

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 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: 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

ثبت آنژیم لکاز بر روی نانوذرات اکسید آهن پوشیده با سیلیس و مقایسه پایداری و فعالیت آنژیم لکاز آزاد و ثبیت شده

الهام رزمی^۱، احمد جنبدی جعفری^{۲*}، علی اسرافیلی^۳، عmad دهقانی فرد^۴، روشک رضابی کلاتری^۵

^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، اینمنی و محیط (RCHSE)، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۴/۵ | تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۳

چکیده

زمینه و هدف: آنژیم 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. برغم قابلیت‌های کاربردی فراوان آن به علت طول عمر کوتاه، عدم بازیابی، ناپایداری حرارتی و ناپایداری در محیط‌های آبی، استفاده گسترده از آن‌ها بسیار محدود شده است. مطالعه حاضر، با هدف افزایش پایداری لکاز توسط ثبیت آن بر روی نانوذرات اکسید آهن پوشش دار شده با سیلیس انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: نانوذرات Fe₃O₄ به روش هم‌ترسیبی سنتز شدند و پس از پوشش دار شدن با سیلیس، سطح آن‌ها توسط گروه‌های آمین اصلاح گردید. در ادامه ثبیت آنژیم به روش ایجاد پیوند کووالانسی با استفاده از گلوتارآلدهید انجام پذیرفت. مشخصات نانوذرات سنتز شده و آنژیم ثبیت شده به کمک تکنیک پراش اشعه ایکس (XRD)، میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FESEM) و طیف‌سنجی تفکیک انرژی (EDX) بررسی شد.

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

نتیجه‌گیری: ثبیت لکاز بر روی نانوذرات اکسید آهن پوشش دار شده با سیلیس می‌تواند با افزایش کارآیی و پایداری آن، موانع و چالش‌های پیش روی کاربردهای متعدد این آنژیم را کاهش دهد.

کلمات کلیدی: لکاز، ثبیت، نانوذرات اکسید آهن پوشش دار شده با سیلیس، فعالیت آنژیم

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

مقدمه

استفاده مجدد از آنژیم و کاهش هزینه‌های کاربردی شود. در ثبت آنژیم، مولکول‌های آنژیم از طریق جذب فیزیکی یا ایجاد اتصال کووالانسی با استفاده از مواد شیمیایی از جمله گلوتارآلدهید بر روی بستری با سطح زیاد متصل شده و یا درون ژل یا ساختارهای میکروپسول، کپسوله می‌شوند.^۸ تاکنون مطالعات بسیار گسترده‌ای در مورد ثبت لکاز بر روی بسترهاي مختلف نظير کربن فعال، سیلیکا، کائولینیت، بسترهاي پلیمری و غشاها، دانه‌های پلی‌اکریلونیتریل، شیشه، کیتوزان و صورت گرفته است که هر کدام از این بسترها دارای مزايا و معایبي بوده است.^{۹,۱۰} اما اخيراً، فناوري نانو در بهبود روش‌های ثبت آنژیم بسیار مؤثر بوده است. کاهش اندازه مواد حامل آنژیم سبب بهبود کارآيی آنژیم ثبت شده می‌شود. در روش اتصال آنژیم به سطح، ذرات ریزتر می‌توانند سطح بزرگتری برای اتصال آنژیم‌ها فراهم کنند. استفاده از نانوذرات به عنوان بستر ثبت آنژیم به علت نسبت سطح به حجم بسیار زیاد درنتیجه افزایش میزان بارگذاری آنژیم و حداقل محدودیت در نفوذ سوبسترا به سطح آنژیم، می‌تواند بسیار کارآمد باشد.^{۱۱,۱۲}

یکی از مشکلات استفاده از آنژیم‌ها، جداسازی و بازیابی آنژیم ثبت شده می‌باشد که تکنولوژی جداسازی مغناطیسي یک تکنولوژی نویدبخش می‌باشد. جداسازی و بازیابی آنژیم ثبت شده بر روی نانوذرات مغناطیسي از محیط واکنش می‌تواند با استفاده از یک میدان مغناطیسي خارجی به آسانی انجام شود. در میان بسیاري از مواد نانوذرات اکسید آهن به دليل خواص مغناطیسي قوي، سميت کم و سازگاري زيسني با مواد بیولوژيکي بسیار مورد توجه می‌باشند و زمانی که برای ثبت آنژیم مورداستفاده قرار گيرد، می‌تواند بر حالت چرخش الکترون محصول ميانی در واکنش آنژيمی اثر بگذارد که

لکازها (بنزندیال: اکسیژن اکسیدوردوکتاز، 1.10.3.2 (EC) آنژیم‌های برون سلولی و چند مسی هستند که متعلق به یک گروه بزرگ‌تر از آنژیم‌ها هستند که اصطلاحاً خانواده اکسیدازهای آبی چند مسی نامیده می‌شود. نام لکاز از محل اصلی پیدا شدن آن در ماده ترجیح شده از یک درخت ژاپنی به ۱۸۸۳ Yoshid *Rhus vernicifer* گزارش شده توسط 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.^{۱۳} آنژیم‌های لکاز به دلیل توانایی اکسید کردن بسیاري از ترکیبات فنلی و غیرفنلی و همچنین تعداد زیادی از ترکیبات غیرقابل تجزیه بیولوژيکی مانند آفتکش‌ها، PAHs و رنگ‌ها، پتانسیل بالايی برای کاربرد در تصفیه فاضلاب‌ها و پاک‌سازی خاک‌های آلوده به این ترکیبات دارند. تجزیه آلانیده‌های کاتالیز شده توسط آنژیم‌ها به عنوان يکراه مقرر به صرفه و دوستدار محیط‌زیست و بسیار کارآمد مطرح می‌شود.^{۱۴}

