

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

Elham Razmi¹, Ahmad Jonidi Jafari^{2,3}, Ali Esrafil^{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@jums.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: Fe₃O₄ 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

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

الهام رزمی^۱، احمد جنیدی جعفری^{۲،۳}، علی اسرافیلی^۴، عماد دهقانی فرد^۵، روشنگ رضایی کلانتری^{۶،*}

^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

^۴ دانشیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

^۵ استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

^۶ مرکز تحقیقات بهداشت، ایمنی و محیط (RCHSE)، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۴/۵ ؛ 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 گلو تار آلدهید 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 کارایی 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

مقدمه

لکازها (بنزن دی‌ال: 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 ترشح شده از یک درخت ژاپنی به نام *Rhus vernicifer* گزارش شده توسط Yoshida در ۱۸۸۳ برگرفته شده است. لکازها البته در گیاهان دیگر و نیز حشرات و باکتری‌ها نیز یافت می‌شوند، اما به طور 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 به عنوان یک راه مقرون به صرفه و دوستدار محیط زیست و بسیار کارآمد مطرح می‌شود^{۳-۵}.

آنزیم‌ها پروتئین‌های قابل انحلال هستند که نمی‌توانند به آسانی 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}. به منظور افزایش پایداری آنزیم‌ها، روش‌های مختلفی از جمله 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 از جمله گلو تارآلدهید 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 کارایی آنزیم تثبیت شده می‌شود. در روش اتصال آنزیم به سطح، ذرات ریزتر می‌توانند سطح بزرگتری برای اتصال آنزیم‌ها فراهم کنند. استفاده از نانوذرات به عنوان بستر تثبیت آنزیم به علت نسبت سطح به حجم بسیار زیاد در نتیجه افزایش میزان بارگذاری آنزیم و حداقل محدودیت در نفوذ سوپسترا به سطح آنزیم، می‌تواند بسیار کارآمد باشد^{۹،۱۲}.

یکی از مشکلات استفاده از آنزیم‌ها، جداسازی و بازیابی آنزیم تثبیت شده می‌باشد که تکنولوژی جداسازی مغناطیسی یک تکنولوژی نویدبخش می‌باشد. جداسازی و بازیابی آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذرات مغناطیسی از محیط واکنش می‌تواند با استفاده از یک میدان مغناطیسی خارجی به آسانی 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 مورد استفاده قرار گیرد، می‌تواند بر حالت چرخش الکترون محصول میانی در واکنش آنزیمی اثر بگذارد که

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) به منظور عامل دار کردن نانوذرات سنتز شده و همچنین گلو تار آلدهید ۲۵٪ به عنوان عامل ایجادکننده پیوند کووالانسی میان بستر و آنزیم در تثبیت لکاز از شرکت سیگما آلد ریچ خریداری شدند. $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ و $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ برای سنتز نانوذرات اکسید آهن، Tetraethyl orthosilicate (TEOS) به عنوان منبع سیلیس در پوشش دار کردن نانوذرات اکسید آهن استفاده شد، با درجه خلوص آزمایشگاهی از شرکت مرک تهیه گردید.

سنتز نانوذرات اکسید آهن مغناطیسی (Fe_3O_4)

به منظور سنتز نانوذرات Fe_3O_4 بر اساس روش هم ترسیبی کلرید آهن ۶ آب ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) و کلرید آهن چهار آب ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) با نسبت مولی ۲ به ۱ به همراه ۲۰ میلی لیتر HCL و ۸۰۰ میلی لیتر آب مقطر، تحت گاز نیتروژن و دمای ۸۰ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت مخلوط شدند. سپس ۱۴۰ میلی لیتر آمونیاک ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) به محلول حاصل اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت به روی همزن قرار گرفت. پس از اتمام زمان اختلاط نانوذرات تشکیل شده (Fe_3O_4) با مگنت جداسازی شده و چند مرتبه با آب مقطر و اتانول شستشو داده شدند.^{۱۴}

پوشش دار کردن نانوذرات Fe_3O_4 با سیلیس

تترا اتیل اورتو سیلیکات (TEOS) به عنوان منبع سیلیس برای پوشش نانوذرات اکسید آهن استفاده گردید. به این منظور ۵ میلی لیتر از TEOS توسط اتانول به حجم ۲۰۰ میلی لیتر رسانده شد و بسیار آهسته با نانوذرات Fe_3O_4 به دست آمده از مرحله قبل بدون شرایط خلأ و گرمادهی مخلوط شدند. پس از ۲۴ ساعت اختلاط، نانوذرات حاصل

می تواند اثر مغناطیسی القاء شده ایجاد کند. و بنابراین اثر قابل توجهی بر فعال سازی آنزیم القاء می کند. فقط به دلیل القاء اثرات مغناطیسی، آنزیم تثبیت شده بر نانوذرات مغناطیسی تحمل pH بالاتر دارد. علاوه بر این پایداری حرارتی، میزان پایداری آنزیم و فعالیت آنزیم در این حالت به طور چشمگیری افزایش می یابد.^{۱۴،۱۳،۹} تشکیل پوشش سیلیکای عامل دار شده بر سطوح نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 می تواند مانع تجمعشان در مایع شود و پایداری شیمیایی و همچنین سازگاری زیستی آن ها را اصلاح کند. سطح هیدروفیل نانوذرات سیلیکا می تواند به اتصال آنزیم در محلول آبی کمک کند.^{۱۳} از دیگر مزایای نانوذرات مغناطیسی سیلیس به عنوان بستر تثبیت آنزیم قابلیت استفاده مجدد بهتر آن ها در مقایسه با سایر بسترها و در نتیجه کاهش هزینه ها می باشد برای مثال، مطالعه قابلیت استفاده مجدد از لکاز تثبیت شده بر روی ژل آلژینات-ژلاتین توسط مقربی و همکاران نشان داد که بعد از ۷ دوره استفاده از آنزیم تثبیت شده میزان فعالیت باقی مانده لکاز به شدت کاهش یافت و حدود ۲۰٪ از فعالیت باقی مانده است.^{۱۵} در حالی که مطالعه امین و همکاران بر روی قابلیت استفاده مجدد از لکاز تثبیت شده بر نانوذرات مغناطیسی سیلیس نشان داد میزان فعالیت باقی مانده بعد از ۱۱ بار استفاده مجدد تقریباً برابر ۷۱٪ بوده است.^{۱۶}

بر پایه آنچه یاد شد هدف از این مطالعه تثبیت آنزیم لکاز بر روی نانوذرات اکسید آهن پوشش دار شده با سیلیس به منظور رفع معایب و محدودیت های فوق الذکر آنزیم لکاز آزاد جهت کاربردهایی چون پالایش محیط زیست بوده است. در راستای این هدف، فعالیت و پایداری آنزیم لکاز آزاد و تثبیت شده بررسی شد.

