

磁性 SiO₂ 纳米粒子的制备及其用于漆酶固定化

刘宇^{1,3}, 郭晨¹, 王锋^{2,3}, 刘春朝², 刘会洲¹

(1. 中国科学院过程工程研究所绿色过程与工程重点实验室, 北京 100190;

2. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100190; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 以氨基修饰的磁性 SiO₂ 纳米粒子为载体, 通过交联剂戊二醛固定漆酶, 对固定化条件进行了优化, 比较了固定化酶与游离酶的酶学性质. 结果表明, 漆酶固定化的最佳条件为戊二醛浓度 8% (w), 固定化时间 6 h, 缓冲液 pH 值 7.0, 初始酶液浓度 0.15 g/L. 固定化的漆酶的最适 pH 为 4.0, 最适温度为 20 °C. 在 60 °C 条件下保温 4 h, 固定化漆酶仍能保持酶活力 60.9%, 在连续 10 次操作后, 酶活力仍能保持 55% 以上, 其热稳定性和操作稳定性均比游离酶高.

关键词: 磁性 SiO₂; 纳米粒子; 漆酶; 固定化

中图分类号: Q814.2

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2008)03-0583-06

1 前言

漆酶(EC1.10.3.2)是含有 4 个铜离子的多酚氧化酶, 可分为真菌漆酶和漆树漆酶两大类, 它主要分布在一些高等植物如漆树及一些真菌如白腐菌中^[1]. 漆酶作用的底物相当广泛, 包括许多芳香族化合物, 如氯代酚、多氯联酚、二氯苯胺、杀虫剂、染料等^[2-5]. 由于具有相当宽泛的底物专一性和较好的稳定性, 漆酶在废水处理、生物漂白、芳香化合物转化、生物传感器构建等方面具有重要应用价值^[6-9]. 但游离漆酶在使用过程中易随环境的变化变性失活, 且不易从反应体系中分离重复使用, 这在一定程度上限制了漆酶的工业化应用. 酶固定化技术是实现酶重复连续使用和改善其稳定性的有效手段, 因此漆酶的固定化研究引起了人们的广泛关注.

漆酶的固定化载体主要有多孔玻璃^[10]、壳聚糖^[11-13]、硅藻盐^[8,14]和纤维素聚胺复合物等^[15]. 由于磁性载体固定化酶在磁场作用下可从反应体系中迅速分离, 有利于回收和反复使用、降低成本的特点, 近年来, 用磁性载体材料固定化漆酶越来越受到重视. Jiang 等^[13]用磁性壳聚糖、Xiao 等^[16]以四氨基酞菁铜(CuTAPc)包覆在 Fe₃O₄ 纳米粒子表面, 通过交联戊二醛的方法固定化漆酶; Zhu 等^[17]以制备的磁性介孔 SiO₂ 材料为载体, 分别通过物理吸附和共价结合的方法固定化漆酶; Pich 等^[18]以磁性 γ-Fe₂O₃ 与苯乙烯、乙烷基乙酸和甲基丙烯酸酯的聚合物(PS-AAEM)为载体, 通过载体上能与酶作用的 β-二酮活性基团固定化漆酶; Wang 等^[19]用含铜离子的磁性螯合颗粒 PVA-DVB-g-GMA-IDA-Cu²⁺ 亲和吸附漆酶. 这些文献报道的固定化漆酶的载体大多为微米级. 与微米尺度的载体相比, 纳米载体具有更高的比表面积, 可以

固定大量的酶, 另外在酶促反应中, 底物更容易与固定化酶接触, 达到更好的催化效果. 磁性 SiO₂ 纳米粒子不但具备纳米尺度, 而且与其他载体相比其制备过程相对简便, 因此用磁性 SiO₂ 纳米颗粒作为载体固定化漆酶有很好的应用前景.

本工作通过在共沉淀过程中加入柠檬酸三钠和十六烷基三甲基溴化铵(CTAB), 制备出分散性较好的 Fe₃O₄ 纳米颗粒, 以此 Fe₃O₄ 纳米颗粒为核, 用改进的溶胶-凝胶法制备出分散性较好的磁性 SiO₂ 纳米粒子, 再通过硅烷偶联剂将其氨基修饰, 然后以氨基化的 SiO₂ 纳米粒子为载体, 通过交联剂戊二醛固定化漆酶, 研究了交联剂浓度、固定化时间、缓冲液 pH 值、初始酶液浓度等因素对固定化漆酶活力的影响, 确定了载体固定化漆酶的最佳操作条件, 同时还比较了固定化酶和游离酶的米氏常数(K_m 值)、最适 pH 值和温度、热稳定性、操作稳定性等酶学性质.

