

مطالعه ایزوترم‌های جذب لاکاز توسط مونتموریلونیت K10 و زئولیت

حدیثه رحمانی^۱ - امیر لکزیان^{۲*} - علیرضا کریمی^۳ - اکرم حلاج نیا^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۱۲

چکیده

لاکازها آنزیم‌هایی توانمند در اکسید کردن ترکیبات فنولی و غیر فنولی مختلف و همچنین آلاینده‌های محیطی بسیار مقاوم هستند. یکی از مؤثرترین روش‌ها برای بهبود ویژگی‌های آنها نظیر بالا بردن پایداری این آنزیم‌ها و حتی افزایش فعالیت آنها، تثبیت لاکازها بر حامل‌های مختلف از جمله کانی‌ها است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی ویژگی‌های جذب آنزیم لاکاز استخراج شده از قارچ ترامتس ورسیکالر (*T. versicolor*) توسط کانی‌های مونتموریلونیت K10 و زئولیت در قالب ایزوترم‌های جذبی لانگمویر، فروندلیچ، تمکین و دوبینین - رادوشکوویچ بود. بر اساس نتایج این مطالعه، جذب لاکاز بر مونتموریلونیت بالاترین تطابق را نخست با مدل دوبینین - رادوشکوویچ و سپس با مدل ایزوترم جذبی لانگمویر نشان داد. بر این اساس، جذب لاکاز توسط مونتموریلونیت احتمالاً فیزیکی بود و توزیع همگنی از جایگاه‌های فعال در سطح این کانی وجود داشت. از طرفی، جذب لاکاز توسط زئولیت بهترین انطباق را با مدل فروندلیچ نشان داد که این امر بر احتمال جذب چند لایه‌ای آنزیم توسط سطوح ناهمگن و نیز شرایط جذب مطلوب دلالت دارد. همچنین، بر اساس مقادیر پارامتر تعادل (RL)، گرچه جذب برای هر دو کانی مورد مطالعه مطلوب بود، اما این مطلوب بودن در غلظت‌های اولیه بالای لاکاز بیشتر بود. بطور کلی، جذب چند لایه‌ای لاکاز بر سطح زئولیت، احتمال درجه بالاتری از ممانعت فضایی و تغییرات در ساختار آنزیمی را قوت می‌بخشد و متعاقباً کاهش کارایی کاتالیزوری آنزیم نیز محتمل است. بنابراین بر اساس نتایج این مطالعه، مونتموریلونیت از شرایط مناسب‌تری برای استفاده به عنوان حامل آنزیم لاکاز برخوردار است. اگرچه، مطالعات تکمیلی مانند آزمایشات سینتیکی برای تصمیم‌گیری‌های نهایی کمک کننده خواهند بود.

واژه‌های کلیدی: ایزوترم، تثبیت، زئولیت، لاکاز، مونتموریلونیت

مقدمه

کاتالیزور به یک حامل جامد که در مخلوط واکنش نامحلول است، متصل می‌شود (۱۵). در این فرآیند، حرکت آنزیم در فضا به شدت محدود شده و در عین حال، فعالیت کاتالیزوری آن همچنان حفظ می‌شود (۲۰). از جمله مزایای آنزیم‌های غیرمتحرک شده در مقایسه با شکل‌های محلول آنها می‌توان به افزایش پایداری آنزیم، کاهش هزینه‌های آنزیمی، سهولت بیشتر جداسازی و بازیافت آنزیم برای استفاده مجدد، امکان کار به طور مداوم، جداسازی آسان محصولات و در برخی موارد، افزایش فعالیت آنزیم اشاره کرد (۲۰).

تکنیک‌های غیرمتحرک‌سازی مختلفی شامل جذب، اتصال کووالانسی، به تله افتادن، کپسوله شدن و اتصال عرضی وجود دارند (۲۳). این روش‌ها در نوع و ویژگی برهمکنش‌های شکل گرفته و در شکل و نوع مواد حامل مورد استفاده، متفاوت هستند (۳۱). گستره وسیعی از مواد با منشأهای مختلف می‌توانند به عنوان حامل برای تثبیت آنزیم مورد استفاده قرار گیرند. این مواد به طور کلی می‌توانند به صورت آلی، معدنی و هیبرید یا کامپوزیت تقسیم‌بندی شوند (۳۱). انتخاب حامل برای داشتن یک سیستم آنزیمی تثبیت شده خوب، بسیار مهم است. از جمله ویژگی‌های مطلوب یک حامل آنزیمی می

آنزیم‌ها کاتالیزورهایی با کارایی و اثرگذاری بالا بر گستره وسیعی از فرآیندها هستند که می‌توانند تعداد مراحل واکنش و نیز تعداد حلال‌های خطرناک مورد نیاز را کاهش داده و بنابراین فرآیندی ارزاتر و در عین حال سازگار با محیط زیست را فراهم آورند (۳). بنابراین آنزیم‌ها تبدیل به کاتالیزورهای فوق العاده مهمی شده‌اند که پتانسیل بالایی جهت کاربرد در صنایع مختلف، از صنایع غذایی گرفته تا دارویی را دارا می‌باشند (۲۹). استفاده از آنزیم‌ها در فرآیندهای کاتالیزوری چندتایی منجر به انجام مطالعاتی شده است که بهبود قابل توجه خصوصیات آنزیم را به دنبال داشته‌اند (۳۱). در این بین، یکی از مهمترین و پر استفاده‌ترین تکنیک‌ها، تثبیت آنزیم است که در آن