آنژیم‌ها پروتئین‌های قابل انحلال هستند که نمی‌توانند به آسانی مورد استفاده مجدد قرار گیرند. همچنین، آن‌ها در دماهای بالا، pH بسیار زیاد یا در حضور حللاهای آلی، ناپایدار هستند.^{۱۵} در حال حاضر، طول عمر کوتاه و عدم بازیابی آنژیم‌ها استفاده از آن‌ها را محدود کرده است. با توجه به اهمیتی که آنژیم لکاز در بیوتکنولوژی و کاربردهای فراوان آن در صنعت دارد بهبود پایداری این آنژیم می‌تواند کاربردهای عملی آن را بیشتر کند.^{۱۶} به منظور افزایش پایداری آنژیم‌ها، روش‌های مختلفی از جمله ثبت آنژیم به کار برده می‌شود. ثبت آنژیم می‌تواند موجب کاهش مقدار مصرفی آنژیم‌ها، افزایش طول عمر راکتورهای آنژیمي، قابلیت

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-amino propyltrimethoxysilane(APTES) به منظور عامل دار کردن نانوذرات سنتز شده و همچنین گلوتارآلدهید٪ ۲۵ به عنوان عامل ایجادکننده پیوند کووالانسی میان بستر و آنزیم در تثبیت لکاز از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شدند. برای سنتز نانوذرات اکسید آهن $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ و $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ، Tetraethyl orthosilicate(TEOS)، 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 مقطراً، 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 مقطراً 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 خلاً 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 فعالسازی 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.^{۱۳, ۹} تشکیل پوشش سیلیکایی عامل دار شده بر سطوح نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 می تواند مانع تجمع شان در مایع شود و پایداری شیمیایی و همچنین سازگاری زیستی آنها 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 آنها در مقایسه با سایر بسترهای و در نتیجه کاهش هزینه ها می باشد برای مثال، مطالعه ای قابلیت استفاده مجدد از لکاز تثبیت شده بر روی ژل آلثینات-ژلاتین توسط مقربی و همکاران نشان داد که بعد از ۷ دوره استفاده از آنزیم تثبیت شده 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 تثبیت شده بر نانوذرات مغناطیسی سیلیس نشان داد میزان فعالیت باقیمانده 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

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 ثبیت آنزیم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گسیل میدانی (FESEM) مدل MIRA3TESCAN-XMU (FESEM) مدل MIRA3TESCAN-XMU مشاهده شد. همچنین ترکیب عناصر موجود در نانوذرات سنتز شده قبل و بعد از ثبیت لکاز با استفاده از طیف سنجی تفکیک انرژی (EDX) تعیین گردید.

سنجهش فعالیت آنزیم آزاد و ثبیت شده

فعالیت کاتالیستی آنزیم لکاز آزاد و ثبیت شده با استفاده از ABTS به عنوان سوبسترا تعیین شد. مخلوط واکنش حاوی ۲ میلی مولار ABTS و مقدار مناسب لکاز آزاد یا ثبیت 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 آهربا از محلول جدا شدند و تغییر در میزان جذب CECIL در طول موج ۴۲۰ nm با دستگاه اسپکترو فوتومتر UV/VIS مدل ۷۱۰۰ در میزان آندازه 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

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

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 متابول 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^{۱۷,۱۴}.

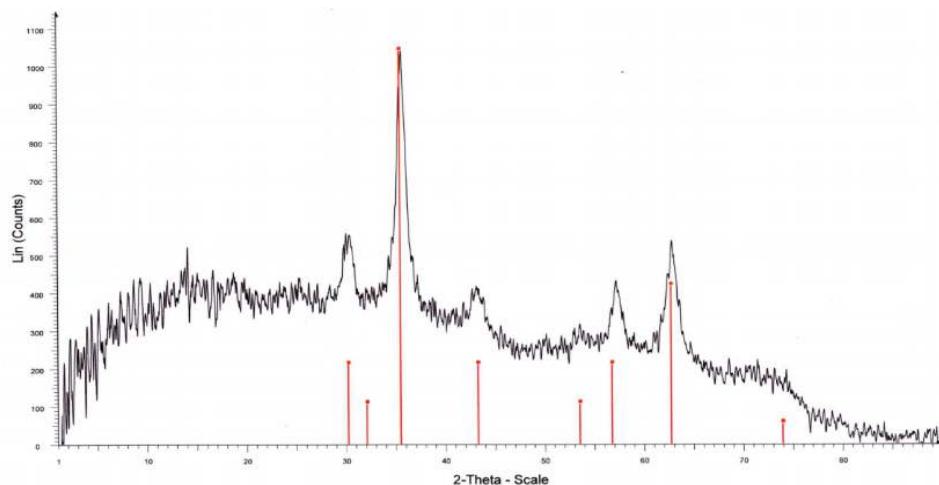
ثبت لکاز بر روی نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2-\text{NH}_2$

