

氨基功能化大孔 SiO₂ 固定化漆酶

张育淇^{1,2}, 刘晓贞^{1,2}, 李 云^{1,2}, 梁云霄^{1,2*}

(1. 宁波大学 材料科学与化学工程学院, 浙江 宁波 315211;

2. 新型功能材料及其制备科学国家重点实验室培育基地, 浙江 宁波 315211)

摘要: 在溶剂热条件下, 采用后嫁接法对新型大尺寸 SiO₂ 大孔材料进行氨基化改性, 以氨基修饰的 SiO₂ 大孔材料为载体, 借助交联剂戊二醛(GA)使诺维信工业漆酶固定化. 研究表明: 在 GA 质量分数为 3%, pH 值为 5, 漆酶质量浓度为 30 mg·mL⁻¹ 条件下固定化 4 h 制备得到的固定化漆酶最优, 活力达到 111.4 U·g⁻¹; 比较固定化漆酶和游离漆酶的性质发现, 固定化漆酶 pH 稳定性和热稳定性均优于游离漆酶, 固定化漆酶重复使用性好, 与底物反复操作 10 次后, 相对活性仍保持 70.8%.

关键词: 大孔 SiO₂; 固定化; 漆酶; 氨基化修饰

中图分类号: Q814.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2015) 02-0108-06

漆酶属于铜蓝氧化酶, 其中铜原子位于漆酶活性中心, 一般含 4 个铜离子, 在催化底物时起决定性作用. 漆酶可以利用铜离子的特有氧化还原能力氧化芳香族化合物和酚类化合物^[1]. 漆酶主要分布于菇、菌及高等植物^[2]. 因其具有底物范围广、环境友好、催化性能效率高、条件温和等优点, 在环境保护、生物漂白、生物传感器构建、食品医药和能源化工等领域具有重要的应用前景^[3-7]. 但是, 游离漆酶对 pH、温度等外界因素变化较敏感, 易失活甚至变性. 另外, 漆酶易溶于水, 难于回收再利用而且容易混入产品, 这些缺陷使漆酶的应用受到限制^[8]. 因此, 通过物理或化学方法固定化漆酶是提高漆酶稳定性, 实现漆酶重复利用, 降低成本的有效手段^[9-13]. 近年来, 国际上固定化酶常用载体有多孔玻璃、壳聚糖、介孔分子筛、活性炭、多孔硅土、磁性介孔 SiO₂ 等多种材料^[14-18].

在固定化酶过程中, 以多孔材料为载体, 孔径大小至关重要. 酶属于生物大分子, 如果载体孔径过小, 不但会阻碍固定化过程中酶在载体内部的扩散, 而且也会影响固定化酶催化底物时底物与酶之间的传质. 如以 MCM-41、SBA-15 这些孔

径较大的介孔材料作为载体固定化酶时, 其介孔孔道仍然不可避免地被堵塞, 这会使高负载量的目标难以达到, 并会导致物质在孔内传质受阻^[19-20]. 用大孔材料作为载体原则上可以解决以上问题, 但这方面的研究报道很少^[21].

张瑞平等制备的新型 SiO₂ 大孔材料由二氧化硅超薄膜构成, 在孔径为 300~500 nm 和 1~2 μm 有 2 套三维贯通的孔道, 比表面积可达 130 m²·g⁻¹、孔隙率 93%^[22-24]. 笔者用 γ-氨丙基三乙氧基硅烷在溶剂热条件下, 采用后嫁接法对该新型大尺寸 SiO₂ 大孔材料进行氨基化表面修饰, 以修饰后的 SiO₂ 大孔材料为载体, 借助有机交联剂戊二醛(GA)的作用, 使诺维信工业漆酶固定化; 并确定固定化条件(GA 质量分数、固定化时间、pH、漆酶质量浓度)以及研究对比固定化漆酶与游离漆酶的性质.

1 实验部分

1.1 氨基修饰大孔 SiO₂ 的制备

以环氧树脂大孔聚合物为整体型模板, 通过表面复制模板技术制备具有三维超薄结构 SiO₂ 大孔材料^[24], 并将该大孔材料(长 10 cm、宽 3 cm、厚

收稿日期: 2014-01-06.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省自然科学基金(LY12B01004); 宁波市社会发展项目(2011C50052); 宁波大学王宽诚幸福基金.