۱، ۲، ۳ و ۴ - به ترتیب دانشجوی دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، استناد، دانشیار و استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(Email: lakzian@um.ac.ir)
* نویسنده مسئول:

پایداری ظاهری آن و عدم بازدارندگی (مانند آنچه که با H_2O_2 برای پراکسیداز مشاهده شده است)، این آنزیم را برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی مناسب و نیز جذاب ساخته است (۱۸). تأثیر لاکازهای غیرمتحرک شده بر حذف فنل در فاضلاب‌های مصنوعی و صنعتی اثبات شده است (۱۸).

بنابراین هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی ویژگی‌های جذب و تثبیت آنزیم لاکاز استخراج شده از قارچ ترامتس ورسیکالر (*Trametes versicolor*) توسط کانی‌های مونتومریلونیت K10 و ژئولیت در قالب ایزوترم‌های جذبی لانگمویر، فروندلیچ، تمکین و دوینین - رادوشکویچ بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، ویژگی‌های جذب آنزیم لاکاز گرفته شده از قارچ ترامتس ورسیکالر (*Trametes versicolor*) بر کانی‌های مونتومریلونیت K10 و ژئولیت در قالب ایزوترم‌های جذبی تعیین و مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام مطالعه حاضر، آنزیم لاکاز خالص گرفته شده از *T. versicolor* EC. 1.10.3.2، با کارایی ویژه بیش از ۱۰U بر میلی‌گرم به صورت جامد و پودری، ۲ و ۲-آزینوبیس (۳-اتیل‌بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید) (ABTS^۲)، و کانی مونتومریلونیت K10 خالص (پودری) با سطح ویژه $270-220 m^2/g$ و ظرفیت تبادل کاتیونی (CEC)^۳ برابر با $100 g^{-1} meq 30$ ، از شرکت سازنده مواد شیمیایی سیگما آلدریج^۴ خریداری گردیدند. کانی ژئولیت نسبتاً خالص نیز از معدنی واقع در جنوب شرقی استان سمنان، از طریق شرکت کهربا در شهر تهران خریداری شد و سپس خرد و آسیاب گردید. همچنین، تصاویر SEM^۵ از هر دو کانی مونتومریلونیت و ژئولیت در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد.

تعیین خصوصیات ساختمانی کانی ژئولیت

ظرفیت تبادل کاتیونی ژئولیت مورد مطالعه به روش استات سدیم با $pH=8/2$ (۲) در آزمایشگاه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد تعیین گردید. همچنین سطح ویژه ژئولیت مورد مطالعه به کمک روش BET^۶- جذب N_2 و با استفاده از آنالیزر سطح ویژه و تخلخل TriStar II Plus (Micromeritics Instrument Corporations, Norcross, GA 30093, U.S.A) در آزمایشگاه تحقیقاتی نانو مواد معدنی پارک علم و فناوری تهران

توان به سطح ویژه بالا، پایداری شیمیایی، مکانیکی و دمایی، استحکام بالا، شکل و اندازه ذره‌های مناسب و مقاومت نسبت به حمله میکروبی اشاره کرد (۲۰). به طور کلی، حامل مورد استفاده باید ساختار آنزیم را در برابر شرایط واکنشی سخت حفاظت نماید و بنابراین به آنزیم تثبیت شده برای حفظ فعالیت کاتالیزوری بالای آن کمک نماید (۲۴). همچنین نباید اثر منفی بر ساختار آنزیم داشته باشد و نیز نباید بیشتر از آنچه که برای ایجاد برهمکنش‌های آنزیم ماتریکس پایدار مورد نیاز است، برای آنزیم مزاحمت ایجاد نماید (۳۱). بعلاوه، باید تمایلی بین گروه‌های عاملی دو ماده برای اجازه دادن به تشکیل این برهمکنش‌های آنزیم-ماتریکس و اتصال کارایی آنزیم به حامل وجود داشته باشد (۳۱). همچنین حامل باید جایگاه‌های فعال کاتالیزور را برای اتصال آسان مولکول‌های بستره و همچنین برای کاهش محدودیت‌های پخشیدگی بستره‌ها و محصولات، در معرض قرار دهد (۳۰).

یکی از حامل‌هایی که برای تشکیل سیستم‌های کاتالیزوری زیستی قابل بازیافت مورد استفاده قرار می‌گیرد، کانی‌ها هستند (۳۱). کانی‌ها حامل‌های معدنی هستند که در طبیعت فراوانند، به سهولت قابل دسترسی هستند، سازگاری زیستی بالایی دارند و می‌توانند به عنوان ماده‌ای بدون تیمار پیشرفته و خالص‌سازی متعاقب مورد استفاده قرار گیرند، که این امر آنها را مبدل به موادی نسبتاً ارزان می‌کند (۸). برای ایجاد اتصال کووالانسی بین آنزیم و یک حامل معدنی، یک عامل اتصال عرضی مانند گلو تارآلدئید مورد نیاز است (۳۱). گلو تارآلدئید ترکیبی بسیار عالی برای اتصال عرضی است که نه تنها سبب ماندگاری ترکیبات پروتئینی می‌شود، بلکه ساختار سلولی را نیز بدون تغییر شکل تثبیت می‌نماید و کمک می‌کند تا فعالیت آنزیمی به نحو قابل توجهی حفظ گردد (۱۰).