ثبت آنزیم با استفاده از محلول گلوتارآلدهید به عنوان عامل ایجاد کننده پیوند کووالانسی میان بستر و آنزیم انجام شد. به این منظور ۱ میلی لیتر از محلول گلوتارآلدهید ۲/۵٪ به ۲۰ میلی لیتر بافر فسفات (۱/۱ 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 آهربا جدا شده و سه مرتبه با آب مقطر و سه مرتبه با بافر فسفات به صورت یک در میان شستشو داده شد تا گلوتارآلدهید 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 ۳-۵ 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

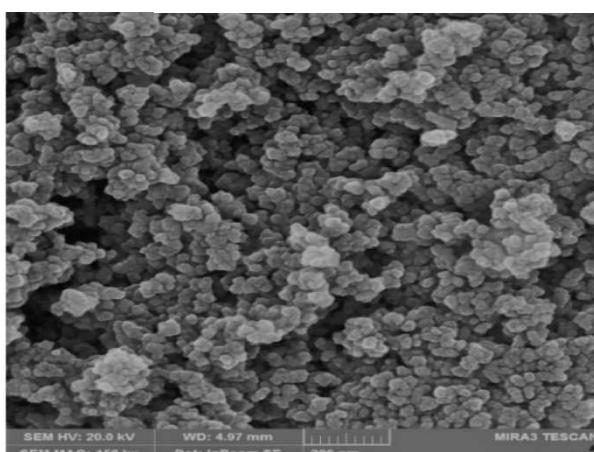
ثبت آنژیم ارائه شده‌اند که نشان دهنده مورفولوژی نانوذرات سنتز شده می‌باشد. عناصر موجود در نانوذرات قبل و بعد از ثبت آنژیم توسط آنالیز EDX در شکل‌های (۴) و (۵) نشان داده شده‌اند.

مشخصات نانوذرات سنتز شده

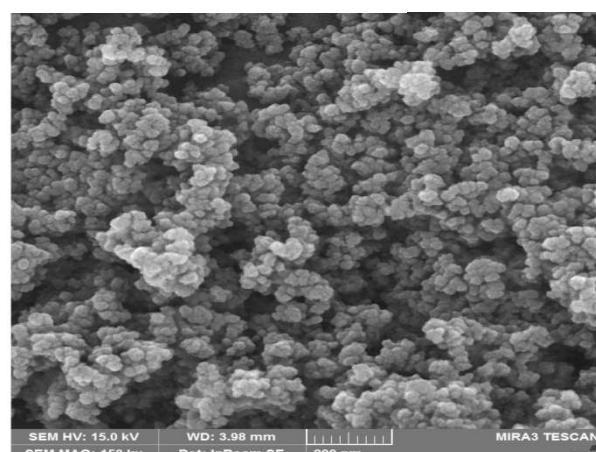
الگوی طیف پراش اشعه ایکس نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ که نشان‌دهنده ساختار کریستالی نانوذرات سنتز شده می‌باشد در شکل (۱) قابل مشاهده است. در شکل‌های (۲) و (۳) تصاویر FESEM نانوذرات سنتز شده به ترتیب قبل و بعد از



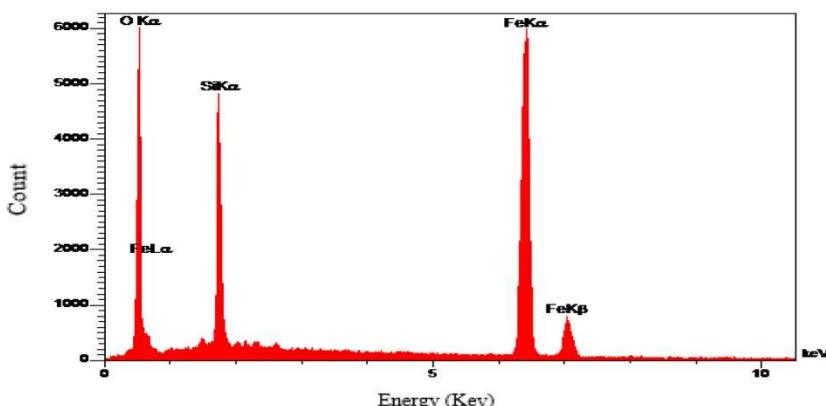
شکل ۱: الگوی طیف پراش اشعه ایکس نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$



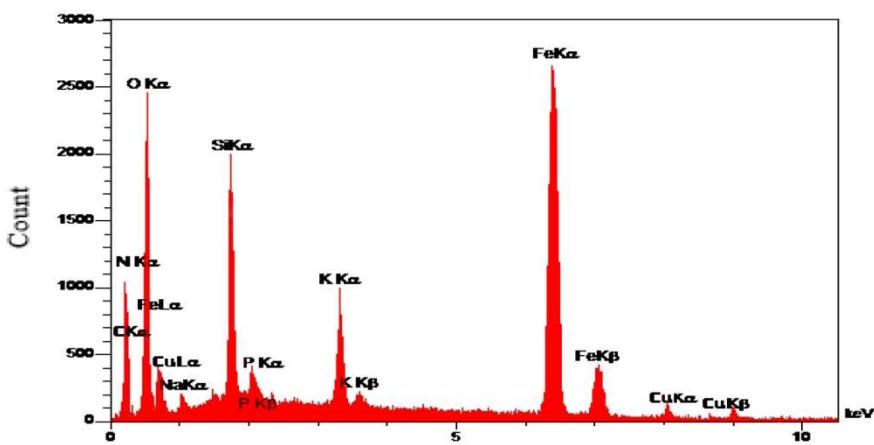
شکل ۳: تصویر FESEM نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ بعد از ثبت لکاز