2 实验

2.1 主要试剂和仪器

漆酶(产自白腐菌 *Trametes versicolor*, 美国 Fluka 公司), 邻苯二酚(北京化学试剂公司), 正硅酸乙酯 (TEOS, 天津市大茂化学试剂厂), 异丙醇(北京化工厂), 氯化亚铁(FeCl₂·4H₂O)、三氯化铁(FeCl₃·6H₂O)为天津市福晨化学试剂厂产品, 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB, 北京化学试剂公司), 柠檬酸三钠(天津市大茂化学试剂厂), 所有试剂均为分析纯.

Tecnai G² 透射电子显微镜(荷兰 Philips 公司), JSM-6700F 扫描电子显微镜(日本 JEOL 公司), MicoMagTM 2900 交变梯度磁强计(美国 PMC 公司),

Vector 22 傅立叶变换红外光谱仪(德国 Bruker 公司), UNICO UV-2000 紫外-可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司].

2.2 实验方法

2.2.1 氨基修饰的磁性 SiO₂ 纳米粒子的制备

用共沉淀法制备 Fe₃O₄ 纳米颗粒. 在盛有 100 mL 去离子水的 500 mL 搅拌式反应器中加入 0.01 mol FeCl₃·6H₂O, 0.005 mol FeCl₂·4H₂O 和 0.0003 mol 柠檬酸三钠, 在氮气保护下, 升温至 80 °C, 倾入约 10 mL 浓氨水溶液, 然后立即加入一定量的 CTAB, 反应 30 min 后冷却至室温. 产物用磁铁分离后, 经去离子水反复清洗, 于异丙醇溶液中保存.

取一定量 Fe₃O₄ 纳米颗粒于异丙醇、水和氨水的混合液(体积比为 100:20:3)中, 缓慢滴加一定量 TEOS, 室温条件下机械搅拌反应 12 h. 产物用磁铁分离后, 经去离子水反复清洗, 在真空下干燥 24 h, 即得磁性 SiO₂ 纳米粒子.

取 3 g 磁性 SiO₂ 纳米粒子于含有 100 mL 甲苯的 500 mL 圆底烧瓶中, 超声 20 min 后加入 10 mL γ -氨基丙基三乙基硅烷(3-APTES), 然后在油浴中 120 °C 连续磁力搅拌回流 4 h. 反应结束后, 用磁铁分离, 用甲苯和丙酮各洗涤 3 次去除未反应的 3-APTES, 再经 120 °C 真空干燥 12 h, 得到氨基修饰的磁性 SiO₂ 纳米粒子.

2.2.2 磁性载体的活化

在 50 mL 锥形瓶中加入一定量氨基修饰的磁性 SiO₂ 纳米粒子, 加入 0.2 mol/L pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液和一定浓度的戊二醛 20 mL, 在室温下放入摇床中, 转速 150 r/min, 反应 12 h. 产物用去离子水充分清洗, 得到表面醛基化的磁性载体备用.

2.2.3 漆酶的固定化

在 50 mL 锥形瓶中加入醛基化的磁性载体 25 mg,

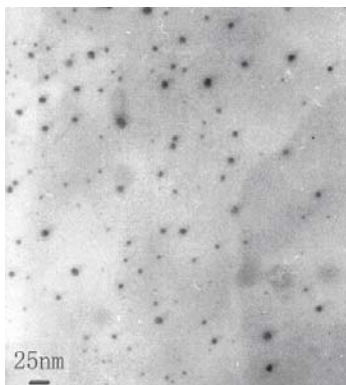


图1 Fe₃O₄ 纳米颗粒的 TEM 图
Fig.1 TEM image of magnetite nanoparticles

加入 10 mL pH 7.0 的磷酸盐缓冲液, 再分别加入不同量的漆酶, 于 25 °C、转速 150 r/min 下在摇床中振荡反应一定时间, 然后将固定在载体上的漆酶用磁铁分离, 用缓冲液反复洗涤直至上清液中检测不到蛋白质为止. 固定化漆酶在缓冲液中保存于 4 °C 的冰箱中备用.

2.2.4 漆酶含量的测定

按照文献[20]的方法进行, 以牛血清蛋白为标准.

2.2.5 漆酶酶活的测定

分别将一定量的游离漆酶或固定化漆酶溶于 3 mL 含 1 g/L 邻苯二酚的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH 4.0)中, 用紫外-可见分光光度计测定反应体系 5 min 内 450 nm 处的吸光度变化, 求出反应初速度. 邻苯二酚的消光系数为 2211 L/(mol·cm). 定义 1 min 氧化 1 μ mol 邻苯二酚的酶量为 1 个酶活力单位(U).