第一作者: 张育淇(1987—), 男, 广西北流人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 无机功能材料. E-mail: jacketzhangyq@hotmail.com

*通信作者: 梁云霄(1965—), 男, 黑龙江齐齐哈尔人, 教授, 主要研究方向: 无机功能材料. E-mail: liangyunxiao@nbu.edu.cn

0.3 cm)切割成长和宽分别为 0.3~0.4 cm 的块状材料, 备用。

在水热反应釜聚四氟乙烯内衬中加入 2 mL KH550, 然后加入无水乙醇使其填充度达到 80%。称取 0.6 g 干燥的块状 SiO₂ 置于其中, 拧紧釜盖并在 120 °C 下反应 24 h, 自然冷却至室温后, 滤出大孔材料, 先后用无水乙醇、去离子水各清洗 3 遍, 低温干燥后得到氨基修饰的大孔材料, 以 H₂N-SiO₂ 来表示。

1.2 载体活化

在 100 mL 锥形瓶中加入一定量 H₂N-SiO₂ 和一定质量分数的 GA 溶液 10 mL, 置于转速为 100 r·min⁻¹ 摇床中, 并于 25 °C 温度下反应 12 h。产物经去离子水反复冲洗, 25 °C 干燥得表面醛基修饰的 SiO₂ 大孔载体。

1.3 漆酶的固定化

取 0.1 g 醛基化的大孔 SiO₂ 置于 10 mL 用磷酸盐缓冲溶液配置的漆酶溶液中, 在 25 °C、转速为 100 r·min⁻¹ 的摇床中振荡一定时间, 将大孔材料用 8~10 目的筛网滤出后, 用缓冲液反复冲洗, 直至上清液中检测不到酶活, 于 4 °C 温度下真空干燥即得固定化漆酶。其中, 漆酶固载量用 Bradford 法^[25]测定。

1.4 漆酶性质的测定

一个酶活单位定义为 1 min 使 1 μmol 的 ABTS 氧化所需的酶量。其中, 漆酶的活性可以 ABTS 作底物, 用紫外-可见分光光度法进行测定。测定方法按文献^[26], 即取一定量漆酶, 加入 2 mL 相应 pH 的磷酸盐缓冲液和 3 mL, 1 mmol·L⁻¹ ABTS 启动反应, 并使用 T6 新世纪紫外-可见分光光度计测定反应体系在 420 nm 处 3 min 内的吸光度值变化。(1)式和(2)式分别为漆酶酶活和固定化漆酶的酶活回收率计算公式:

漆酶活力/(U·g⁻¹)=

$$(\Delta A \times V_{\text{总}} \times 10^6) / (\Delta t \times m \times \varepsilon), \quad (1)$$

$$\text{酶活回收率}/\% = A_1/A_2 \times 100\%, \quad (2)$$

其中: Δt 为反应时间, min; ΔA 为 Δt 内溶液在 420 nm 的吸光度变化; $V_{\text{总}}$ 为反应体系体积, mL; ε 为 ABTS 在 420 nm 处的摩尔消光系数 (36 000 L·mol⁻¹·cm⁻¹); m 为初始漆酶的质量, g; A_1 为固定化漆酶的酶活, U·g⁻¹; A_2 为与固定化漆酶等量的自由

漆酶的酶活, U·g⁻¹。

2 结果与讨论

2.1 改性载体的表征

氨基修饰前后的 SiO₂ 大孔材料的红外光谱如图 1 所示。图 1 中 a 线在 3 427 cm⁻¹ 出现强而宽的峰为大孔 SiO₂ 表面硅羟基的吸收峰, 1 635 cm⁻¹ 处出现的微弱峰为大孔 SiO₂ 的自由吸附水 H-OH 弯曲伸缩振动峰, 1 099 cm⁻¹ 处为 Si-O-Si 的反对称伸缩振动, 805 cm⁻¹ 和 470 cm⁻¹ 为 Si-O 的对称伸缩振动。SiO₂ 大孔材料经氨基功能化修饰后, 2 937 cm⁻¹ 附近出现较弱的峰为亚甲基的吸收峰, 在 1 640 cm⁻¹ 处的尖峰为氨基的特征吸收峰。702 cm⁻¹ 处的吸收峰强度较弱, 为 N-H 的弯曲振动吸收峰。此外, 在 3 000~3 400 cm⁻¹ 之间还出现了氨基的对称和反对称伸缩振动吸收峰, 并与 SiO₂ 表面羟基的伸缩振动吸收峰发生重叠^[27]。以上结果表明氨基基团已经成功接枝到 SiO₂ 大孔材料表面。