کاربردهای گسترده‌ای برای آنزیم‌های تثبیت شده وجود دارند از جمله سنتز واسطه‌های مختلف داروهای پیچیده، سنتز شیمیایی در شرایط ملایم و بدون تولید محصولات جانبی سمی، تشخیص بیماری و غیره (۵). یکی از مهمترین کاربردهای آنها در محیط زیست، اصلاح آب‌ها، هوا و خاک‌های آلوده از طریق حذف آلاینده‌های مقاوم با استفاده از یک روش مؤثر است (۵). از جمله آنزیم‌های مهم در این زمینه، لاکازها هستند. لاکازها (EC 1.10.3.2)، پارادی فنل: دی-اکسیژن اکسیدوردانکازها) همراه با منگنز پراکسیداز و لیگنین پراکسیداز، نوعی آنزیم اصلاح کننده لیگنین (LME)^۱ هستند (۱۸). لاکازها گستره سوبسترای وسیعی دارند بنابراین می‌توانند جهت اهداف صنعتی و یا فرآیندهای زیست پالایی مورد استفاده قرار گیرند (۱۸). نیازهای ساده کاتالیزوری لاکاز (حضور بستره و O_2) و نیز

2- 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)

3- Cation Exchange Capacity

4- St. Louis, MO, USA

5- Scanning Electron Microscopy

6- Brunauer-Emmett-Teller

1- Lignin-modifying enzyme

سانتی‌گراد) تکان داده شد و کانی از راه سانتریفیوژ بازیافت و با بافر شسته شد تا زمانی که در محلول‌های شستشو، فعالیت لاکاز دیده نشد. لازم به ذکر است که نمونه‌های شاهد فاقد کانی نیز جهت سنجش فعالیت اولیه آنزیم مورد استفاده قرار گرفتند.

سنجش فعالیت آنزیم لاکاز

فعالیت آنزیم در ۴۲۰ nm، از طریق تولید رادیکال‌های $ABTS^{\cdot-}$ سبز-آبی ناشی از اکسیداسیون آنزیمی ABTS به عنوان بستره، در ۲۰ درجه سانتی‌گراد، با استفاده از اسپکتروفوتومتر مدل WPA S2000UV/Vis اندازه‌گیری شد. مخلوط مورد سنجش محتوی ABTS (۱ میلی‌مولار)، بافر استات سدیم ۰/۱ مولار (pH=۵) و نمونه محتوی آنزیم بود. مدت زمان انجام واکنش آنزیمی ۱۰ دقیقه بود. یک واحد فعالیت لاکاز (U)، مقدار آنزیمی است که می‌تواند یک میکرومول ABTS را در هر دقیقه اکسید کند. فعالیت آنزیم از طریق معادله زیر محاسبه گردید:

$$A(UL^{-1}) = \frac{\Delta EV_t}{0.036V_s} \quad (1)$$

در اینجا، ΔE افزایش جذب در هر دقیقه، V_t برابر با حجم کل در کوت و V_s برابر با حجم نمونه در کوت (میلی‌لیتر) می‌باشند. ضریب جذب مولی یا ضریب خاموشی (ϵ_{420}) برابر با 36000 L/mol.cm است (۱۷). مقدار لاکاز فعال پیوند یافته بر کانی‌ها از تفاوت بین مقدار فعالیت اولیه آنزیمی (با مقدار مشخص آنزیم) و فعالیت در محلول رویی سوسپانسیون‌ها در هر نمونه آزمایشی به دست آمد (۱۶). همچنین، درصد جذب از محلول آزمایشی با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید:

$$\% \text{Removal} = \left[\frac{(C_0 - C_e)}{C_0} \right] \times 100 \quad (2)$$

C_0 و C_e به ترتیب بیانگر غلظت اولیه و نهایی آنزیم لاکاز در محلول (mg/L) می‌باشند.

آنالیز نتایج بدست آمده نیز با استفاده از نرم‌افزار آماری MSTATC انجام و میانگین داده‌ها با بهره‌گیری از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه گردیدند.

نتایج و بحث

آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

پس از آماده‌سازی کانی‌های زئولیت و مونتموریلونیت K10 و پس از خرد کردن کانی زئولیت، تصاویر میکروسکوپی نمونه‌هایی از این کانی‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) تهیه

تعیین گردید. آنالیزهای پراش پرتو ایکس (XRD) و فلئوئورسانس پرتو ایکس (XRF) کانی زئولیت نیز در پژوهشکده چرخه سوخت هسته، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای تهران انجام شد.