固定化酶活回收率 $R(\%)$ 的计算公式为

$$R = A_i / A_f \times 100\%$$

式中, A_i 是固定化酶的酶活(U), A_f 是与固定化酶等量的游离酶的酶活(U).

相对酶活的计算: 为了确定固定化漆酶的最佳操作条件和比较固定化漆酶与游离漆酶的酶学性质, 以某一参数下的最大酶活为 100%.

3 结果与讨论

3.1 氨基修饰的磁性 SiO₂ 纳米粒子

图 1 为 Fe₃O₄ 纳米颗粒的 TEM 照片. 从图可见, Fe₃O₄ 纳米颗粒的分散性较好, 除少量团聚外, 其粒径在 5 nm 左右(图 2). 这是由于加入的柠檬酸根离子在 Fe₃O₄ 成核过程中吸附在其表面, 阻止了颗粒的进一步生长, 因而颗粒的大小比未加柠檬酸三钠时共沉淀法制备的颗粒小; 同时柠檬酸根离子带负电, 可经静电作用

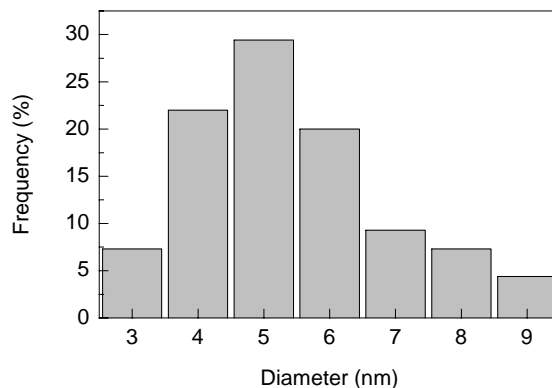


图2 Fe₃O₄ 纳米颗粒的粒径分布
Fig.2 Size histogram of magnetite nanoparticles

防止颗粒的团聚^[21]. CTAB 是一种阳离子表面活性剂, 能与带负电的柠檬酸根离子产生静电作用. 加入的 CTAB 通过静电作用在磁性 Fe₃O₄ 微粒表面形成疏水的内壳和亲水的外壳, 这样磁性颗粒之间由于静电排斥和位阻排斥的双重作用而稳定分散在水溶液中, 形成水基磁流体.

图 3 是磁性 SiO₂ 的 SEM 照片, 从中可以看到, 磁性 SiO₂ 纳米颗粒呈单分散性, 粒径 160 nm 左右(图 4). 图 5 是磁性 SiO₂ 和氨基修饰的磁性 SiO₂ 的红外谱图,

1579 cm⁻¹ 是—NH₂ 中的 N—H 的弯曲振动峰, 由此证明了氨基已修饰在磁性 SiO₂ 的表面. 图 6 是磁性 SiO₂ 纳米粒子的磁滞回线, 可以看出磁化曲线和退磁曲线重合, 无磁滞现象. 在外加磁场为 0 时, 剩余磁化强度和矫顽力均为 0, 产物具有超顺磁性, 比饱和磁化强度为 10.4 emu/g.