مواد و روش ها

مواد شیمیایی

($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$) چند مرتبه با آب مقطر و اتانول شستشو داده شدند^{۱۴}.

فسفات در دمای ۴ درجه سلسیوس ذخیره شدند^{۱۸،۱۲}.

تعیین مشخصات نانوذرات سنتز شده

مشخصات نانوذرات سنتز شده با روش های متداول در متون تعیین گردید. به منظور مطالعه ساختار کریستالی نانوذرات سنتز شده از تکنیک پراش اشعه ایکس (XRD) با استفاده از پرتو Cu Ka در ولتاژ ۴۰ kV و جریان ۳۰ mA بهره گرفته شد. مورفولوژی نانوذرات سنتز شده 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 طیف سنجی تفکیک انرژی (EDX) تعیین گردید.

سنجش فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده

فعالیت کاتالیستی آنزیم لکاز آزاد و تثبیت شده با استفاده از ABTS به عنوان سوبسترا تعیین شد. مخلوط واکنش حاوی ۲ میلی مولار ABTS و مقدار مناسب لکاز آزاد یا تثبیت شده در بافر فسفات در pH برابر ۵ آماده گردید و در دمای ۲۵ درجه 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 طول موج ۴۲۰ nm با دستگاه اسپکتروفتومتر CECIL UV/VIS مدل ۷۱۰۰ اندازه گیری شد. فعالیت لکاز با استفاده از ضریب خاموشی مولار برای ABTS برابر $36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ محاسبه شد. یک واحد فعالیت آنزیم بیان کننده 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^{۱۹}.

یافته ها

آمین دار کردن نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$

به منظور اصلاح سطح نانوذرات با گروه های آمین، محلول تولوئن و متانول با نسبت ۱ به ۱ (۳۰۰ میلی لیتر از هر کدام) و ۱۰ میلی لیتر از ۳-آمینو پروپیل تری اتوکسی سیلان (APTES) به ۳ گرم از نانوذرات مرحله قبل افزوده گردید و مخلوط حاصل به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه در حمام اولتراسونیک در دمای ۸۰ درجه سلسیوس جهت یکنواخت سازی و افزایش پراکندگی بیشتر نانوذرات قرار داده شد. پس از آن مخلوط فوق الذکر به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سلسیوس و تحت گاز نیتروژن به روی همزن قرار گرفت. پس از اتمام زمان اختلاط نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ با اتانول و آب شستشو داده شدند^{۱۴،۱۷}.

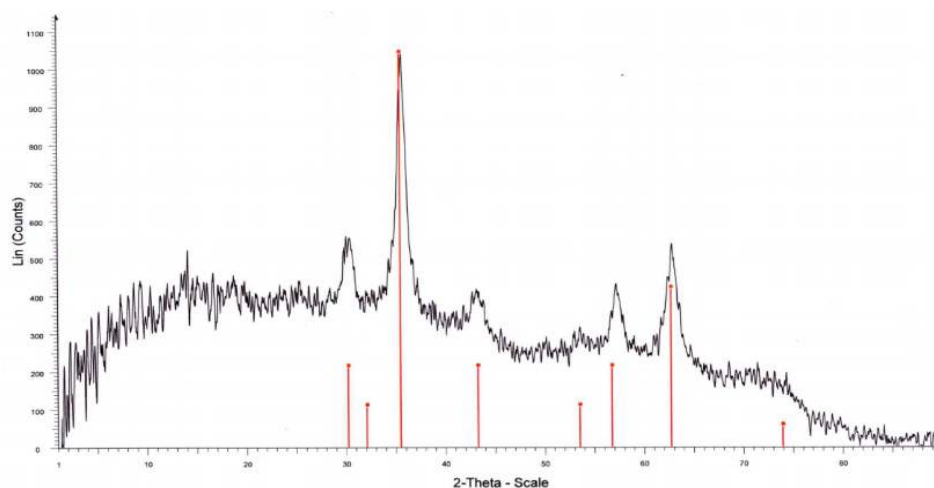
تثبیت آنزیم لکاز بر روی نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$

تثبیت آنزیم با استفاده از محلول گلو تار آلدهید به عنوان عامل ایجاد کننده پیوند کووالانسی میان بستر و آنزیم انجام شد. به این منظور ۱ میلی لیتر از محلول گلو تار آلدهید ۲/۵٪ به ۲۰ میلی لیتر بافر فسفات (۰/۱ مولار) حاوی ۵۰ میلی گرم نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ افزوده و به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق بر روی شیکر قرار گرفت پس از آن نانوذرات توسط آهنربا جدا شده و سه مرتبه با آب مقطر و سه مرتبه با بافر فسفات به صورت یک در میان شستشو داده شد تا گلو تار آلدهید اضافی حذف شود. پس از آن محلول آنزیم لکاز با غلظت ۰/۶ میلی گرم بر میلی لیتر 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