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



شکل ۴: طیف سنجی تفکیک انرژی قبل از ثبیت لکاز



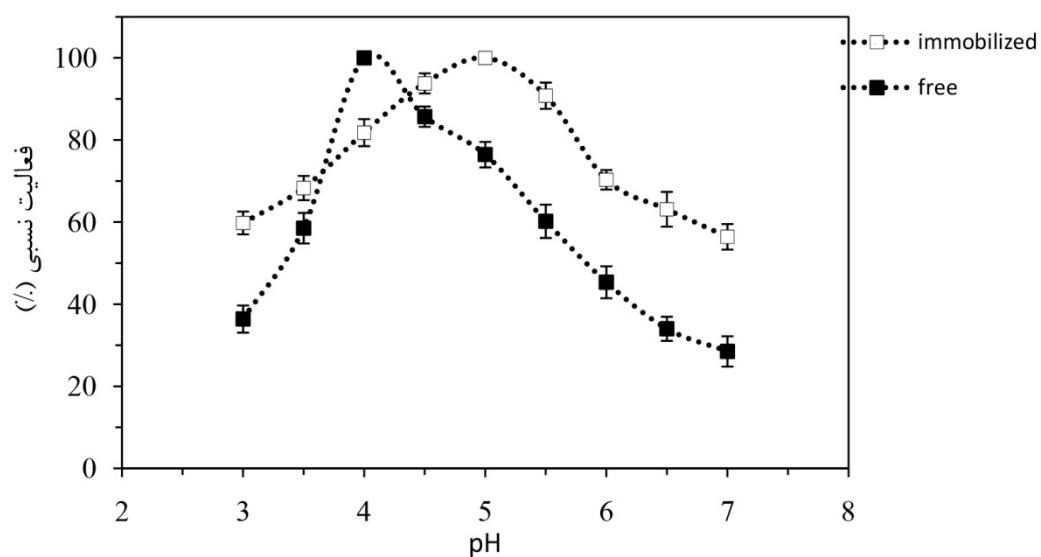
شکل ۲: طیف سنجی تفکیک انرژی بعد از ثبیت لکاز

لکاز آزاد و ثبیت شده، 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) گزارش شده است. طبق نمودارهای مذکور بیشینه فعالیت آنزیم آزاد و ثبیت شده به ترتیب در pH برابر ۴ و ۵ و در دمای ۴۰ و ۵۰ درجه سلسیوس حاصل گردید.

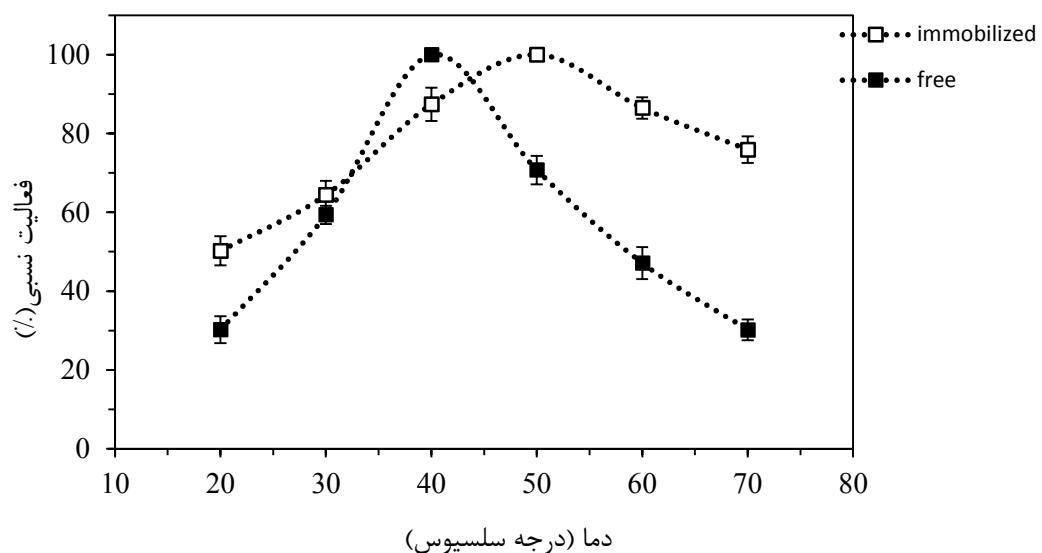
تأثیر pH و دما بر روی فعالیت آنزیم آزاد و ثبیت شده

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 برابر ۳ تا ۷ سنجش شد. همچنین تأثیر دما بر فعالیت آنزیم