مطالعه ایزوترم‌های جذب آنزیم لاکاز بر کانی‌های

مونتموریلونیت و زئولیت

اثر غلظت لاکاز بر جذب آن توسط مونتموریلونیت K10 و زئولیت مورد مطالعه قرار گرفت. ایزوترم‌های جذب به منظور تعیین رابطه ویژه بین غلظت تعادلی آنزیم لاکاز (ماده جذب شده) در توده محلول و مقدار جذب شده آن در سطح کانی‌ها، مورد استفاده قرار گرفتند. چهار مدل ایزوترم لانگمویر، فروندلیچ، تمکین و دوبینین-رادوشکویچ (D-R) برای مطالعه ایزوترم‌های جذب لاکاز بر کانی‌های زئولیت و مونتموریلونیت، در pH=۵ و دمای ثابت ۲۰ درجه سانتی‌گراد مورد استفاده قرار گرفتند. غلظت‌های اولیه در گستره ۲-۰/۲۵ میلی‌گرم لاکاز بر ۲۰۰ میلی‌گرم کانی تنظیم شدند. جذب و غیرمتحرک‌سازی لاکاز بر سطوح کانی‌های مورد مطالعه نیز مطابق روش روجیرو و همکاران (۲۱) و جاینفردا و بولاگ (۹) انجام شد.

غیرمتحرک‌سازی آنزیم لاکاز در سطوح کانی‌های

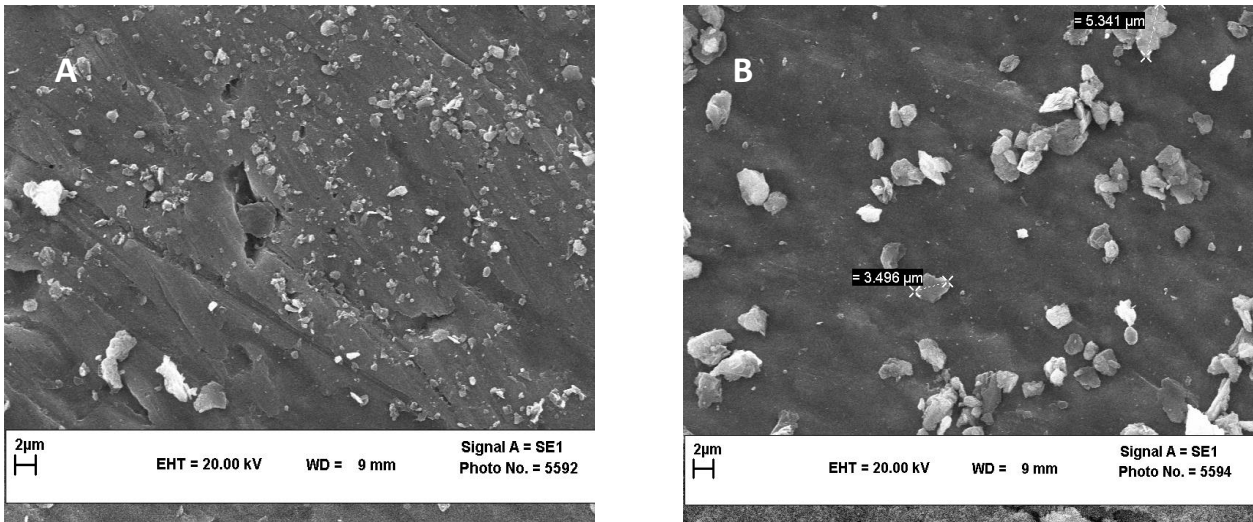
مونتموریلونیت و زئولیت

غیرمتحرک‌سازی آنزیم لاکاز توسط کانی‌های مونتموریلونیت K10 و زئولیت بر اساس روش روجیرو و همکاران (۲۱) و جاینفردا و بولاگ (۹) صورت پذیرفت. در این روش، نخست ۲۰۰ میلی‌گرم از هر یک از کانی‌های مورد مطالعه با ۵ میلی‌لیتر از HNO_3 ۰/۵ نرمال تکان داده شد و سپس در 13000 g سانتریفیوژ شده و با آب مقطر شسته شد. پس از رسیدن محلول رویی به pH خنثی، ۵ میلی‌لیتر از ۳-آمینو پروپیل تری اتوکسی زیلان ۲ درصد ساخته شده در استون خالص به آن افزوده شد و این سوسپانسیون یک شب تکان داده شد. سپس نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند و فاز جامد با ۵ میلی‌لیتر از محلول گلوکارآلدهید ۵ درصد در بافر ۰/۱ مولار استات سدیم دارای pH معادل با ۵ تیمار شده و برای زدودن حباب‌های هوای به دام افتاده، در دسیکاتور خلا گذاشته شد و در دمای اتاق برای ۱ ساعت نگهداری گردید. گلوکارآلدهید آزاد از طریق دو بار شستشو با ۵ میلی‌لیتر از هر یک از آب مقطر و بافر استات زدوده شد و سپس غلظت‌های آنزیمی مورد آزمایش به صورت محلول در بافر استات به کانی تیمار شده افزوده شد. این سوسپانسیون برای ۲۴ ساعت در دمای اتاق (۲۰ درجه

- 1- X-ray diffraction
- 2- X-ray fluorescence
- 3- Dubinin-redushkevich

قرار گرفته‌اند، بنابراین اندازه ذرات کانی‌های بررسی شده در بازه قابل قبول برای این مطالعه بودند. به عنوان مثال، مک بول و اتو (۱۹) بازه اندازه ذرات کانی‌های مورد استفاده در پژوهش خود پیرامون برهم کنش فسفاتاز اسیدی با کانی‌های رسی مونتموریلونیت، ایلیت و کائولینیت را کوچکتر از ۶۳ میکرومتر گزارش نمودند.