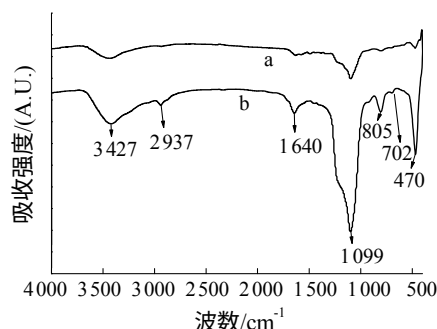


图1 氨基改性前后大孔 SiO₂ 红外谱

2.2 漆酶固定化条件的优化

2.2.1 固定化时间选择

在固定化过程中因载体为大孔材料, 孔径较大使得漆酶在固定化时扩散速度较快, 缩短了固定化过程^[28]。在反应时间为 1~4 h 阶段, 漆酶固载量随着固定化时间的增加而增加, 每克载体上的漆酶固定量从 0.4 mg 提升到 3.0 mg, 直到固定化时间为 4 h 时, 固载量达到最大。继续延长固定化时间, 固载量变化很小。因此, 固定化时间选择 4 h。

2.2.2 GA 质量分数对漆酶固定化的影响

当 GA 质量分数为 3% 时, 固定化效果最佳(图 2)。氨基化之后的大孔材料容易与交联剂 GA 发生 Schiff 反应, 从而使漆酶牢固地结合在大孔二氧化硅上^[29]。但当 GA 质量分数超过 3% 时, 由于 GA 质量

分数过高, 过量的戊二醛容易发生羟醛缩合, 导致孔壁表面被一层戊二醛低聚物所覆盖使孔壁表面结构受到影响, 漆酶固定化因此受到阻碍。同时载体上多余的醛基容易与酶分子固定数量的氨基发生多点结合, 导致漆酶构象发生变化, 从而使固定化漆酶活性下降。

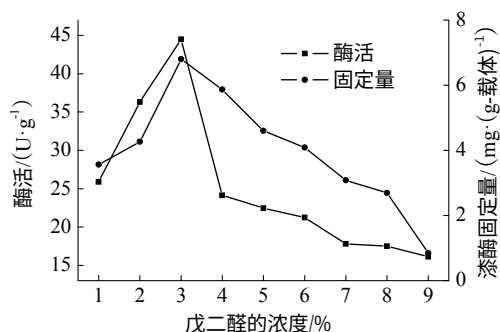


图2 GA质量分数与载体吸附量及固定化漆酶活性的关系

2.2.3 pH对漆酶固定化的影响

在固定化过程中, 缓冲体系的 pH 值会改变酶分子和孔壁表面的离子化状态, 从而使载体与酶的结合程度受到影响, 最终导致在不同 pH 值下固定化漆酶活力有所不同。图 3 给出了 pH 值对漆酶固定化的影响, 在 pH 值 2~4 间, 随着 pH 值的增加, 固定化漆酶酶活急速上升, pH 4~5 之间变得平缓, 酶活在 pH 为 5 时达到最大, pH 超过 6 后, 酶的微观结构发生变化, 导致酶活急速下降。

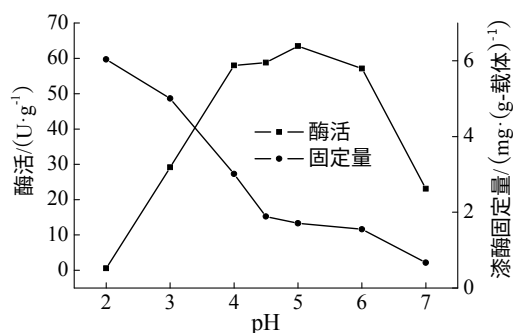


图3 pH值与载体吸附量及固定化漆酶活性的关系

2.2.4 漆酶质量浓度对漆酶固定化的影响

在 pH 为 5 的缓冲溶液中, 用不同质量浓度 ($10 \sim 55 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的漆酶溶液浸泡醛基化之后的载体, 并于摇床上固定化 4 h。漆酶质量浓度对载体吸附量和固定化漆酶活性的影响如图 4 所示。反应初始阶段, 固定化漆酶的酶活随着漆酶质量浓度的增加而提高, 当漆酶质量浓度增大到 $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