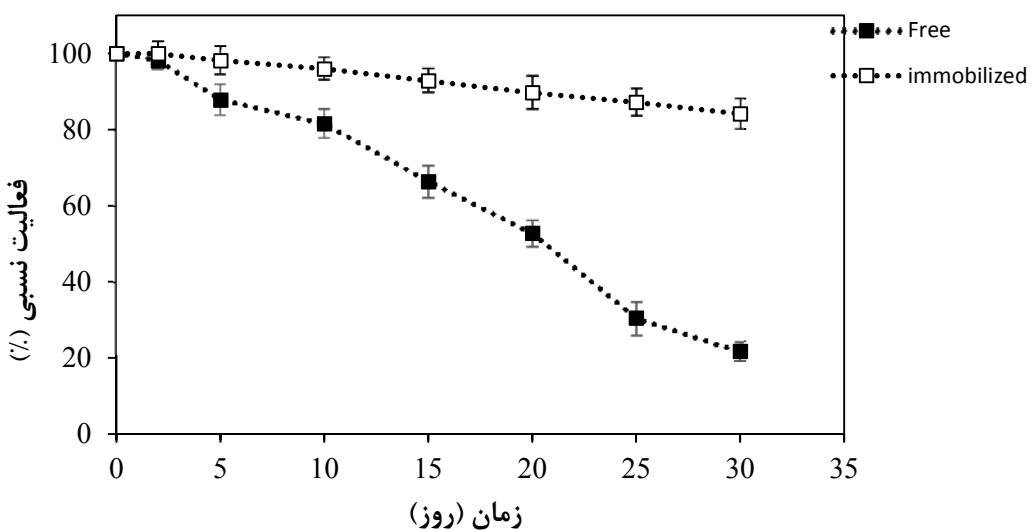
*نویسنده مسئول: گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی ایران
ایمیل: rezaei.r@iums.ac.ir - تلفن تماس: ۰۲۱-۸۸۶۰۷۹۴۶



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



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

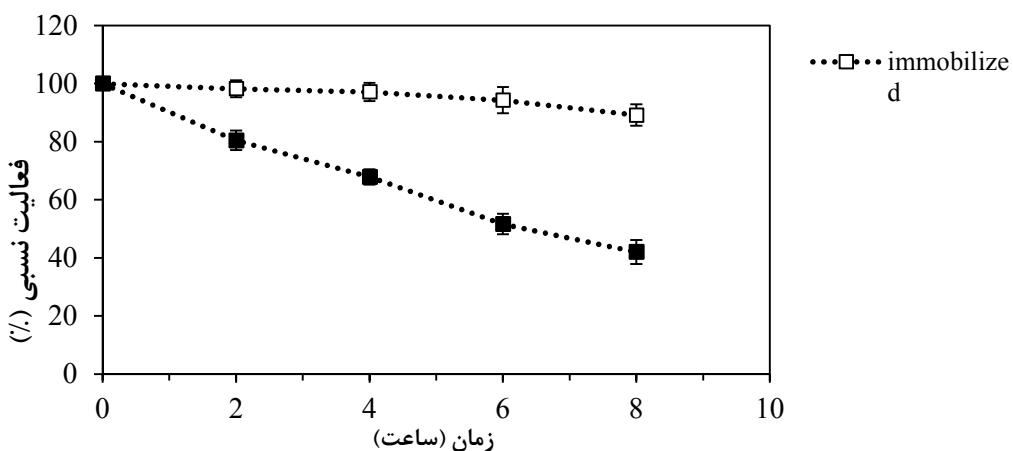


نمودار ۳: ثبات ذخیره سازی آنزیم آزاد و ثبیت شده

سنجدیده 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 درحالی که آنزیم ثبیت شده بیش از ۸۰٪ از فعالیت اولیه را حفظ نموده است.

پایداری ذخیره سازی آنزیم آزاد و ثبیت شده

نمودار (۳)، نتایج ثبات ذخیره سازی در مدت ۳۰ روز را ارائه می‌نماید. جهت بررسی پایداری آنزیم آزاد و ثبیت شده در طی دوره ذخیره سازی در بافر فسفات (0.1 M , $\text{pH}=5$) در دمای 4°C ، فعالیت لکاز آزاد و ثبیت شده به طور روزانه موردنیش قرار گرفت. بستر حاوی آنزیم ثبیت شده به طور روزانه برداشت شده و میزان فعالیت آن توسط محلول ABTS



نمودار ۴: پایداری حرارتی آنزیم آزاد و ثبیت شده در دمای 50°C در $\text{pH}=5$ در مدت ۸ ساعت