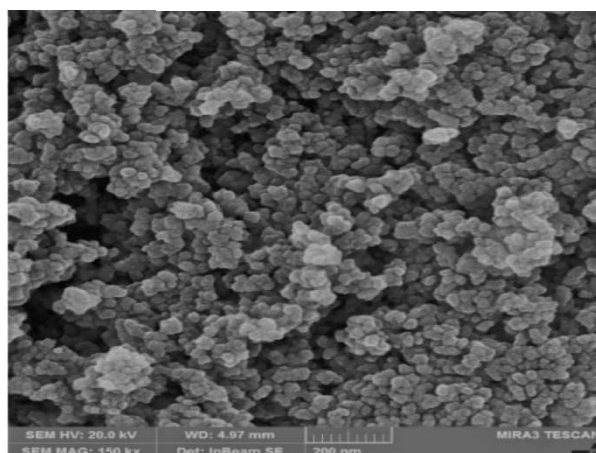
مشخصات نانوذرات سنتز شده

الگوی طیف پراش اشعه ایکس نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ که نشان دهنده ساختار کریستالی نانوذرات سنتز شده می باشد در شکل (۱) قابل مشاهده است. در شکل های (۲) و (۳) تصاویر FESEM نانوذرات سنتز شده به ترتیب قبل و بعد از

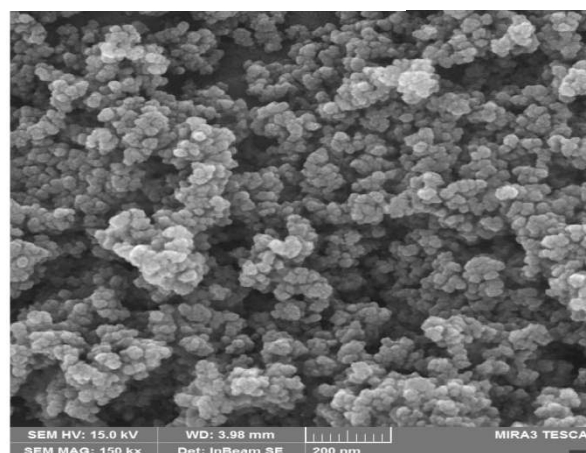
تثبیت آنزیم ارائه شده اند که نشان دهنده مورفولوژی نانوذرات سنتز شده می باشند. عناصر موجود در نانوذرات قبل و بعد از تثبیت آنزیم توسط آنالیز EDX در شکل های (۴) و (۵) نشان داده شده اند.



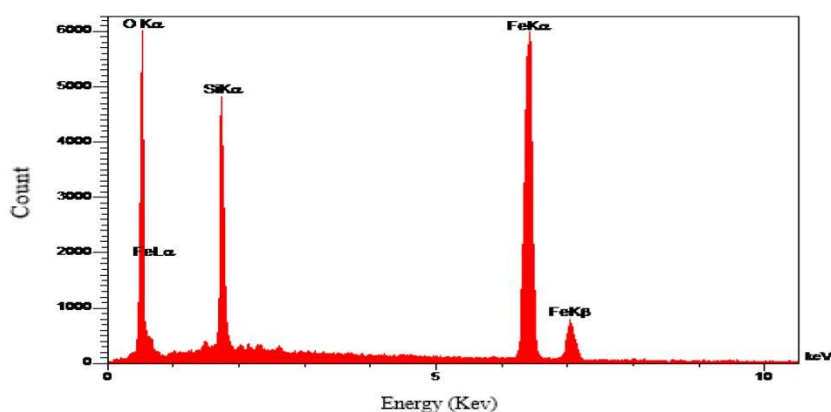
شکل ۱: الگوی طیف پراش اشعه ایکس نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$



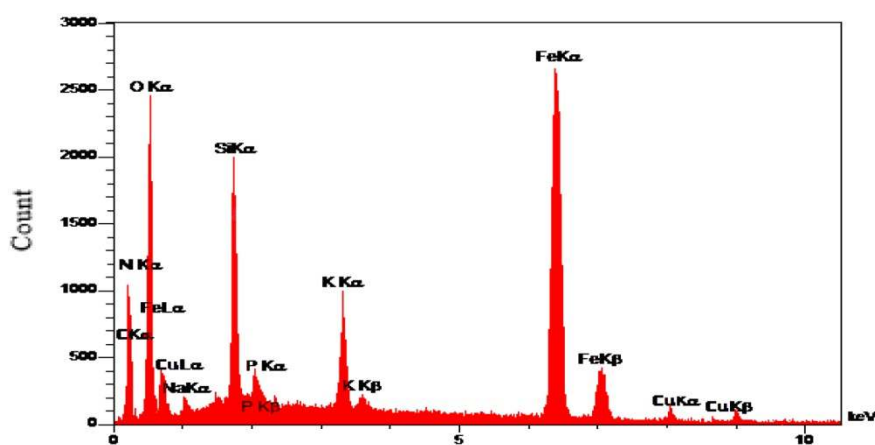
شکل ۳: تصویر FESEM نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ بعد از تثبیت لکاز



شکل ۲: تصویر FESEM نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ قبل از تثبیت لکاز