时, 固定化漆酶活力达到最大值, 若继续增大漆酶质量浓度, 反而会使固定化漆酶活力下降, 但是固载量始终保持上升趋势。这是因为载体的负荷能力是一定的, 结合位点未饱和前, 漆酶质量浓度的增加导致固定化漆酶的活性增大, 但是结合位点饱和之后, 固定化漆酶的活性不再随着漆酶质量浓度的增加而增大。这是因为酶分子相互聚集导致漆酶的活性中心相互遮盖, 从而使酶的活性下降。所以氨基化载体经过质量分数为 3% 的戊二醛活化后, 在 pH 为 5 的缓冲溶液中漆酶质量浓度为 $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时固定化 4 h, 效果最佳, 总活力达到 $111.4 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

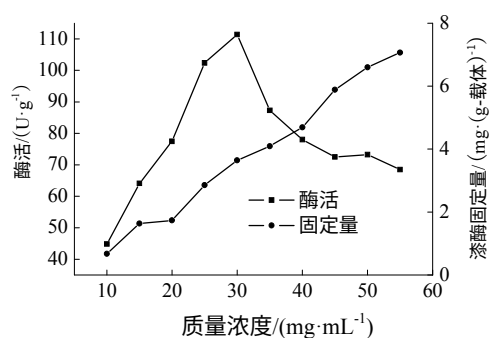


图4 漆酶质量浓度与载体吸附量及固定化漆酶活性关系

2.3 固定化漆酶的性质

2.3.1 固定化漆酶的最适 pH 及 pH 稳定性

在不同 pH 值下, 测定 pH 值对游离漆酶和固定化漆酶的活性影响, 结果表明, 游离漆酶和固定化漆酶的最适 pH 值分别为 5.0 和 4.5, 最适 pH 的变化可能是因为漆酶固定化时所使用的的方法或受固定化漆酶微环境带电性质的影响。在不同 pH 值的介质中保温 2 h, 游离漆酶与固定化漆酶的酸碱稳定性如图 5 所示。

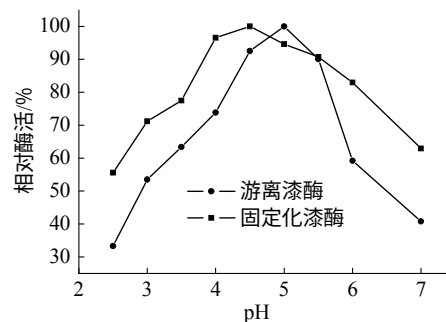


图5 游离漆酶和固定化漆酶的 pH 稳定性

固定化漆酶在 pH 4~6 之间稳定, 相对活性保

持在 80% 以上; 而游离漆酶在 pH 4.5~5.5 之间稳定, pH 低于 4 或者高于 6, 相对活性都在 70% 以下, 说明随着 pH 的变化, 相比自由漆酶, 固定化漆酶的适用范围更广。这是由于漆酶的空间结构因漆酶被固定化而发生改变^[29-30], 漆酶表面的电化学特性或反应中心受到反应体系中酸碱影响而使固定化漆酶更加稳定^[31]。

2.3.2 固定化漆酶的最适温度及热稳定性

测定不同温度对游离漆酶和固定化漆酶活性的影响。结果表明, 固定化漆酶和游离漆酶的活性先随温度的升高而升高, 温度为 50 °C 时相对活性达到最大, 超过 50 °C 时, 活性开始下降, 而且温度超过 60 °C 后, 游离漆酶活性急速下降, 这是因为游离漆酶在温度较高时不稳定^[32], 与文献^[33]报道相似。探索固定化漆酶的热稳定性对其潜在的实用价值具有重要意义。图 6 对比了温度范围在 30~70 °C 时游离漆酶与固定化漆酶的热稳定性。相比游离漆酶, 固定化漆酶的适宜范围变宽, 热稳定性明显提高。温度范围在 30~60 °C 时, 固定化漆酶的相对活性仍然保持在 77.8% 以上。在温度为 70 °C 下保温 2 h 后测定两者的剩余活性, 固定化漆酶的剩余活性为 57.6%, 而游离漆酶剩余活性却降到了 25.4%。说明漆酶固定化可以减少高温对漆酶构象的严重破坏并减少漆酶失活的可能性^[34-36], 极大地提高了固定化漆酶的实用价值。