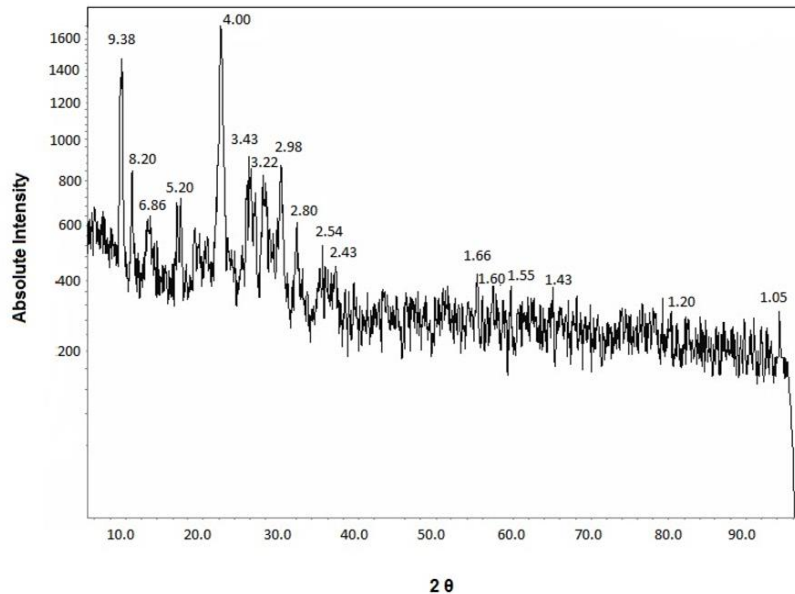
گردیدند. شکل ۱، تصاویر میکروسکوپی کانی‌های زئولیت و مونتموریلونیت را نشان می‌دهد. بر این اساس، بازه اندازه ذرات کانی‌های زئولیت و مونتموریلونیت کمتر از ۱۰ میکرومتر به دست آمد و البته ابعاد ذرات کانی مونتموریلونیت نسبت به زئولیت اندکی ریزتر بود. از آنجایی که در بسیاری از پژوهش‌ها که به بررسی برهم‌کنش آنزیم و کانی رسی پرداخته‌اند، ذراتی با اندازه بزرگتر نیز مورد استفاده



شکل ۱- تصاویر SEM کانی‌های زئولیت (A) و مونتموریلونیت (B) K10

بر اساس شکل، اندازه ذرات کانی‌ها کمتر از ۱۰ میکرومتر است.

Figure 1- Scanning electron microscopy images of zeolite (A) and montmorillonite (B) As shown the mineral particles sizes are about less than 10 microns.



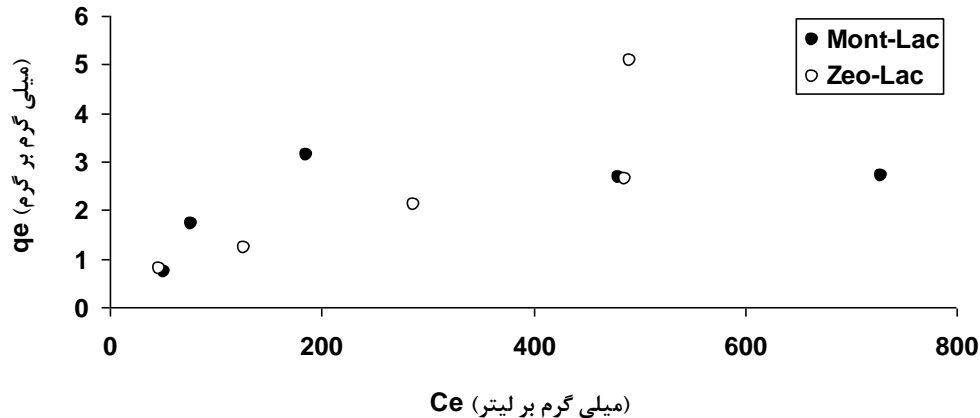
شکل ۲- الگوی XRD کانی زئولیت مورد مطالعه

Figure 2- X-ray diffraction pattern of the studied zeolite

جدول ۱- آنالیز XRF کانی زئولیت

Table 1- X-ray fluorescence analysis of zeolite mineral

Na ₂ O	MgO	Al ₂ O ₃	SiO ₂	P ₂ O ₅	SO ₃	K ₂ O	CaO	TiO ₂	Fe ₂ O ₃	SrO	Cl	MnO	ZrO ₂	BaO
wt %											(mg.k ⁻¹)			
درصد وزنی											میلی گرم بر کیلوگرم			
0.78	1.07	9.70	74.69	1.24	1.55	2.61	5.15	0.32	2.25	0.25	300	900	350	750



شکل ۳- رابطه بین غلظت تعادلی (C_e) و مقدار آنزیم جذب شده (q_e) بر مونت‌موریلونیت K10 (Mont-Lac) و زئولیت (Zeo-Lac) در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد

Figure 3- Relationship between equilibrium concentration (C_e) and adsorbed amount of laccase (q_e) on the montmorillonite K10 (Mont-Lac) and zeolite (Zeo-Lac) at 25°C

۰/۴۵ میکرومتر اندازه‌گیری شد. این مقادیر به ترتیب ۱۲۲/۱۸ و ۱۴۰/۲۸ meq/100g بودند.