شکل ۴: طیف سنجی تفکیک انرژی قبل از تثبیت لکاز

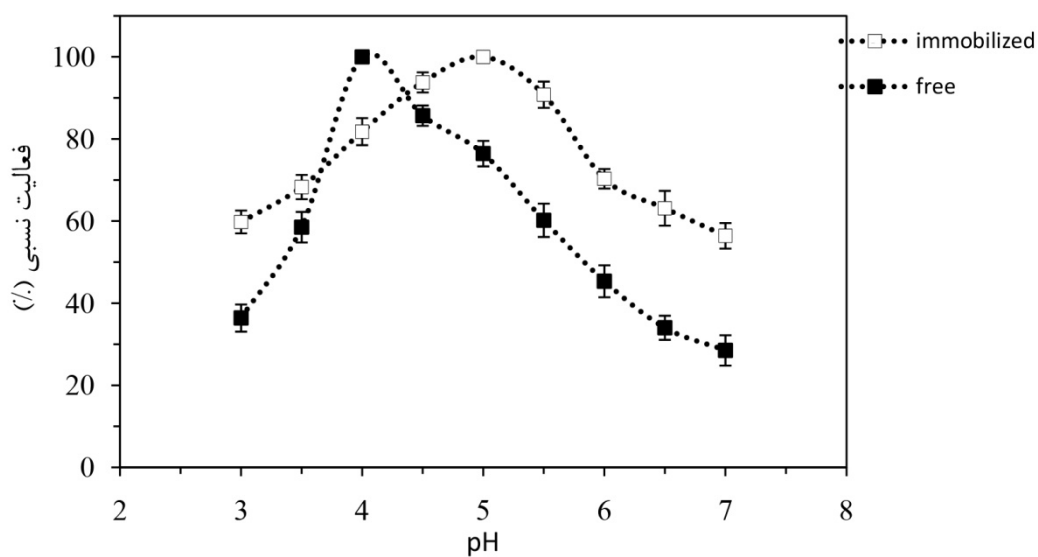


شکل ۵: طیف سنجی تفکیک انرژی بعد از تثبیت لکاز

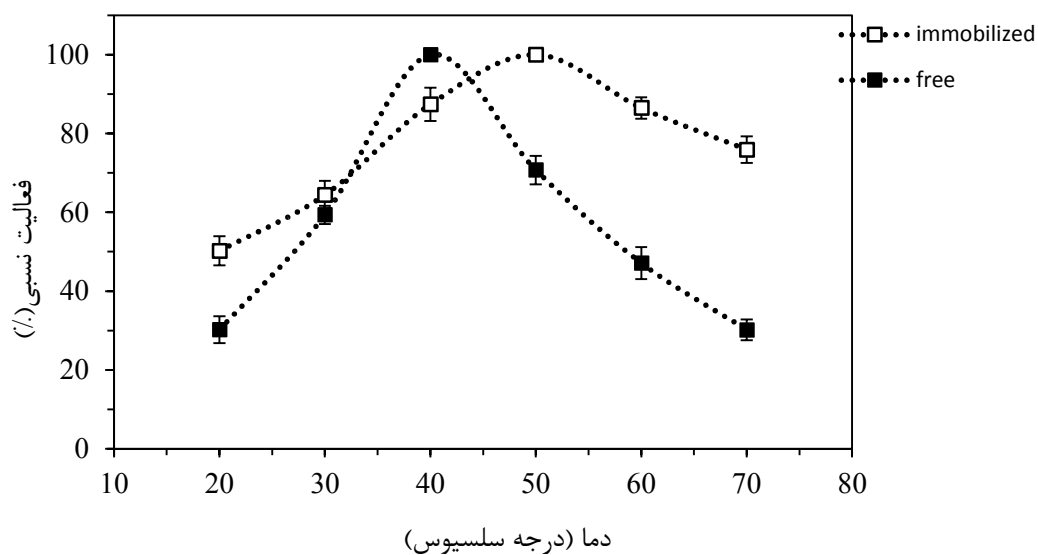
لکاز آزاد و تثبیت شده، در pH برابر ۵ و در محدوده دمایی ۲۰ تا ۷۰ درجه سلسیوس اندازه گیری شد و نتایج حاصله به ترتیب در نمودارهای (۱) و (۲) گزارش شده است. طبق نمودارهای مذکور بیشینه فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده به ترتیب در pH برابر ۴ و ۵ و در دمای ۴۰ و ۵۰ درجه سلسیوس حاصل گردید.

تأثیر pH و دما بر روی فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده

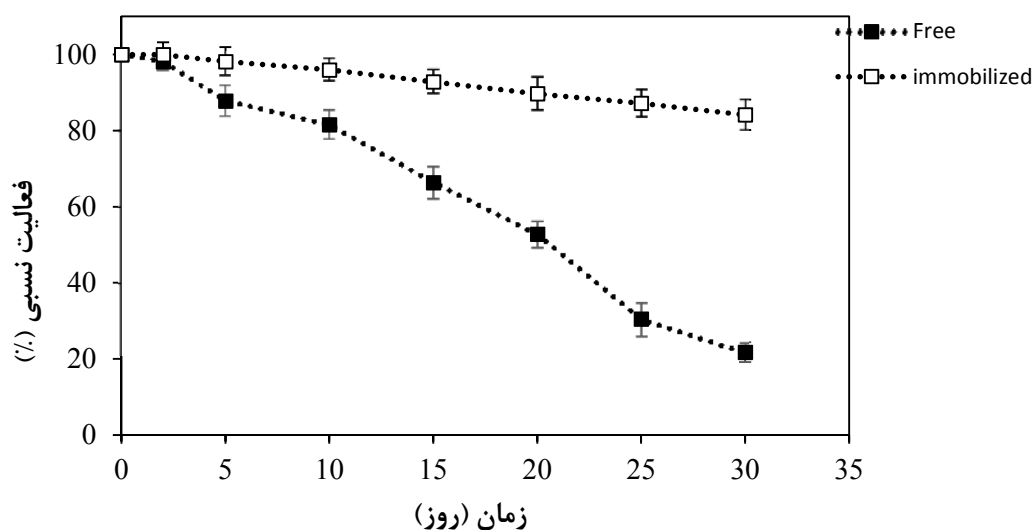
فعالیت کاتالستی آنزیم ها به شدت تحت تأثیر pH و دما است به همین جهت روند تغییر فعالیت آنزیم در شرایط مختلف pH و دما ارزیابی شده است. تأثیر تغییرات pH بر فعالیت آنزیم، در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در محدوده pH برابر ۳ تا ۷ سنجش شد. همچنین تأثیر دما بر فعالیت آنزیم