3.2 漆酶固定化条件的优化

3.2.1 戊二醛浓度对漆酶固定化的影响

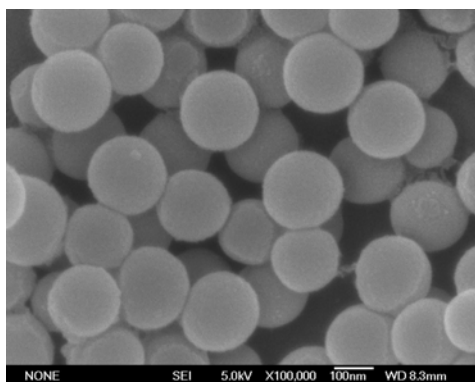


图 3 磁性 SiO₂ 纳米粒子的 SEM 图
Fig.3 SEM image of magnetic silica nanoparticles

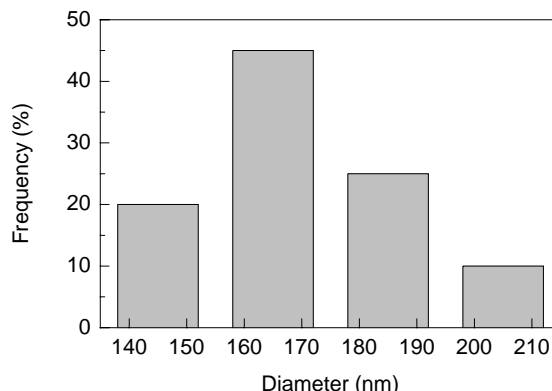


图 4 磁性 SiO₂ 纳米粒子的粒径分布
Fig.4 Size histogram of magnetic silica nanoparticles

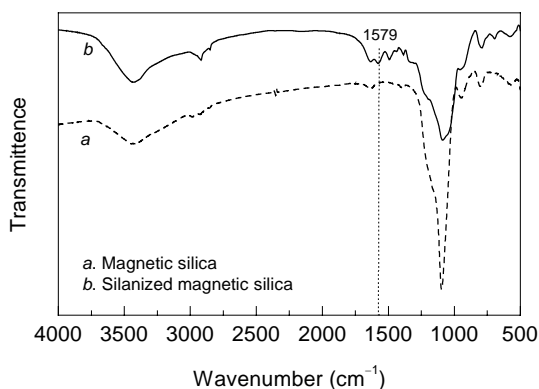


图 5 磁性 SiO₂ 和氨基修饰的磁性 SiO₂ 的红外谱图
Fig.5 FT-IR spectra of magnetic silica (a) silanized magnetic silica (b)

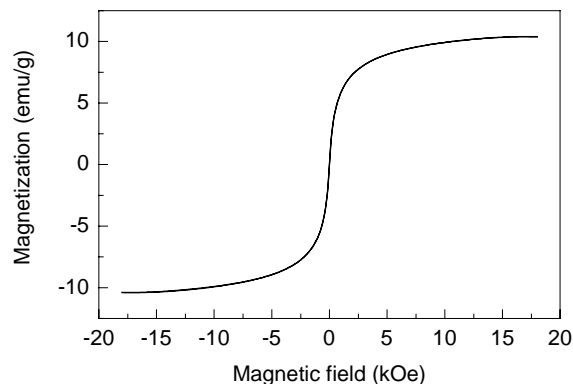


图 6 磁性 SiO₂ 的磁滞回线
Fig.6 Hysteresis loop of magnetic silica nanoparticles

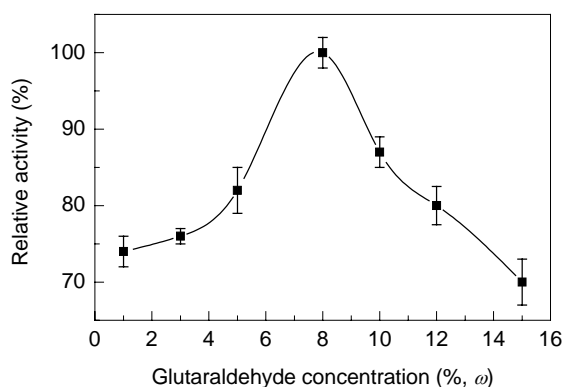


图 7 戊二醛浓度对漆酶固定化的影响
Fig.7 Effect of glutaraldehyde concentration on laccase immobilization

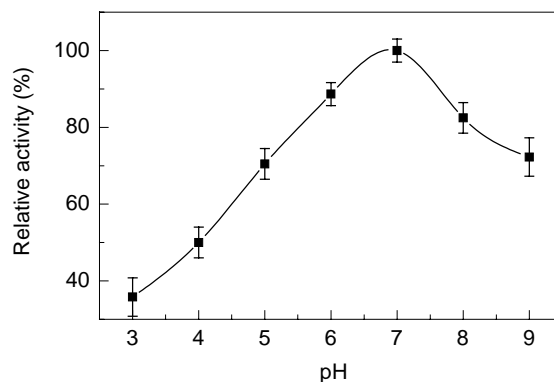


图 8 缓冲液 pH 对漆酶固定化的影响
Fig.8 Effect of pH on laccase immobilization

图7给出了不同浓度戊二醛活化的载体对固定化漆酶酶活的影响. 结果表明, 当戊二醛浓度为 8%(ω)时, 固定化酶的酶活最高; 戊二醛浓度低于 8%, 磁性载体表面的醛基较少, 从而影响固定化酶的结构稳定性, 其酶活就会较低; 浓度高于 8%时, 由于戊二醛既是交联剂, 同时也是一种蛋白变性剂, 过量的戊二醛会使酶变性而导致酶活损失. 因此, 选择浓度为 8%的戊二醛缓冲液活化氨基修饰的磁性 SiO_2 作为固定化漆酶的载体.