بدین منظور فعالیت آنزیم آزاد و ثبیت شده در فواصل

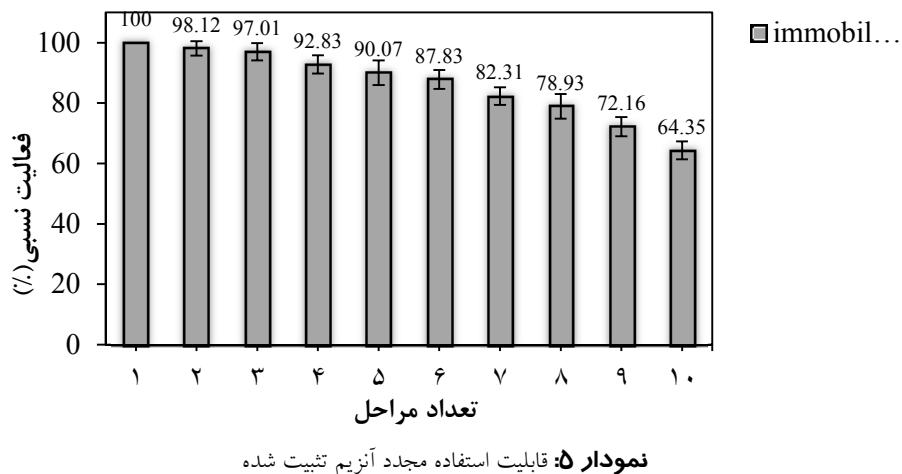
پایداری حرارتی آنزیم آزاد و ثبیت شده

آنزیم ثبیت شده نیز بررسی گردید. به این منظور تعداد دفعاتی که آنزیم ثبیت شده قادر به اکسیداسیون ABTS به عنوان سوبسترا بود، مورد مطالعه قرار گرفت. پس از هر بار اکسیداسیون ABTS، آنزیم ثبیت 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 ثبیت شده تقریباً ۶۴٪ از فعالیت آنزیم باقی مانده است.

زمانی ۲ ساعت پس از قرار گرفتن در دمای ۵۰°C موردنجاش قرار گرفت. در نمودار (۴)، نتایج پایداری حرارتی آنزیم آزاد و ثبیت شده قابل مشاهده است. طبق نمودار مذکور آنزیم آزاد بعد از ۸ ساعت قرار گرفتن در دمای ۵۰°C تقریباً ۷۰٪ از فعالیت اولیه را از دست داده است در حالی که در آنزیم ثبیت شده تقریباً ۱۰٪ از فعالیت اولیه کاهش یافته است.

قابلیت استفاده مجدد آنزیم ثبیت شده

یکی از مهم‌ترین مزایای ثبیت آنزیم توانایی استفاده مجدد از آن است. به همین دلیل در این مطالعه نیز این خصوصیت



می‌باشد.^{۲۰} در مطالعه Wang و همکاران نیز نتایج آنالیز XRD نانوذرات Fe₃O₄@SiO₂ مشابه مطالعه حاضر گزارش شده است که مؤید ساختار اسپینل مکعبی برای نانوذرات مذکور می‌باشد.^{۱۴}

در شکل (۲) که تصویر SEM قبل از ثبیت را نشان می‌دهد، مورفولوژی کروی نانوذرات Fe₃O₄@SiO₂ و کمی تراکم مشهود است. همچنین در شکل (۳) مشاهده می‌شود بعد از ثبیت آنزیم مورفولوژی نانوذرات تغییر نکرده است. در طیف‌سنجی EDX با اندازه‌گیری انرژی پرتوهای X متشرشده از نمونه، امکان بررسی کمی و کیفی نمونه میسر می‌شود و می‌توان نوع و میزان عناصر موجود در نمونه را مشخص کرد.

بحث

در شکل (۱) پیک‌های ایجاد شده در زوایای ۳۰/۲، ۳۲/۱، ۴۳/۲، ۵۶/۸، ۶۲/۸، ۷۴ درجه طبق استاندارد BS EN 13925-1: 2008 نشان‌دهنده کریستال‌های مکعبی Fe₃O₄ می‌باشد. همچنین حداکثر پیک در زاویه ۳۵/۷ درجه مشاهده می‌شود. در پژوهش Hu و همکاران نتایج آنالیز XRD نانوذرات Fe₃O₄@SiO₂ ۶ پیک در محدوده ۲۰ تا ۷۰ درجه منطبق با نتایج مطالعه حاضر نشان داد و بلندترین پیک در زاویه ۳۵/۵۸ درجه مشاهده شده است. همچنین آن‌ها گزارش کردند که هیچ پیک دیگری در این محدوده مشاهده نکردند که نشان‌دهنده ساختار اسپینل تک فاز نانوذرات Fe₃O₄

می نماید که می تواند از دناتوراسیون اسیدی یا قلیایی آنزیم جلوگیری نماید.^{۲۷، ۲۶، ۲۰} نتایج مشابهی در رابطه با فعالیت آنزیم آزاد و ثبیت شده در متون گزارش شده است. در مطالعه Wang و همکاران حداکثر فعالیت آنزیم آزاد و ثبیت شده بر روی نانوذرات مغناطیسی سیلیس مزوحفه به ترتیب در pH برابر ۴ و ۵ مشاهده شد^{۱۴}، Liu و همکاران نیز تغییر pH برابر ۴ و ۵ مشاهده شد^{۱۴}، و بهینه از ۳ برای آنزیم آزاد به ۴ برای آنزیم ثبیت شده بر روی نانوذرات کربن مزوحفه مغناطیسی را گزارش کردند همچنین آنزیم آزاد در pH برابر ۷ تقریباً ۹۰٪ فعالیت خود را از دست داد در حالی که آنزیم ثبیت شده فقط ۵۰٪ از فعالیتش را از دست داده بود.^۷ در مطالعه دهقانی فرد و همکاران میزان فعالیت لکاز آزاد و ثبیت شده بر روی سیلیکای متخلخل در محدوده pH برابر ۳-۸ 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 ثبیت شده برابر ۶۰-۷۰٪ بوده است.^{۲۸}