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

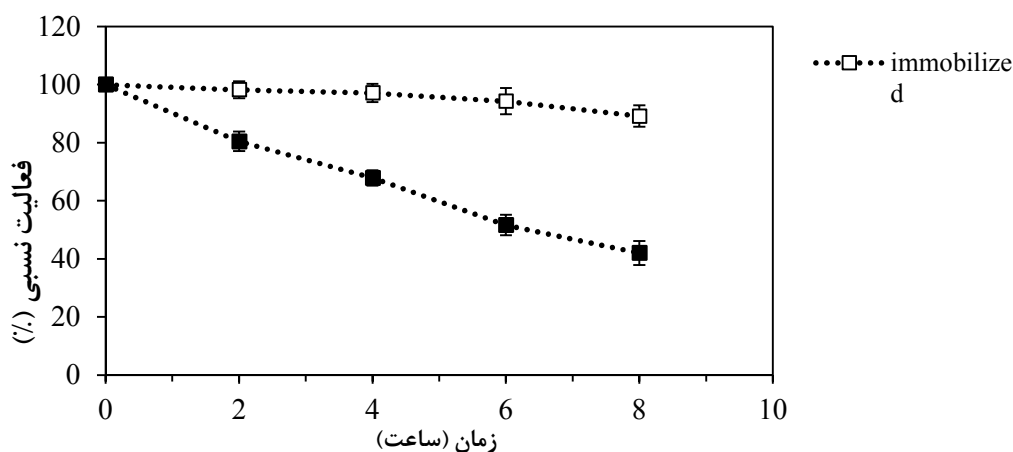


نمودار ۳: ثبات ذخیره سازی آنزیم آزاد و تثبیت شده

پایداری ذخیره سازی آنزیم آزاد و تثبیت شده

نمودار (۳)، نتایج ثبات ذخیره سازی در مدت ۳۰ روز را ارائه می نماید. جهت بررسی پایداری آنزیم آزاد و تثبیت شده در طی دوره ذخیره سازی در بافر فسفات (۰/۱ M, pH=۵) در دمای ۴°C، فعالیت لکاز آزاد و تثبیت شده به طور روزانه مورد سنجش قرار گرفت. بستر حاوی آنزیم تثبیت شده به طور روزانه برداشت شده و میزان فعالیت آن توسط محلول ABTS

سنجیده شد. فعالیت باقی مانده بر اساس درصد فعالیت باقی مانده به اولیه گزارش شده است. بر اساس این نمودار آنزیم آزاد بعد از ۳۰ روز تقریباً ۲۰٪ از فعالیت اولیه را دارد در حالی که آنزیم تثبیت شده بیش از ۸۰٪ از فعالیت اولیه را حفظ نموده است.



نمودار ۴: 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 تثبیت شده

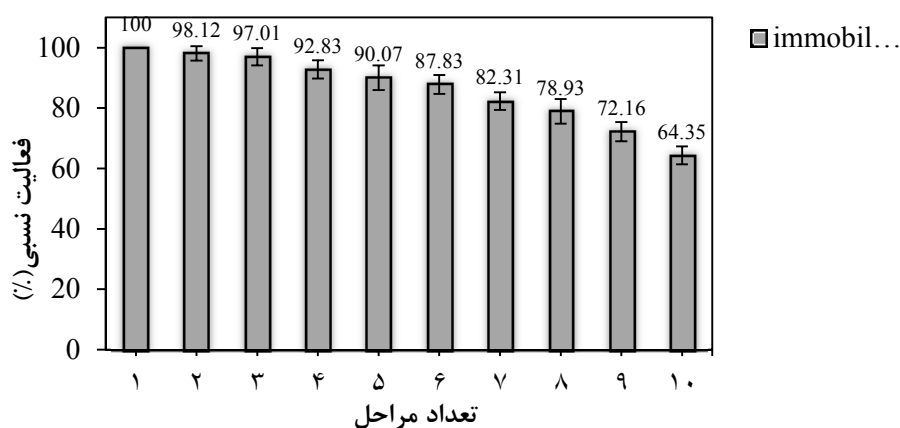
بدین منظور فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده در فواصل

آنزیم تثبیت شده نیز بررسی گردید. به این منظور تعداد دفعاتی که آنزیم تثبیت شده قادر به اکسیداسیون ABTS به عنوان سوبسترا بود، مورد مطالعه قرار گرفت. پس از هر بار اکسیداسیون ABTS، آنزیم تثبیت شده پس از جداسازی با استفاده از آهنربا، چند مرتبه توسط بافر فسفات و آب مقطر شستشو داده شد و مجدداً در محلول تازه ABTS قرار گرفت. نتایج این بخش از مطالعه در نمودار ۵ گزارش شده است بر اساس این نمودار پس از ۱۰ مرتبه استفاده از آنزیم تثبیت شده تقریباً ۶۴٪ از فعالیت آنزیم باقی مانده است.

زمانی ۲ ساعت پس از قرار گرفتن در دمای 50°C مورد سنجش قرار گرفت. در نمودار (۴)، نتایج پایداری حرارتی آنزیم آزاد و تثبیت شده قابل مشاهده است. طبق نمودار مذکور آنزیم آزاد بعد از ۸ ساعت قرار گرفتن در دمای 50°C تقریباً ۷۰٪ از فعالیت اولیه را ازدست داده است درحالی که در آنزیم تثبیت شده تقریباً ۱۰٪ از فعالیت اولیه کاهش یافته است.

قابلیت استفاده مجدد آنزیم تثبیت شده

یکی از مهم ترین مزایای تثبیت آنزیم توانایی استفاده مجدد از آن است. به همین دلیل در این مطالعه نیز این خصوصیت



نمودار ۵: قابلیت استفاده مجدد آنزیم تثبیت شده

بحث

در شکل (۱) پیک های ایجاد شده در زوایای $30^{\circ}/2$ ، $32^{\circ}/1$ ، $35^{\circ}/7$ ، $43^{\circ}/2$ ، $56^{\circ}/8$ ، $62^{\circ}/8$ درجه طبق استاندارد BS EN 13925-1: 2008 نشان دهنده کریستال های مکعبی Fe_3O_4 می باشد. همچنین حداکثر پیک در زاویه $35^{\circ}/7$ درجه مشاهده می شود. در پژوهش Hu و همکاران نتایج آنالیز XRD نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$ ، ۶ پیک در محدوده 20° تا 70° درجه منطبق با نتایج مطالعه حاضر نشان داد و بلندترین پیک در زاویه $35^{\circ}/58$ درجه مشاهده شده است. همچنین آن ها گزارش کردند که هیچ پیک دیگری در این محدوده مشاهده نکردند که نشان دهنده ساختار اسپینل تک فاز نانوذرات Fe_3O_4

می باشد^{۲۰}. در مطالعه Wang و همکاران نیز نتایج آنالیز XRD نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$ مشابه مطالعه حاضر گزارش شده است که مؤید ساختار اسپینل مکعبی برای نانوذرات مذکور می باشد^{۱۴}.