جذب آنزیم لاکاز بر کانی‌های مونت‌موریلونیت K10 و زئولیت

رابطه بین غلظت تعادلی آنزیم لاکاز و نیز لاکاز جذب شده بر سطوح کانی‌های زئولیت و مونت‌موریلونیت K10 به روش روجیرو و همکاران (۲۱) و جاینفردا و بولاگ (۹) در گستره غلظت اولیه لاکاز ۲-۲۵/۰ میلی‌گرم لاکاز بر ۲۰۰ میلی‌گرم کانی در شکل ۳ نشان داده شده است.

همچنین، نمودارهای خطی ایزوترم‌های دوینین-رادوشکویچ (D-R)، لانگمویر، فروندلیچ و تمکین مربوط به جذب آنزیم بر کانی-های مورد مطالعه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نیز در شکل‌های ۴، ۵، ۶ و ۷ نشان داده شده‌اند. مقادیر ثابت‌های هر یک از این ایزوترم‌ها نیز در جدول ۲ آورده شده‌اند. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، جذب لاکاز بر مونت‌موریلونیت بهترین تطابق را نخست با مدل D-R (شکل ۴) و سپس با اختلاف بسیار اندکی، با مدل لانگمویر (شکل ۵) نشان داد (به ترتیب R²=۰/۹۷ و R²=۰/۹۶) (جدول ۲).

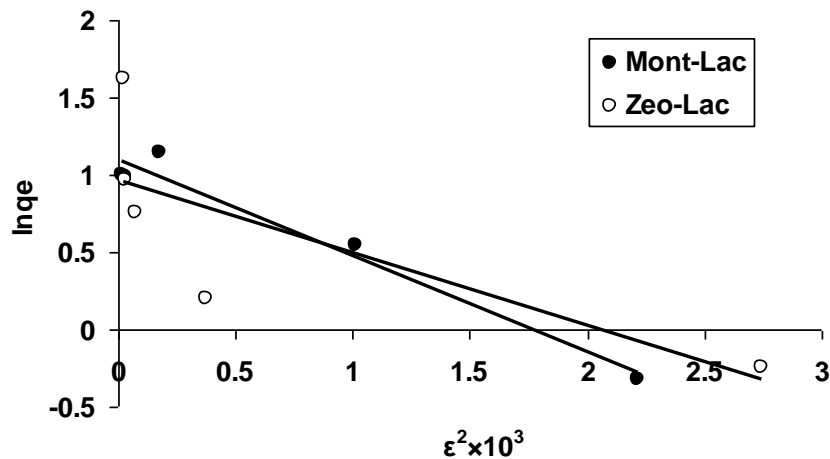
آنالیز پراش پرتو ایکس (XRD^۱) و فلورسانس پرتو ایکس (XRF^۲) زئولیت

الگوی پراش پرتو ایکس و آنالیز فلورسانس پرتو ایکس کانی زئولیت در شکل ۲ و جدول ۱ نشان داده شده است. بر اساس نتایج XRD، کانی زئولیت مورد استفاده در این مطالعه از نوع کلینوپتیلولیت و دارای فرمول شیمیایی (Na,K,Ca)_{2.5}Al₃(Al,Si)₂Si₁₃O₃₆.12H₂O بود.

سطح ویژه و ظرفیت تبادل کاتیونی زئولیت

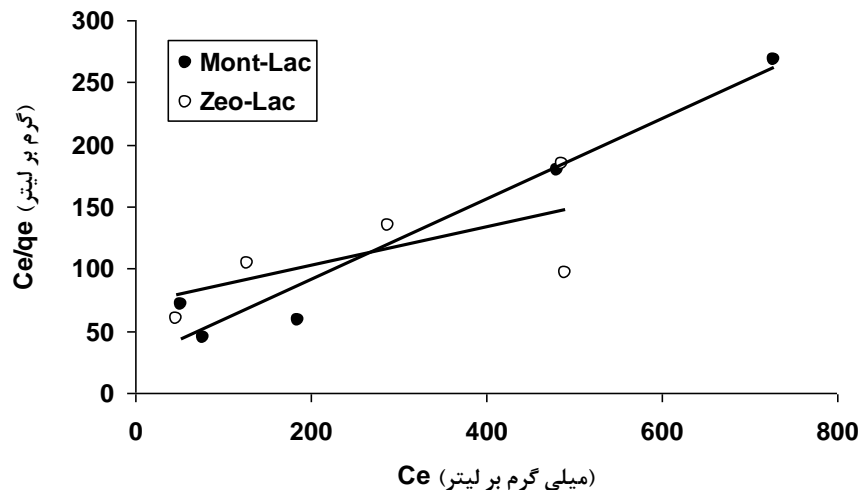
سطح ویژه کانی زئولیت مورد مطالعه نیز تعیین گردید. سطح ویژه به روش BET، سطح ویژه به روش لانگمویر، سطح میکروپور به روش t-Plot و سطح ویژه خارجی به روش t-Plot کانی زئولیت مورد مطالعه با اندازه ذرات کمتر از ۱۰ میکرومتر به ترتیب عبارت بودند از ۴۰/۲۷۱۲، ۶۴۵/۴۷۸۰، ۳/۵۱۸۸ و ۳۶/۷۵۲۴ m²/g. همچنین، ظرفیت تبادل کاتیونی زئولیت در دو گستره اندازه ذرات ۱-۰/۵ و زیر