3.2.2 缓冲液 pH 值对漆酶固定化的影响

在酶固定化反应中, 由于酶和固定化载体都存在于缓冲液中, 而缓冲液的 pH 值可以改变酶分子和固定化载体的离子化状态; 另外, 酶作为一种蛋白质, 当溶液的 pH 值超过一定范围时, 微观结构会发生变化, 从而引起酶的失活. 因此缓冲液 pH 值是影响漆酶固定化的关键因素之一. 在不同 pH 值的磷酸盐缓冲液中固定化漆酶, 并测定其酶活, 结果见图 8. 从图可以看到, 在 pH 7.0 条件下固定化所得的固定化漆酶的活力最高. 因此本实验的缓冲液 pH 值选择为 7.0.

3.2.3 固定化时间对漆酶固定化的影响

图 9 给出了固定化时间对固定化漆酶酶活的影响. 从图可以看到, 在反应开始阶段, 酶活随着时间的延长而上升, 到 6 h 酶活达到最大值, 随后随着时间的延长, 酶活逐渐开始下降. 这说明当固定化反应进行 6 h 时, 漆酶的固定化反应基本完成; 固定化时间少于 6 h, 固定化反应不完全; 固定化时间过长, 反而会造酶酶的失活. 因此本实验的固定化时间选择为 6 h.

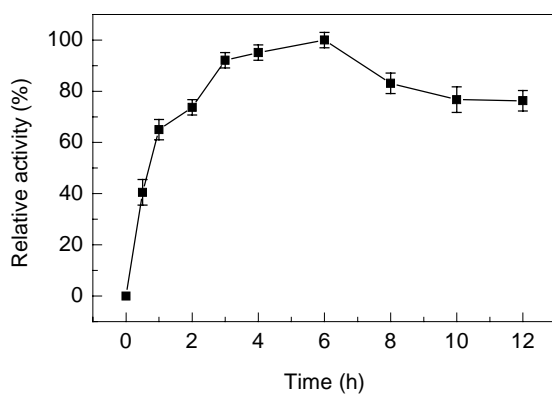


图9 固定化时间对固定化漆酶酶活的影响
Fig.9 Effect of adsorption time on laccase immobilization

3.2.4 初始酶浓度对漆酶固定化的影响

图 10 给出了在 pH 7.0、固定化时间 6 h 及 10 mg 载体、反应体系为 10 mL 时初始酶浓度对固定化漆酶酶活和固定化酶量的影响. 由图可见, 固定化酶的酶活和载体的漆酶固定量随初始酶浓度的增大而提高, 但当初

始酶浓度增加到一定程度后, 固定化酶的活力开始下降, 载体的漆酶固定量上升不再明显. 这是因为固定化载体可固定的酶量是有限的, 当初始酶浓度较低时, 随着酶液浓度的增加, 固定到磁性载体的酶量增加, 活性也相应提高; 但是若酶液浓度过高, 则会造成酶分子相互聚集成团, 导致酶分子的活性中心相互遮盖, 致使酶的活性降低. 实验结果得出, 当初始酶液浓度为 0.15 g/L 时固定化酶活最高可达到游离酶活的 73.2%; 磁性载体在酶液浓度为 0.3 g/L 时固定化酶量接近饱和, 为 58 mg/g. 因此本实验固定化漆酶的最佳初始酶浓度选择为 0.15 g/L, 此时固定化酶量为 39 mg/g.

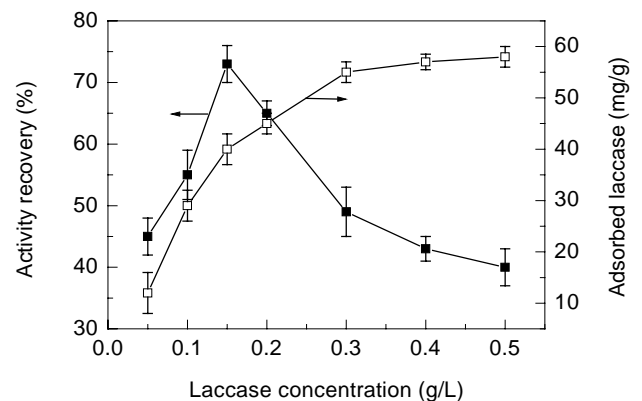


图10 初始酶浓度对固定化漆酶的影响
Fig.10 Effect of enzyme concentration on laccase immobilization

3.3 固定化漆酶的酶学性质

3.3.1 米氏常数(K_m)

将底物分别配成 4.5, 9.1, 18.2, 27.3, 36.4 mmol/L 的溶液, 在磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH 4.0)中测定 450 nm 处吸光度变化以计算酶反应的初速度. 以底物浓度 (C)的倒数为横坐标, 酶反应初速度(v)的倒数为纵坐标, 作 Lineweaver-Burk 双倒数图如图 11. 由双倒数法求得