در شکل (۲) که تصویر SEM قبل از تثبیت را نشان می دهد، مورفولوژی کروی نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{SiO}_2$ و کمی تراکم مشهود است. همچنین در شکل (۳) مشاهده می شود بعد از تثبیت آنزیم مورفولوژی نانوذرات تغییر نکرده است. در طیف سنجی EDX با اندازه گیری انرژی پرتوهای X منتشر شده از نمونه، امکان بررسی کمی و کیفی نمونه میسر می شود و می توان نوع و میزان عناصر موجود در نمونه را مشخص کرد.

شکل (۴) وجود عناصر آهن، اکسیژن و سیلیس را در نانوذرات سنتز شده تأیید می‌کند و در شکل (۵) مشاهده می‌شود که علاوه بر ۳ عنصر فوق‌الذکر عناصر نیتروژن، کربن و مس نیز وجود دارند که این مطلب تصدیق حضور آنزیم بر روی نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ بعد از تثبیت آنزیم می‌باشد. حضور عناصر فسفر، پتاسیم و سدیم به دلیل بافر مورد استفاده می‌باشد.^{۱۰}

تأثیر pH بر فعالیت لکاز آزاد و تثبیت شده

از آنجاکه آنزیم‌ها پلیمرهای چند یونی هستند، انتظار می‌رود که pH، خواص آن‌ها را تحت تأثیر قرار دهد.^{۲۱} هرگونه تغییر شکل در ساختار آنزیم تحت شرایط اسیدی یا قلیایی منجر به کاهش فعالیت آنزیم خواهد شد.^{۲۲} معمولاً روند تغییر فعالیت لکاز در pH های متفاوت دارای شکل زنگوله‌ای می‌باشد و لکازهای با منشأ متفاوت دارای pH اپتیمم در محدوده ۱۱-۱ می‌باشند. اما اغلب لکازهای قارچی در pH اسیدی بهتر عمل می‌کنند.^{۲۳، ۲۴} در اکسیداسیون فنل، pH بهینه برای لکاز استخراج شده از گیاهان، برابر ۹ و برای لکاز تولید شده از قارچ ۷-۳ بوده است.^{۲۵} نتایج مطالعه حاضر نیز منطبق با مطالب فوق می‌باشد. در نمودار (۱) ملاحظه می‌گردد که فعالیت نسبی آنزیم لکاز آزاد و تثبیت شده در محدوده pH برابر ۳ تا ۷ از شکل زنگوله‌ای تبعیت می‌کند و حداکثر فعالیت لکاز آزاد و تثبیت شده به ترتیب در pH برابر ۴ و ۵، نمایان شده است. تغییر pH بهینه بعد از تثبیت به تعاملات یونی بین آنزیم و سطح بستر منسوب شده است.^{۱۴} همچنین نمودار (۱) گویای این مطلب می‌باشد که آنزیم تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد کمتر تحت تأثیر تغییرات pH قرار گرفته است. دلیل مقاومت آنزیم تثبیت شده در برابر تغییرات pH، در متون مورد بررسی، وجود پیوند کووالانسی بین بستر و آنزیم ذکر شده است. پیوند کووالانسی ترکیب پایداری را بین مولکول‌های آمین سطح بستر و لکاز ایجاد

می‌نماید که می‌تواند از دناتوراسیون اسیدی یا قلیایی آنزیم جلوگیری نماید.^{۲۶، ۲۷} نتایج مشابهی در رابطه با فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده در متون گزارش شده است. در مطالعه Wang و همکاران حداکثر فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده بر روی نانوذرات مغناطیسی سیلیس مزوحفره به ترتیب در pH برابر ۴ و ۵ مشاهده شد.^{۱۴} Liu و همکاران نیز تغییر pH بهینه از ۳ برای آنزیم آزاد به ۴ برای آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذرات کربن مزوحفره مغناطیسی را گزارش کردند همچنین آنزیم آزاد در pH برابر ۷ تقریباً ۹۰٪ فعالیت خود را از دست داد در حالی که آنزیم تثبیت شده فقط ۵۰٪ از فعالیتش را از دست داده بود.^{۲۷} در مطالعه دهقانی فرد و همکاران میزان فعالیت لکاز آزاد و تثبیت شده بر روی سیلیکای متخلخل در محدوده pH برابر ۸-۳ مقایسه گردید و نتایج آنها نشان داد بیشترین میزان فعالیت در هر دو حالت در pH اسیدی برابر ۵ به دست آمد و بنا به گزارش آنها در pH برابر ۸ در حالی که لکاز آزاد تقریباً غیرفعال گردیده، فعالیت نسبی آنزیم تثبیت شده برابر ۷۰-۶۰٪ بوده است.^{۲۸}

تأثیر دما بر فعالیت لکاز آزاد و تثبیت شده

نمودار (۲) نشان می‌دهد که حداکثر فعالیت آنزیم آزاد و تثبیت شده به ترتیب در دمای ۴۰ و ۵۰ درجه سلسیوس مشاهده شد. علت افزایش دمای بهینه در حالت تثبیت شده می‌تواند به افزایش انرژی فعال سازی آنزیم برای پیوند به سوبسترا در حالت تثبیت شده نسبت داده شود. علاوه بر این، کاهش تحرک مولکولی آنزیم تثبیت شده منجر به حفظ فعالیت در محدوده دمایی وسیع تری می‌شود.^{۲۹، ۳۰، ۳۱} همان‌طور که در نمودار مذکور مشاهده می‌شود، آنزیم تثبیت شده در دمای 70°C بیش از ۷۰٪ فعالیت اولیه خود را حفظ کرده است، در حالی که برای آنزیم آزاد تنها ۳۰٪ از فعالیت اولیه در این دما باقی مانده است. Hu و همکاران نیز دمای اپتیمم برای آنزیم آزاد 40°C و برای آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذرات

مغناطیسی سیلیس 50°C گزارش نمودند و آنزیم تثبیت شده در دمای 30°C الی 60°C درجه سلسیوس بیش از 70% فعالیت اولیه خود را حفظ نموده است.^{۲۰} در مطالعه Wang و همکاران نتایج مشابه پژوهش حاضر گزارش شده است. آن‌ها حداکثر فعالیت آنزیم در حالت آزاد را در دمای 20°C و در حالت تثبیت شده بر روی نانوذرات مغناطیسی سیلیس مزوحفره دمای 60°C گزارش نمودند. ضمناً نتایج آن‌ها نشان داد که در دمای 80°C آنزیم تثبیت شده قادر به حفظ 60% از فعالیت اولیه خود بوده است در حالی که آنزیم آزاد در این دما تقریباً غیرفعال بوده است.^{۱۴} در مطالعه روحانی و همکاران بررسی اثر دما بر روی فعالیت لکاز آزاد و تثبیت شده بر روی نانوذرات اکسید آهن پوشیده با سیلیس در pH برابر ۶ در محدوده 20°C – 80°C انجام گرفت و نتایج مطالعه نشان داد حداکثر فعالیت لکاز آزاد در 35°C و لکاز تثبیت شده در 45°C بوده در حالی که دمای 45°C برای لکاز آزاد دمای بحرانی بوده است به علت آنکه فقط 60% از فعالیت اولیه را نشان داده است. همچنین در دمای 80°C لکاز تثبیت شده تقریباً 45% و لکاز آزاد 85% از فعالیت اولیه را از دست داده است.^{۱۰}

ثبات ذخیره سازی لکاز آزاد و تثبیت شده

نتایج آزمایش‌ها در مطالعه پیشرو نشان داد، ثبات ذخیره سازی آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذرات اکسید آهن پوشش دار شده با سیلیس بعد از ۳۰ روز ذخیره سازی در مقایسه با آنزیم آزاد بسیار بالاتر می باشد. به طوری که $84/17\%$ از فعالیت آنزیم تثبیت شده و فقط $21/8\%$ از فعالیت آنزیم آزاد بعد از ۳۰ روز ذخیره سازی در دمای 4°C باقی مانده است. که این امر می تواند به اثر تثبیت ساختار سه بعدی آنزیم و همچنین نقش محافظتی بستر، که تغییرات ساختاری بیوکاتالیست را محدود می کند، نسبت داده شود.^{۲۹} اظهارات فوق در نمودار (۳) قابل مشاهده می باشد. نتایج سایر مطالعات

با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. Dai و همکاران جهت سنجش ثبات ذخیره سازی آنزیم لکاز تثبیت شده بر روی نانوذرات سیلیس مغناطیسی عملکرد آن را در حذف رنگ قبل و بعد از مدت ۵ ماه ذخیره سازی در دمای 4°C ارزیابی نمودند و نتایج آن‌ها میزان 100% حذف را با غلظت آلاینده 50 mg/L و 30 mg/L حذف در غلظت آلاینده برابر 50 mg/L به ترتیب برای قبل و بعد از ذخیره سازی نشان داد.^{۱۲} در مطالعه Wang و همکاران آزمایش انجام شده به منظور تعیین ثبات ذخیره سازی، نشان داد که آنزیم آزاد بعد از ۷ هفته ذخیره سازی در دمای 4°C به طور کامل فعالیت خود را از دست داد در صورتی که آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذرات مغناطیسی سیلیس مزوحفره 92% از فعالیت اولیه خود را حفظ کرده است.^{۱۴} دهقانی فرد و همکاران در مطالعه ای که بر روی ثبات ذخیره سازی لکاز تثبیت شده بر سیلیکای متخلخل انجام دادند، گزارش کردند پس از ۳۰ روز ذخیره سازی در دمای 4°C لکاز آزاد 15% و لکاز تثبیت شده 85% از فعالیت اولیه خود را حفظ نموده است.^{۱۱} در مطالعه امین و همکاران لکاز تثبیت شده بر روی نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{KIT}-6$ بعد از ۲۰ روز ذخیره سازی در دمای 25°C حدود 70% از فعالیت اولیه خود را حفظ نمود در حالی که لکاز آزاد در روز یازدهم ذخیره سازی به طور کامل فعالیتش را از دست داد.^{۱۶}

پایداری حرارتی لکاز آزاد و تثبیت شده

در نمودار (۴) مشاهده می شود که روند کاهش فعالیت آنزیم در حالت تثبیت شده کندتر از حالت آزاد می باشد. به طوری که آنزیم تثبیت شده در دمای 50°C بعد از ۸ ساعت $33/7 \pm 10/87\%$ از فعالیت اولیه را از دست داد اما در حالت آزاد در این شرایط تقریباً $4/12 \pm 57/95\%$ از فعالیت لکاز کاهش یافت است. Hu و همکاران گزارش نمودند که فعالیت آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذرات سیلیس مغناطیسی بعد از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای 50°C حدود 98% فعالیت اولیه