1- X-ray diffraction
2- X-ray fluorescence
3- Method name: Oxford: Geol. Majors + Traces



شکل ۴- نمودار خطی ایزوترم دوبینین-رادوشکویچ (D-R) جذب لاکاز بر کانی‌های مونت‌موریلونیت K10 (Mont-Lac) و زئولیت (Zeo-Lac) در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد

Figure 4- Linear plot of Dubinin-Redushkevich (D-R) isotherm of laccase sorption on montmorillonite K10 (Mont-Lac) and zeolite (Zeo-Lac) minerals at 25°C



شکل ۵- نمودار خطی ایزوترم لانگمویر جذب لاکاز بر کانی‌های مونت‌موریلونیت K10 (Mont-Lac) و زئولیت (Zeo-Lac) در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد

Figure 5- Linear plot of Langmuir isotherm of laccase sorption on montmorillonite K10 (Mont-Lac) and zeolite (Zeo-Lac) minerals at 25°C

شود:

$$\ln q_e = \ln q_m - \beta \varepsilon^2 \quad (3)$$

در اینجا q_e برابر با مقدار لاکاز جذب شده بر واحد کانی‌های مورد مطالعه (mol/g) و q_m برابر با ظرفیت جذب تک لایه‌ای تئوریک (mol/g) است. پارامتر β نیز برابر با ثابت انرژی جذب (mol^2/J^2) می‌باشد که با انرژی متوسط جذب به ازای هر مول از

این در حالی است که جذب لاکاز بر زئولیت تطابق کمتری را در مقایسه با مونت‌موریلونیت، با این دو مدل جذبی نشان داد ($R^2=0/596$) برای مدل D-R و ($R^2=0/44$) برای مدل لانگمویر). بیان نوع جذب (فیزیکی یا شیمیایی) و نیز مدل لانگمویر برای توصیف تعادل جذب لاکاز بر مونت‌موریلونیت بسیار مناسب بودند. برای تعیین نوع جذب (فیزیکی و یا شیمیایی) می‌توان از مدل D-R استفاده کرد. حالت خطی ایزوترم D-R در قالب معادله زیر نمایش داده می

مدل لانگمویر تطابقی به خوبی مدل D-R نشان داد. از آنجایی که معادله لانگمویر فرض می‌کند که سطح همگن است (۳۲)، بنابراین احتمالاً توزیع همگنی از جایگاه‌های فعال بر سطح کانی مونتموریلونیت وجود داشت. نتایج مشابهی درباره جذب اسید فسفاتاز بر کائولین و اکسیدهای Fe، Al و Mn گزارش شده‌اند (۲۵)، اگرچه، مونتموریلونیت و زئولیت‌ها به طور بسیار متفاوتی در مقایسه با کائولینیت غیرمتورم شونده غیرمتخلخل یا اکسیدهای فلزی، واکنش و یا برهمکنش دارند. بر اساس این مدل، حداکثر مقدار جذب لاکاز بر مونتموریلونیت (Q₀) برابر با ۳/۱۰ mg/g و تمایل جایگاه‌های پیوند مونتموریلونیت برای لاکاز (b) برابر با ۰/۱۲ L/mg بود.

اما در مورد کانی زئولیت، ایزوترم فروندلیچ (شکل ۶) انطباق بیشتری را با داده‌های جذب لاکاز بر این کانی (R²=۰/۸۷) در مقایسه با مونتموریلونیت (R²=۰/۶۱) نشان داد.

جذب غیر ایده‌آل بر سطوح ناهمگن و جذب چندلایه‌ای می‌تواند در قالب ایزوترم فروندلیچ مطرح شود (۷ و ۳۲). برای بیان مدل فروندلیچ نیز از معادله (۷) استفاده می‌شود:

$$q_e = K_F C_e^n \quad (7)$$

در اینجا، K_F و n ثابت‌های فروندلیچ هستند. K_F (mg/g(L/mg)^{1/n}) ظرفیت جذب زئولیت و مونتموریلونیت و n بیانگر شدت جذب بوده که شاخصی از میزان مطلوب بودن فرآیند جذب است. مقادیر n > 1 شرایطی را نشان می‌دهند که جذب مطلوب است (۱۲، ۱۳ و ۲۷).

بر این اساس، ظرفیت جذب (K_F) زئولیت (L/mg)^{1/n} و مقدار پارامتر n به عنوان شاخصی از مطلوب بودن فرآیند جذب در زئولیت ۱/۴۹ بود که هر دو کمتر از مقادیر مربوط به مونتموریلونیت بودند (به ترتیب (L/mg)^{1/n} ۰/۲۳ و ۲/۴۴) بودند. با این حال، مقادیر n برای هر دو کانی بیشتر از یک بودند که شرایط جذب مطلوب را نشان می‌دهد.

اما نکته جالب توجه این بود که در مورد هر دو کانی، مقادیر R² ایزوترم تمکین (شکل ۷) مشابه بودند (R²=۰/۶۲ برای مونتموریلونیت و R²=۰/۶۱ برای زئولیت) (جدول ۲).