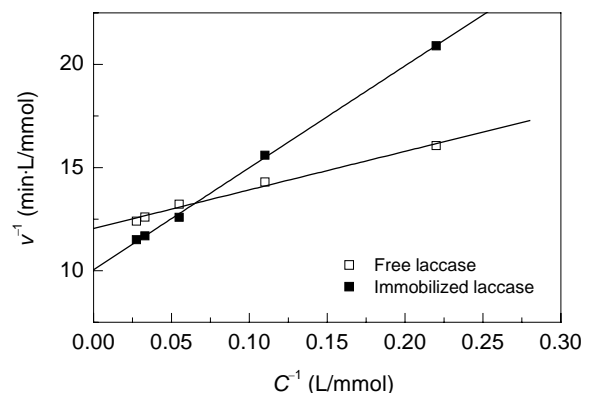


图11 游离漆酶和固定化漆酶的米氏常数
Fig.11 Michaelis constant of free and immobilized laccase

固定化酶的 K_m 值为 4.91 mmol/L, 游离酶的 K_m 值为 1.55 mmol/L. K_m 值反映漆酶对底物的亲和力, K_m 值越小, 亲和力越大, 对底物的催化效率越高. 固定化后漆酶的 K_m 值比游离酶大是因为固定化后漆酶分子的空间自由度受到限制, 直接影响到活性中心对底物的定位作用.

3.3.2 最适 pH 和温度

图 12 给出了在不同 pH 值的反应体系中游离漆酶和固定化漆酶酶活的变化. 从图可以看出, 漆酶固定化后对底物作用的最适 pH 基本不变, 在 4.0~4.5 之间. 固定化漆酶显示了高 pH 条件下的稳定性, 在 pH 4.5~6.0 之间, 相比游离漆酶, 固定化漆酶的酶活下降相对缓慢, pH 6.0 时固定化漆酶还保持 30% 的活性, 而游离漆酶在此时基本丧失了催化性能.

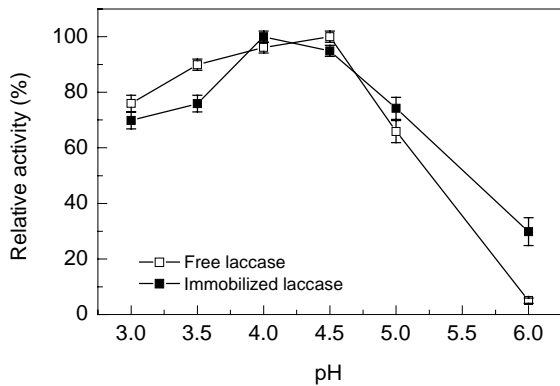


图 12 pH 值对游离漆酶和固定化漆酶酶活的影响
Fig.12 Effect of pH on the activity of free and immobilized laccase

图 13 反映了温度对固定化漆酶和游离漆酶的影响. 20~30℃ 的温度范围内, 固定化漆酶和游离漆酶都保持了较高的活力, 随着温度的增加酶活逐步下降. 在 40~70℃, 与游离漆酶相比, 固定化漆酶的酶活下降相对缓慢, 这表明固定化漆酶具有较好的温度适应性.

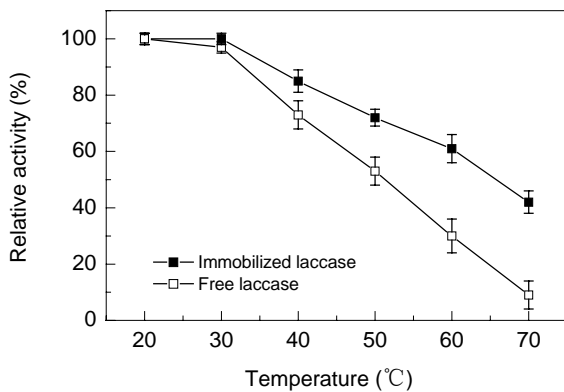


图 13 温度对游离漆酶和固定化漆酶酶活的影响
Fig.13 Effect of temperature on the activity of free and immobilized laccase

3.3.3 热稳定性

为了考察固定化漆酶的热稳定性, 将固定化漆酶和游离漆酶置于 60℃ 的水浴中, 每隔 30 min 各取一定量测定其活力, 结果见图 14. 固定化漆酶的活力比游离漆酶降低慢, 到 4 h 时, 固定化漆酶的活力为 60.9%, 而游离漆酶仅为 20.5%. 表明固定化漆酶具有较好的热稳定性. 这是因为固定化后酶分子之间及酶与载体分子之间的相互作用使酶分子结构刚性增强, 因而抗热变性能力增加, 游离酶由于缺乏这些作用力, 较容易因为去折叠而变性.