بوده است درحالی که آنزیم آزاد حدود ۴۰٪ از فعالیت اولیه خود را در این شرایط را حفظ کرده است.^{۲۰} در مطالعه kadam و همکاران، آنزیم لکاز تثبیت شده بعد از ۶ ساعت قرار گرفتن در دمای ۶۰ °C، ۹۱٪ از فعالیت اولیه خود را حفظ نمود درحالی که آنزیم آزاد در این شرایط حدود ۴۰٪ از فعالیت اولیه خود را نشان داد.^{۳۰} در مطالعه Xu و همکاران پایداری آنزیم آزاد و تثبیت شده بر روی نانو فیبرهای متخلخل در دمای ۸۰-۱۰ °C، به مدت ۳، ۸ و ۲۴ ساعت سنجش شده است و نتایج گزارش شده نشان دهنده این مطلب است که کاهش فعالیت آنزیم لکاز تثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد کندتر و با شیب ملایم تر بوده است به طوری که میزان فعالیت ازدست رفته برای لکاز تثبیت شده بعد از ۲۴ ساعت در دمای ۶۰ °C و ۵۰ °C، به ترتیب ۶۵٪ و ۲۵٪ بوده است درحالی که لکاز آزاد تقریباً ۱۰۰٪ و ۹۵٪ از فعالیت اولیه خود را تحت شرایط مذکور ازدست داده است. آن ها عنوان کردند زمانی که دمای بالا منجر به غیرفعال شدن آنزیم آزاد می گردد در آنزیم تثبیت شده پیوند کووالانسی بین آنزیم و بستر می تواند از دنا تورا سیون ساختاری آنزیم جلوگیری کند. درواقع بستر اثر حفاظت کنندگی بر روی آنزیم اعمال می کند.^۳

قابلیت استفاده مجدد لکاز تثبیت شده

قابلیت استفاده مجدد آنزیم تثبیت شده، یکی از پارامترهای مهم در کاهش هزینه های اقتصادی کاربردهای صنعتی آنزیم می باشد. استفاده مجدد از آنزیم منجر به تضعیف قدرت پیوند بین آنزیم و بستر می شود.^۸ در این مطالعه کاهش تدریجی توانایی اکسیداسیون ABTS توسط لکاز تثبیت شده در نمودار (۵) مشاهده می شود. پس از ۱۰ مرتبه استفاده از لکاز تثبیت شده میزان فعالیت کاهش یافته برابر $3 \pm 64/35$ ٪ می باشد. Fortes و همکاران در گزارش خود بیان داشتند که در تست قابلیت استفاده مجدد لکاز تثبیت شده بر روی

نانوذرات مغناطیسی سیلیس با استفاده از ABTS به عنوان سوبسترا پس از ۶ مرتبه استفاده از لکاز تثبیت شده میزان فعالیت باقیمانده برابر ۷۵/۸٪ از فعالیت اولیه بوده است.^{۳۱} در مطالعه dai و همکاران برای ارزیابی قابلیت استفاده مجدد لکاز تثبیت شده بر روی نانوذرات مغناطیسی سیلیس از کارآیی آنزیم در حذف رنگ Red MX-5B بهره گرفته شده است. پس از ۲۰ مرتبه استفاده از آنزیم تثبیت شده راندمان حذف بیش از ۸۰٪ گزارش شده است.^{۱۲} روحانی و همکاران در پژوهش خود به منظور مطالعه قابلیت استفاده مجدد از لکاز تثبیت شده بر روی نانوذرات اکسید آهن پوشیده با سیلیس از ABTS به عنوان سوبسترا استفاده نمودند و گزارش نمودند بیش از ۸۵٪ از فعالیت آنزیم پس از ۶ مرتبه استفاده از لکاز تثبیت شده همچنان باقی مانده است.^{۱۰}

نتیجه گیری

طبق یافته های به دست آمده از این پژوهش تثبیت لکاز بر روی نانوذرات اکسید آهن پوشش دار شده با سیلیس منجر به بهبود پایداری آنزیم تحت شرایط مختلف محیطی در مقایسه با لکاز آزاد شده است و با نگاه به پژوهش های انجام شده بر روی توانایی این آنزیم در حذف و تجزیه آلاینده های زیست محیطی از قبیل هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای، ترکیبات فنلی و سایر زئوبایوتیک ها، می توان اذعان داشت بنا به دلایلی چون قابلیت استفاده مجدد و افزایش ماندگاری لکاز تثبیت شده و در نتیجه کاهش مقدار آنزیم مصرفی، کاربرد آن در زیست پالایی آلاینده ها در مقایسه با لکاز آزاد به عنوان یک راه مقرون به صرفه و کارآمدتر مطرح می باشد. همچنان که از مهمترین اهداف این پژوهش، تثبیت آنزیم لکاز جهت کاربرد در پالایش خاک از آلاینده های آلی بوده است.

سپاسگزاری

مقاله حاضر حاصل بخشی از پایان نامه با عنوان "ارزیابی کارایی آنزیم لکاز تثبیت شده در تجزیه فناترن از محلول آبی حاصل از شستشوی خاک" در مقطع کارشناسی ارشد

مهندسی بهداشت محیط مصوب دانشگاه علوم پزشکی ایران در سال ۱۳۹۴ و به کد ۲۷۵۶۰ می باشد. بدین وسیله از حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران به جهت حمایت مالی طرح تشکر و قدردانی به عمل می آید.

References

- Polaina J, MacCabe AP. Industrial enzymes: Springer; 2007.
- 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.
- 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.
- Kunamneni A, Plou FJ, Ballesteros A, Alcalde M. Laccases and their applications: a patent review. *Recent Pat. Biotechnol* 2008;2(1):10-24.
- 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.
- Datta S, Christena LR, Rajaram YRS. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotech* 2013;3(1):1-9.
- Couto SR, Herrera JLT. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol Adv* 2006;24(5):500-13.
- Fernández-Fernández M, Sanromán MÁ, Moldes D. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnol Adv* 2013;31(8):1808-25.
- Ahmad R, Sardar M. Enzyme immobilization: an overview on nanoparticles as immobilization matrix. *Biochem Anal Biochem* 2015;4(2):1.
- 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.
- 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.
- 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.
- Netto CG, Toma HE, Andrade LH. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. *J Mol Catal B* 2013;85:71-92.
- 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.
- 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.
- 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.
- Zhang W, Zhang Y, Jiang Q, et al. Tetraazacalix 2 arene 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Illanes A. Enzyme biocatalysis: principles and applications: Springer Science & Business Media; 2008.
- 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.
- Xu F. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *J Biol Chem*

- 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, Anteck 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.