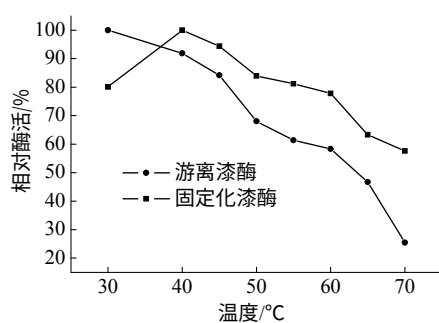


图 6 游离漆酶和固定化漆酶的热稳定性

2.3.3 固定化漆酶的操作稳定性

固定化酶的操作稳定性是衡量是否可以大规模生产应用的一个标准, 可通过使用同一固定化漆酶反复氧化 ABTS 来测定, 如图 7 所示。从图 7 可知, 最初使用过程中, 因某些漆酶与载体结合不牢固导致被洗脱^[37], 从而引起固定化漆酶活性下降比较快。催化 ABTS 反应 7 次以后剩余活性差别

不大, 而反应 10 批次以后剩余酶活为 70.8%, 这比许多文献报道的固定化漆酶的操作稳定性都高, 如刘宇等^[11]、王炎等^[18]分别利用磁性纳米 SiO₂ 和介孔分子筛 MCM-41 为载体固定化漆酶, 重复 10 次以后, 固定化漆酶剩余酶活分别只有 55% 和 40%。这说明本实验所制备的固定化漆酶具有较好的操作稳定性, 可以重复使用。

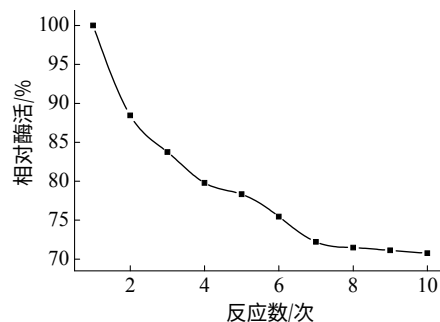


图 7 固定化漆酶的操作稳定性

2.3.4 米氏常数

以 ABTS 为底物, 分别测定固定化漆酶和游离漆酶在 420 nm 处吸光度变化, 时间为 3 min, 并计算酶反应的初速度 v 。然后以 $1/v$ 为纵坐标, 以底物质量浓度的倒数 $1/c$ 作为横坐标, 由 Lineweaver-Burk 双倒数法处理, 结果如图 8 所示。

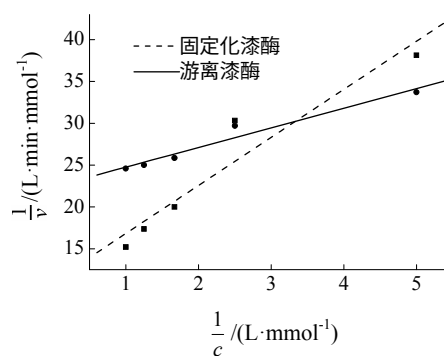


图 8 游离漆酶和固定化漆酶的动力学常数

根据图 8 结果可以求得固定化漆酶与游离漆酶对 ABTS 的 K_m 值分别为 $0.518 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.105 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。米氏常数增大说明固定化漆酶与 ABTS 之间的亲和力下降, 这可能是由于漆酶固定化后扩散受到限制, 从而导致固定化漆酶的表现米氏常数较自由漆酶高。

