X, et al. Triclosan removal by laccase immobilized on mesoporous nanofibers: strong adsorption and efficient degradation. Chem Eng J. 2014;255:63-70.
4. Kunamneni A, Plou FJ, Ballesteros A, Alcalde M. Laccases and their applications: a patent review. Recent Pat. Biotechnol 2008;2(1):10-24.
5. Bautista LF, Morales G, Sanz R. Immobilization strategies for laccase from Trametes versicolor on mesostructured silica materials and the application to the degradation of naphthalene. Bioresour. Technol 2010;101(22):8541-8.
6. Datta S, Christena LR, Rajaram YRS. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. Biotech 2013;3(1):1-9.
7. Couto SR, Herrera JLT. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. Biotechnol Adv 2006;24(5):500-13.
8. Fernández-Fernández M, Sanromán MÁ, Moldes D. Recent developments and applications of immobilized laccase. Biotechnol Adv 2013;31(8):1808-25.
9. Ahmad R, Sardar M. Enzyme immobilization: an overview on nanoparticles as immobilization matrix. Biochem Anal Biochem 2015;4(2):1.
10. Rouhani S, Rostami A, Salimi A. Preparation and characterization of laccases immobilized on magnetic nanoparticles and their application as a recyclable nanobiocatalyst for the aerobic oxidation of alcohols in the presence of TEMPO. RSC Adv. 2016;6(32):26709-18.
11. Dehghanifard E, Jafari AJ, Kalantary RR, et al. Biodegradation of 2, 4-dinitrophenol with laccase immobilized on nano-porous silica beads. Iran J Environ Health Sci Eng 2013;10(1):25.
12. Dai J, Wang H, Chi H, et al. Immobilization of laccase from Pleurotus ostreatus on magnetic separable SiO2 support and excellent activity towards azo dye decolorization. J Environ Chem Eng 2016;4(2):2585-91.
13. Netto CG, Toma HE, Andrade LH. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. J Mol Catal B 2013;85:71-92.
14. Wang J, Zheng S, Shao Y, et al. Amino-functionalized Fe3O4@ SiO2 core–shell magnetic nanomaterial as a novel adsorbent for aqueous heavy metals removal. J Colloid Interf Sci 2010;349(1):293-9.
15. Mogharabi M, Nassiri-Koopaei N, Bozorgi-Koushalshahi M, et al. Immobilization of laccase in alginate-gelatin mixed gel and decolorization of synthetic dyes. Bioinorg Chem Appl 2012:1-6.
16. Amin R, Khorshidi A, Shojaei AF, et al. Immobilization of laccase on modified Fe3O4@ SiO2@ Kit-6 magnetite nanoparticles for enhanced delignification of olive pomace bio-waste. Int J Biol Macromol 2018;114:106-13.
17. Zhang W, Zhang Y, Jiang Q, et al. Tetraazacalix 2 arence 2 triazine coated Fe3O4/SiO2 magnetic nanoparticles for simultaneous dispersive solid phase extraction and determination of trace multitarget analytes. Anal Chem 2016;88(21):10523-32.
18. Deng M, Zhao H, Zhang S, et al. High catalytic activity of immobilized laccase on core–shell magnetic nanoparticles by dopamine self-polymerization. J Mol Catal B 2015;11:15-24.
19. Azimi M, Nafissi-Varcheh N, Mogharabi M, et al. Study of laccase activity and stability in the presence of ionic and non-ionic surfactants and the bioconversion of indole in laccase-TX-100 system. J Mol Catal Enzym 2016;126:69-75.
20. Hu J, Yuan B, Zhang Y, Guo M. Immobilization of laccase on magnetic silica nanoparticles and its application in the oxidation of guaiacol, a phenolic lignin model compound. RSC Adv 2015;5(120):99439-47.
21. Illanes A. Enzyme biocatalysis: principles and applications: Springer Science & Business Media; 2008.
22. Bayramoglu G, Doz T, Ozalp VC, Arica MY. Improvement stability and performance of invertase via immobilization on to silanized and polymer brush grafted magnetic nanoparticles. Food Chem 2017;221:1442-50.
23. Xu F. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. J Biol Chem

[Downloaded from jehe.abzums.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/jehe.6.1.111]

1997;272(2):924-8.

24. Zeng S, Qin X, Xia L. Degradation of the herbicide isoproturon by laccase-mediator systems. Biochem Eng J 2017;119:92-100.
25. Niladevi K, Prema P. Effect of inducers and process parameters on laccase production by Streptomyces psammoticus and its application in dye decolourization. Bioresour Technol 2008;99(11):4583-9.
26. Xu R, Cui J, Tang R, et al. Removal of 2, 4, 6-trichlorophenol by laccase immobilized on nano-copper incorporated electrospun fibrous membrane-high efficiency, stability and reusability. Chem Eng J 2017;326:647-55.
27. Liu Y, Zeng Z, Zeng G, et al. Immobilization of laccase on magnetic bimodal mesoporous carbon and the application in the removal of phenolic compounds. Bioresour Technol 2012;115:21-6.
28. Jafari AJ, Kalantary RR, Dehghanifard E, et al. Investigation of immobilized laccase enzyme on nanoporous silica application for removal of 2, 4-dinitrophenol from aqueous solution. J Mazandaran Univ Med Sci 2017;26(144):301-13.
29. Zdarta J, Antecka K, Frankowski R, et al. The effect of operational parameters on the biodegradation of bisphenols by Trametes versicolor laccase immobilized on Hippospongia communis spongin scaffolds. Sci Total Environ 2018;615:784-95.
30. Kadam AA, Jang J, Lee DS. Supermagnetically tuned halloysite nanotubes functionalized with aminosilane for covalent laccase immobilization. ACS Appl Mater Interfaces 2017;9(18):15492-501.
31. Fortes CC, Daniel-da-Silva AL, Xavier AM, Tavares AP. Optimization of enzyme immobilization on functionalized magnetic nanoparticles for laccase biocatalytic reactions. Chem Eng Process 2017;117:1-8.

[Downloaded from jehe.abzums.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/jehe.6.1.111]