تأثیر دما بر فعالیت لکاز آزاد و ثبیت شده

نمودار (۲) نشان می دهد که حداکثر فعالیت آنزیم آزاد و ثبیت شده به ترتیب در دمای ۴۰ و ۵۰ درجه سلسیوس مشاهده شد. علت افزایش دمای بهینه در حالت ثبیت شده می تواند به افزایش انرژی فعل سازی آنزیم برای پیوند به سوبسترا در حالت ثبیت شده نسبت داده شود. علاوه بر این، کاهش تحرك مولکولی آنزیم ثبیت شده منجر به حفظ فعالیت در محدوده دمایی وسیع تری می شود.^{۲۲، ۲۰، ۱۴} همان طور که در نمودار مذکور مشاهده می شود، آنزیم ثبیت شده در دمای C ۷۰٪ 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 ۴۰°C و برای آنزیم ثبیت شده بر روی نانوذرات

شکل (۴) وجود عناصر آهن، اکسیزن و سیلیس را در نانوذرات سنتز شده تأیید می کند و در شکل (۵) مشاهده می شود که علاوه بر ۳ عنصر فوق الذکر عناصر نیتروژن، کربن و مس نیز وجود دارد که این مطلب تصدیق حضور آنزیم بر روی نانوذرات Fe₃O₄@SiO₂ بعد از ثبیت آنزیم می باشد. حضور عناصر فسفر، پتاسیم و سدیم به دلیل بافر مورد استفاده می باشد.^{۱۰}

تأثیر pH بر فعالیت لکاز آزاد و ثبیت شده

از آنجاکه آنزیم ها پلیمرهای چند یونی هستند، انتظار می رود 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} عموماً روند تغییر فعالیت لکاز در pH های متفاوت دارای شکل زنگولهای می باشد و لکازهای با منشأ متفاوت دارای pH اپتیمم در محدوده ۱-۱۱ می باشند. اما اغلب لکازهای قارچی در pH اسیدی بهتر عمل می کنند.^{۲۴، ۲۳} در اکسیداسیون فنل، pH بهینه برای لکاز استخراج شده از گیاهان، برابر ۹ و برای لکاز تولید شده از قارچ ۳-۷ بوده است.^{۲۵} نتایج مطالعه حاضر نیز منطبق با مطالب فوق می باشد. در نمودار (۱) ملاحظه می گردد که فعالیت نسبی آنزیم لکاز آزاد و ثبیت شده در محدوده pH برابر ۳ تا ۷ از شکل زنگولهای تبعیت می کند و حداکثر فعالیت لکاز آزاد و ثبیت شده به ترتیب در pH برابر ۴ و ۵، نمایان شده است. تغییر pH بهینه بعد از ثبیت به تعاملات یونی بین آنزیم و سطح بستر منسوب شده است.^{۱۴} همچنین نمودار (۱) گویای این مطلب می باشد که آنزیم pH ثبیت شده نسبت به آنزیم آزاد کمتر تحت تأثیر تغییرات pH قرار گرفته است. دلیل مقاومت آنزیم ثبیت 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

با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. Dai و همکاران جهت سنجش ثبات ذخیره‌سازی آنزیم لکاز تثبیت شده بر روی نانوذرات سیلیس مغناطیسی عملکرد آن را در حذف رنگ قبل و بعد از مدت ۵ ماه ذخیره‌سازی در دمای 40°C ارزیابی نمودند و نتایج آنها میزان ۱۰۰٪ حذف را با غلظت آلاینده 50 mg/L و 30 mg/L به ترتیب برای قابل و بعد از ذخیره‌سازی نشان داد^{۱۲}. در مطالعه Wang و همکاران آزمایش انجام شده به منظور تعیین ثبات ذخیره‌سازی، نشان داد که آنزیم آزاد بعد از ۷ هفته ذخیره‌سازی در دمای 40°C به طور کامل فعالیت خود را از دست داد درصورتی که آنزیم 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 درحالی 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 ۶ در محدوده $80\text{--}20^{\circ}\text{C}$ انجام گرفت و نتایج مطالعه نشان داد حداکثر فعالیت لکاز آزاد در 35°C و لکاز تثبیت شده در 45°C بوده درحالی 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 داده است^{۱۰}.

مغناطیسی سیلیس 50°C گزارش نمودند و آنزیم تثبیت شده در دمای $30\text{--}60^{\circ}\text{C}$ درجه سلسیوس بیش از ۷۰٪ 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 درحالی 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 ۶ در محدوده $80\text{--}20^{\circ}\text{C}$ انجام گرفت و نتایج مطالعه نشان داد حداکثر فعالیت لکاز آزاد در 35°C و لکاز تثبیت شده در 45°C بوده درحالی 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 ذخیره‌سازی لکاز آزاد و تثبیت شده