3 结论

利用 KH550 对大尺寸 SiO₂ 大孔材料进行氨基

化改性,并用GA活化,以得到改性材料固定化漆酶。研究表明,在室温下活化剂GA质量分数为3%、pH值为5,漆酶质量浓度为 $30\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、固定化时间为4h时,固定化酶活力达到 $111.4\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$,效果最佳。通过游离漆酶和固定化漆酶的性质对比,发现漆酶固定化后, K_m 值从 $0.105\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 增至 $0.518\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,亲和力虽然有所下降,但是pH稳定性、温度稳定性均比游离漆酶有了明显提高。与ABTS反复操作10次,固定化漆酶相对活性仍保持70.8%,说明漆酶固定化后具有良好的操作稳定性,重复性好。因此,大孔 SiO_2 可作为漆酶固定化的优良载体材料。

参考文献:

- [1] Solomon E I, Sundaram U M, Machonkin T E. Multicopper oxidases and oxygenases[J]. Chemical Reviews, 1996, 96(7):2563-2606.
- [2] Baldrian P. Fungal laccases-occurrence and properties[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2006, 30(2):215-242.
- [3] Hu X, Zhao X, Hwang H. Comparative study of immobilized *Trametes versicolor* laccase on nanoparticles and kaolinite[J]. Chemosphere, 2007, 66(9):1618-1626.
- [4] Vianello F, Ragusa S, Cambria M T, et al. A high sensitivity amperometric biosensor using laccase as biorecognition element[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2006, 21(11):2155-2160.
- [5] Khani Z, Jolival C, Cretin M, et al. Alginate/carbon composite beads for laccase and glucose oxidase encapsulation: Application in biofuel cell technology[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(22):1779-1786.
- [6] Marzorati M, Danieli B, Haltrich D, et al. Selective laccase-mediated oxidation of sugars derivatives[J]. Green Chemistry, 2005, 7(5):310-315.
- [7] 李阳, 蒋国翔, 牛军峰, 等. 漆酶催化氧化水中有机污染物[J]. 化学进展, 2009, 21(10):2028-2036.
- [8] Shinya Y, Aye H N, Hong K J, et al. Efficacy of amphiphile-modified laccase in enzymatic oxidation and removal of phenolics in aqueous solution[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2005, 36(1):147-152.
- [9] Palonen H, Saloheimo M, Viikari L, et al. Purification, characterization and sequence analysis of a laccase from the ascomycete *Mauginiella* sp.[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33(6):854-862.
- [10] 魏冬雪, 王红霞, 徐露露. 漆酶的固定化及其应用前景[J]. 黑龙江科技信息, 2010, 4:27.
- [11] 刘宇, 郭晨, 王锋, 等. 磁性 SiO_2 纳米粒子的制备及其用于漆酶固定化[J]. 过程工程学报, 2008, 8(3):583-588.
- [12] 吕勇军, 李佩晋, 郭杨龙, 等. 酶在有序介孔材料上的固定化[J]. 化学进展, 2008, 20(7):1172-1179.
- [13] Bornscheuer U T. Immobilizing enzymes: How to create more suitable biocatalysts[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2003, 42(29):3336-3337.
- [14] Park C B, Clark D S. Sol-gel encapsulated enzyme arrays for high-throughput screening of biocatalytic activity[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2002, 78(2):229-235.
- [15] Rogalski J, Dawidowicz A, Jóźwik E, et al. Immobilization of laccase from *Cerrena unicolor* on controlled porosity glass[J]. Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic, 1999, 6(1):29-39.
- [16] DeLouise L A, Miller B L. Quantitative assessment of enzyme immobilization capacity in porous silicon[J]. Analytical Chemistry, 2004, 76(23):6915-6920.
- [17] 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.
- [18] 王炎, 郑旭翰, 赵敏. 漆酶在介孔分子筛MCM-41上的固定化研究[J]. 高校化学工程学报, 2008, 22(1):83-87.
- [19] Pandya P H, Jasra R V, Newalkar B L, et al. Studies on the activity and stability of immobilized α -amylase in ordered mesoporous silicas[J]. Microporous and Mesoporous Materials, 2005, 77(1):67-77.
- [20] Kang Y, He J, Guo X, et al. Influence of pore diameters on the immobilization of lipase in SBA-15[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2007, 46(13):4474-4479.
- [21] 蔡宏举, 王满意, 周鑫, 等. 大孔载体制备及其固定化脂肪酶[J]. 化工学报, 2007, 58(6):1529-1534.
- [22] 龙能兵, 张瑞丰. 大尺寸 $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$ 大孔材料的制备及光降解性能[J]. 无机化学学报, 2009, 25(7):1153-1158.
- [23] 李文丽, 张瑞丰, 王文钦, 等. 大孔 SiO_2/ATO 电极的制备及其电化学性能研究[J]. 无机化学学报, 2010, 26(8):1382-1388.
- [24] Zhang R, Long N, Zhang L. Preparation of 3-dimensional SiO_2 structures via a templating method[J]. Thin Solid Films, 2009, 517(24):6677-6680.
- [25] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1):248-254.