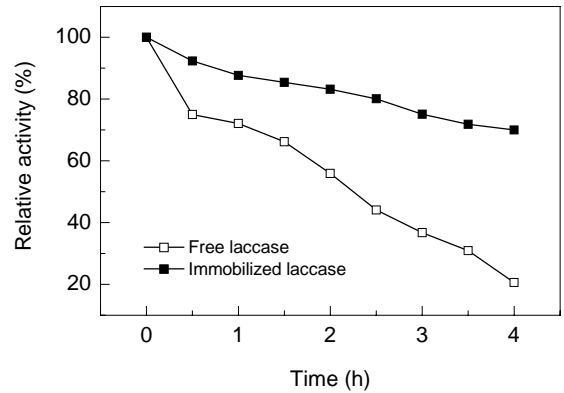


图 14 游离漆酶和固定化漆酶的热稳定性
Fig.14 Thermal stability of free and immobilized laccase

3.3.4 操作稳定性

与游离酶相比, 固定化酶能够从反应体系中分离出来并能反复使用. 固定化酶的重复使用次数和酶活保持率在很大程度上决定着固定化酶的工业应用前景. 从图 15 可以看到, 固定化漆酶在重复使用 10 次后, 酶活还能保持在初始酶活的 55%. 表明固定化漆酶具有较好的操作稳定性. 这归因于固定化后酶分子与固定化载体之间的结合使固定化漆酶抵抗失活的能力增强.

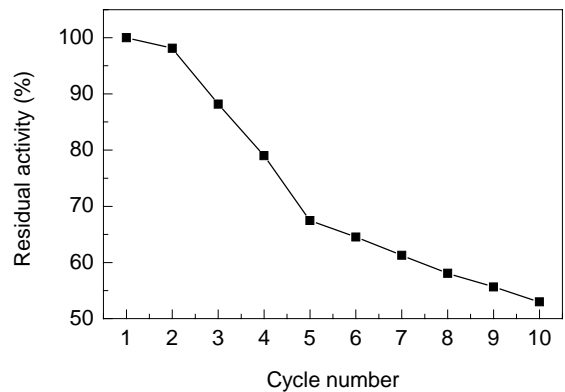


图 15 固定化漆酶的操作稳定性
Fig.15 Reuse of immobilized laccase

4 结论

以共沉淀法制备的 Fe_3O_4 纳米颗粒为核, 通过改进的溶胶-凝胶法制备出分散性较好的磁性 SiO_2 纳米粒子, 将其氨基修饰后作为固定化载体, 通过交联剂戊二醛固定化漆酶, 最佳固定化条件为戊二醛浓度 8% (ω)、固定化时间 6 h、缓冲液 pH 值 7.0、初始酶液浓度 0.15 g/L。在此条件下固定化漆酶与游离漆酶相比, 虽然与底物的亲和力有所减弱, 但其温度适应性、pH 值稳定性和热稳定性均有所增强, 并具有较好的操作稳定性。

参考文献:

- [1] Baldrian P. Fungal Laccases-occurrence and Properties [J]. FEMS Microbiol. Rev., 2006, 30(2): 215–242.
- [2] Hirai H, Nakanishi S, Nishida T. Oxidative Dechlorination of Methoxychlor by Ligninolytic Enzymes from White-rot Fungi [J]. Chemosphere, 2004, 55(4): 641–645.
- [3] Hublik G, Schinner F. Characterization and Immobilization of the Laccase from *Pleurotus ostreatus* and Its Use for the Continuous Elimination of Phenolic Pollutants [J]. Enzyme Microb. Technol., 2000, 27(3/5): 330–336.
- [4] Dias A A, Bezerra R M, Pereira A N. Activity and Elution Profile of Laccase during Biological Decolorization and Dephenolization of Olive Mill Wastewater [J]. Bioresour. Technol., 2004, 92(1): 7–13.
- [5] Peralta-Zamora P, Pereira C M, Tiburtius E R L, et al. Decolorization of Reactive Dyes by Immobilized Laccase [J]. Appl. Catal. B: Environ., 2003, 42(2): 131–144.
- [6] Hu X, Zhao X, Hwang H-M. Comparative Study of Immobilized *Trametes versicolor* Laccase on Nanoparticles and Kaolinite [J]. Chemosphere, 2007, 66(9): 1618–1626.
- [7] Vianello F, Ragusa S, Cambria M T, et al. A High Sensitivity Amperometric Biosensor Using Laccase as Biorecognition Element [J]. Biosens. Bioelectron., 2006, 21(11): 2155–2160.
- [8] Khani Z, Jolival C, Cretin M, et al. Alginate/Carbon Composite Beads for Laccase and Glucose Oxidase Encapsulation: Application in Biofuel Cell Technology [J]. Biotechnol. Lett., 2006, 28(22): 1779–1786.
- [9] Marzorati M, Danieli B, Haltrich D, et al. Selective Laccase-mediated Oxidation of Sugars Derivatives [J]. Green Chem., 2005, 7(5): 310–315.
- [10] Rogalski J, Dawidowicz A, Jozwik E, et al. Immobilization of Laccase from *Cerrena unicolor* on Controlled Porosity Glass [J]. J. Mol. Catal. B: Enzym., 1999, 6(1/2): 29–39.
- [11] Delanoy G, Li Q, Yu J. Activity and Stability of Laccase in Conjugation with Chitosan [J]. Int. J. Biol. Macromol., 2005, 35(1/2): 89–95.
- [12] Yang W Y, Min D Y, Wen S X, et al. Immobilization and Characterization of Laccase from Chinese *Rhus vernicifera* on Modified Chitosan [J]. Process Biochem., 2006, 41(6): 1378–1382.
- [13] Jiang D S, Long S Y, Huang J, et al. Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* Laccase on Magnetic Chitosan Microspheres [J]. Biochem. Eng. J., 2005, 25(1): 15–23.
- [14] Brandi P, D'Annibale A, Galli C, et al. In Search for Practical Advantages from the Immobilisation of an Enzyme: The Case of Laccase [J]. J. Mol. Catal. B: Enzym., 2006, 41(1/2): 61–69.
- [15] Turner M B, Spear S K, Holbrey J D, et al. Ionic Liquid-reconstituted Cellulose Composites as Solid Support Matrices for Biocatalyst Immobilization [J]. Biomacromolecules, 2005, 6(5): 2497–2502.
- [16] Xiao H Y, Huang J, Liu C, et al. Immobilization of Laccase on Amine-terminated Magnetic Nano-composite by Glutaraldehyde Crosslinking Method [J]. Trans. Nonferrous Met. Soc. China, 2006, 16: 414–418.
- [17] Zhu Y, Kaskel S, Shi J, et al. Immobilization of *Trametes versicolor* Laccase on Magnetically Separable Mesoporous Silica Spheres [J]. Chem. Mater., 2007, 19: 6408–6413.
- [18] Pich A, Bhattacharya S, Adler H J P, et al. Composite Magnetic Particles as Carriers for Laccase from *Trametes versicolor* [J]. Macromol. Biosci., 2006, 6(4): 301–310.
- [19] Wang F, Guo C, Liu H Z, et al. Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* Laccase by Metal Affinity Adsorption on Magnetic Chelator Particles [J]. J. Chem. Technol. Biotechnol., 2008, 83: 97–104.
- [20] Bradford M M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding [J]. Anal. Biochem., 1976, 72(1/2): 248–254.
- [21] Liu Z L, Wang H B, Lu Q H, et al. Synthesis and Characterization of Ultrafine Well-dispersed Magnetic Nanoparticles [J]. J. Magn. Magn. Mater., 2004, 283(2/3): 258–262.

Preparation of Magnetic Silica Nanoparticles and Their Application in Laccase Immobilization

LIU Yu^{1,3}, GUO Chen¹, WANG Feng^{2,3}, LIU Chun-zhao², LIU Hui-zhou¹

(1. Key Lab. Green Process & Eng., Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China;

2. State Key Lab. Biochem. Eng., Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China;

3. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Laccase was immobilized on the silanized magnetic silica nanoparticles by using glutaraldehyde as the cross-linker. Immobilization of laccase was investigated and its immobilizing conditions were optimized. The results were achieved with the concentration of 8% glutaraldehyde, immobilizing time of 6 h, the buffer of pH 7.0 and initial laccase concentration of 0.15 g/L. The optimum pH and temperature of immobilized laccase were 4.0 and 20 °C, respectively. After the immobilized enzyme was kept at 60 °C for 4 h, it remained 60.9% of its initial activity. The immobilized laccase could retain above 55% of activity after 10 consecutive operations. The experimental results showed that the thermal stability and operational stability of immobilized laccase were improved in comparison with free laccase.

Key words: magnetic silica; nanoparticle; laccase; immobilization