نتایج آزمایش‌ها در مطالعه پیش رو نشان داد، ثبات ذخیره‌سازی آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذرات اکسید آهن پوشش دار شده با سیلیس بعد از 30 روز ذخیره‌سازی در مقایسه با آنزیم آزاد بسیار بالاتر می‌باشد. به طوری که $84/17\%$ از فعالیت آنزیم تثبیت شده و فقط $21/8\%$ از فعالیت آنزیم آزاد بعد از 30 روز ذخیره‌سازی در دمای 40°C باقی‌مانده است. که این امر می‌تواند به اثر تثبیت ساختار سه‌بعدی آنزیم و همچنین نقش محافظتی بستر، که تغییرات ساختاری بیوکاتالیست را محدود می‌کند، نسبت داده شود^{۲۹}. اظهارات فوق در نمودار (۳) قابل مشاهده می‌باشد. نتایج سایر مطالعات

پایداری حرارتی لکاز آزاد و تثبیت شده

در نمودار (۴) مشاهده می‌شود که روند کاهش فعالیت آنزیم در حالت تثبیت شده کنترل از حالت آزاد می‌باشد. به طوری که آنزیم تثبیت شده در دمای 50°C بعد از 8 ساعت آزاد $4/12 \pm 0.87\%$ از فعالیت اولیه را از دست داد اما در حالت آزاد در این شرایط تقریباً $57/95 \pm 0.98\%$ از فعالیت لکاز کاهش یافت است. Hu و همکاران گزارش نمودند که فعالیت آنزیم تثبیت شده بر روی نانوذرات سیلیس مغناطیسی بعد از 2 ساعت انکوباسیون در دمای 50°C حدود 98% فعالیت اولیه

نانوذرات مغناطیسی سیلیس با استفاده از ABTS به عنوان سوبسترا پس از ۶ مرتبه استفاده از لکاز ثبیت شده میزان فعالیت باقیمانده برابر $75/8\%$ از فعالیت اولیه بوده است.^{۳۱} در مطالعه dai و همکاران برای ارزیابی قابلیت استفاده مجدد لکاز ثبیت شده بر روی نانوذرات مغناطیسی سیلیس از کارآیی آنژیم در حذف رنگ Red MX-5B بهره گرفته شده است. پس از ۲۰ مرتبه استفاده از آنژیم ثبیت شده راندمان حذف بیش از 80% گزارش شده است.^{۱۲} روحانی و همکاران در پژوهش خود به منظور مطالعه قابلیت استفاده مجدد از لکاز ثبیت شده بر روی نانوذرات اکسید آهن پوشیده با سیلیس از ABTS به عنوان سوبسترا استفاده نمودند و گزارش نمودند بیش از 85% از فعالیت آنژیم پس از ۶ مرتبه استفاده از لکاز ثبیت شده همچنان باقیمانده است.^{۱۰}

نتیجه گیری

طبق یافته های به دست آمده از این پژوهش ثبیت لکاز بر روی نانوذرات اکسید آهن پوشش دار شده با سیلیس منجر به بهبود پایداری آنژیم تحت شرایط مختلف محیطی در مقایسه با لکاز آزاد شده است و با نگاه به پژوهش های انجام شده بر روی توانایی این آنژیم در حذف و تجزیه آلینده های زیست محیطی از قبیل هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای، ترکیبات فنلی و سایر زنوبایوتیک ها، می توان اذعان داشت بنا به دلایلی چون قابلیت استفاده مجدد و افزایش ماندگاری لکاز ثبیت شده و در نتیجه کاهش مقدار آنژیم مصرفی، کاربرد آن در زیست پالایی آلینده 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، ثبیت آنژیم لکاز جهت کاربرد در پالایش خاک از آلینده های آلی بوده است.

بوده است در حالی که آنژیم آزاد حدود 40% از فعالیت اولیه خود را در این شرایط را حفظ کرده است.^{۲۰} در مطالعه kadam و همکاران، آنژیم لکاز ثبیت شده بعد از ۶ ساعت قرار گرفتن در دمای 60°C 91% از فعالیت اولیه خود را حفظ نمود در حالی که آنژیم آزاد در این شرایط حدود 40% از فعالیت اولیه خود را نشان داد.^{۲۰} در مطالعه Xu و همکاران پایداری آنژیم آزاد و ثبیت شده بر روی نانو فیبرهای متخلخل در دمای $80^{\circ}\text{C} - 10^{\circ}\text{C}$ به مدت ۳ و 24 ساعت سنجش شده است و نتایج گزارش شده نشان دهنده این مطلب است که کاهش فعالیت آنژیم لکاز ثبیت شده نسبت به آنژیم آزاد کنترل و با شبیه ملایم تر بوده است به طوری که میزان فعالیت از دست رفته برای لکاز ثبیت شده بعد از ۲۴ ساعت در دمای 60°C و 50°C ، به ترتیب 65% و 25% بوده است در حالی که لکاز آزاد تقریباً 100% و 95% از فعالیت اولیه خود را تحت شرایط مذکور از دست داده است. آنها عنوان کردند زمانی که دمای بالا منجر به غیرفعال شدن آنژیم آزاد می گردد در آنژیم ثبیت شده پیوند کووالانسی بین آنژیم و بستر می تواند از دناتوراسیون ساختاری آنژیم جلوگیری کند. در واقع بستر اثر حفاظت کنندگی بر روی آنژیم اعمال می کند.^۳

قابلیت استفاده مجدد لکاز ثبیت شده

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

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 تشكیر و قدردانی به عمل می آید.

سپاسگزاری

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

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 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.
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*

- 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 decolorization. *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 *Hippopsgonia communis* sponge 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.