- [26] 张群, 张育淇, 刘晓贞, 等. 大尺寸 SiO₂ 大孔材料固定化漆酶[J]. 无机化学学报, 2013, 29(10):2065-2070.
- [27] 袁金芳, 李健生, 顾娟, 等. 氨基功能化短孔道有序介孔材料 H₂N-Zr-Ce-SBA-15 的合成及吸附性能[J]. 物理化学学报, 2010, 26(6):1711-1716.
- [28] 蔡宏举, 付大雁, 王满意, 等. 大孔载体固定化脂肪酶[J]. 过程工程学报, 2007, 7(4):773-777.
- [29] 张剑波, 杨宇翔, 田美娟, 等. 蠕虫状孔道介孔 SiO₂ 的合成及其固定化漆酶的活性[J]. 化学学报, 2013, 71(4):602-612.
- [30] 陈玉玲, 陈奇, 叶蕊芳, 等. 明胶改性双孔块状 SiO₂ 载体材料及其酶活力[J]. 化学世界, 2011, 52(2):65-68.
- [31] Palmieri G, Giardina P, Sannia G. Laccase-mediated remazol brilliant blue R decolorization in a fixed-bed bioreactor[J]. Biotechnology Progress, 2005, 21(5):1436-1441.
- [32] 张树江, 高恩丽, 夏黎明. 固定化漆酶对二氯酚的脱氯作用[J]. 化工学报, 2006, 57(2):359-362.
- [33] 纳薇. 介孔有机氧化硅材料的合成、改性及酶固定化[D]. 北京: 北京工业大学, 2010.
- [34] Wang P, Fan X, Cui L, et al. Decolorization of reactive dyes by laccase immobilized in alginate/gelatin blend with PEG[J]. Journal of Environmental Sciences, 2008, 20(12):1519-1522.
- [35] Cristóvão R O, Tavares A P M, Brígida A I, et al. Immobilization of commercial laccase onto green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2011, 72(1):6-12.
- [36] Wang F, Guo C, Liu H Z, et al. Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase by metal affinity adsorption on magnetic chelator particles[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2008, 83(1):97-104.
- [37] 吴东亮, 赵巧玲, 郭杨龙, 等. 含环氧基团的聚合物载体合成方法的改进及其固定化青霉素酰化酶[J]. 催化学报, 2010, 31(5):580-590.

Immobilization of Laccase on Amino-functionalized Macroporous Silica

ZHANG Yu-qi^{1,2}, LIU Xiao-zhen^{1,2}, LI Yun^{1,2}, LIANG Yun-xiao^{1,2*}

(1. Faculty of Materials Science and Chemical Engineering, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. State Key Laboratory Base of Novel Functional Materials and Preparation Science, Ningbo 315211, China)

Abstract: A novel large-sized macroporous silica material is amino-modified via post-grafting method under solvothermal conditions. The amino-functionalized macroporous silica is employed as the supports for immobilization of the commercial Novozymes laccase by using glutaraldehyde (GA) as the crosslinking agent. The results show that at the concentration of 3% glutaraldehyde, immobilizing time of 4 h, the buffer of pH 5.0 and the initial laccase concentration of 30 mg·mL⁻¹, the activity of immobilized laccase reaches up to 111.4 U·g⁻¹. Compared with the free counterpart, it is found that the pH and thermal stabilities of the immobilized laccase are improving significantly, and the immobilized laccase retains 70.8% of its initial activity after ten repetitive times of catalytic reaction, indicating that the immobilized laccase has a good reusability.

Key words: macroporous silica; immobilization; laccase; amino-modified

(责任编辑 史小丽)