اثرات برخی از برهمکنش‌های غیرمستقیم ماده جذب شده با دیگر ماده جذب شونده مجاور آن بر ایزوترم‌های جذب توسط تمکین و پیژو (۲۶) توصیف شدند و آنان اظهار داشتند که به دلیل این برهمکنش‌ها، گرمای جذب همه مولکول‌ها در لایه، با افزایش پوشش، به صورت خطی کاهش می‌یابد. معادله تمکین معمولاً به صورت زیر بیان می‌شود:

$$q_e = \left(\frac{RT}{b} \right) \ln(AC_e) \quad (8)$$

جذب، هنگامی که ماده جذب شونده از فاصله بی‌نهایت در محلول به سطح جاذب جامد منتقل می‌شود، در ارتباط است، (۴، ۲۲ و ۳۲). همچنین، ε پتانسیل پولانی^۱ است که در قالب معادله زیر توصیف می‌شود:

$$\varepsilon = RT \ln \left(1 + \frac{1}{C_e} \right) \quad (4)$$

در اینجا T برابر با دمای محلول (K) و R ثابت گازها می‌باشد که برابر با ۸/۳۱۴ J/mol K است. همچنین می‌توان مقدار انرژی متوسط جذب، E (kJ/mol)، را با استفاده از پارامتر β معادله D-R، با استفاده از معادله زیر محاسبه نمود (۱ و ۳۲):

$$E = \frac{1}{(2\beta)^{1/2}} \quad (5)$$

مقدار انرژی متوسط جذب اطلاعاتی را پیرامون فیزیکی یا شیمیایی بودن جذب ارائه می‌دهد. اگر مقدار E بین ۱ تا ۸ kJ/mol باشد، جذب فیزیکی است و اگر بین ۸ تا ۱۶ باشد، جذب شیمیایی است (۴، ۲۲ و ۳۳).

از طرفی، بر اساس تئوری مدل ایزوترم لانگمویر، حداکثر جذب، مربوط به یک تک لایه اشباع شده از مولکول‌های ماده حل شده بر سطح جاذب می‌باشد آن هم در شرایطی که تعامل جانبی بین مولکول‌های جذب شده وجود نداشته باشد (۶). مدل لانگمویر می‌تواند به صورت معادله زیر بیان شود:

$$q_e = \frac{Q_0 b C_e}{1 + b C_e} \quad (6)$$

در این معادله، q_e (mg/g) برابر با مقدار لاکاز جذب شده بر واحد وزن کانی‌ها و C_e (mg/L) برابر با مقدار غلظت لاکاز جذب نشده، در محلول، در حالت تعادل است. مقدار Q₀ (mg/g) نیز برابر با حداکثر مقدار لاکاز بر واحد وزن کانی‌ها برای تشکیل یک تک لایه کامل بر سطح می‌باشد که در C_e بالا اتصال می‌یابد و ثابت b (L/mg) مربوط به تمایل جایگاه‌های پیوند است.

با این حال، در مقام مقایسه بر اساس مدل D-R، ظرفیت جذب تک لایه‌ای تئوریک (qm) برای مونتموریلونیت برابر با ۳ و برای زئولیت برابر با ۲/۶۳ mg/g بود. همچنین، ثابت انرژی جذب (β) نیز برای مونتموریلونیت برابر با (۱۰^۳ mol^۲/J^۲) ۰/۶۲ و برای زئولیت (۱۰^۳ mol^۲/J^۲) ۰/۴۷ بود. انرژی جذب (انرژی آزاد) متوسط (E) نیز برای کانی مونتموریلونیت ۰/۹ و برای زئولیت ۱/۰۳ kJ/mol بود که به نوعی بیانگر فیزیکی بودن جذب در هر دو کانی می‌باشد.

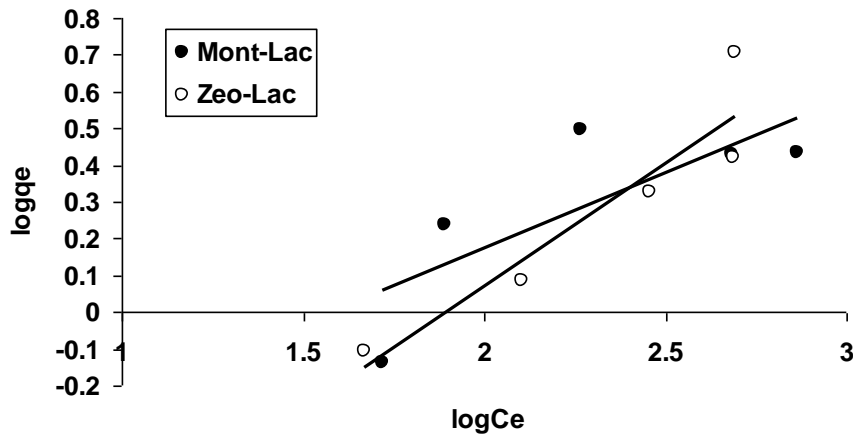
همانطور که بیان شد، جذب لاکاز بر سطح مونتموریلونیت با

دمای مطلق (K) می‌باشند.
 مقدار انرژی جذب در مدل تمکین (b) برای جذب لاکاز از محلول آبی توسط هر دو کانی مثبت بود که نشان می‌دهد احتمالاً فرآیند جذب گرماده (Exothermic) بوده است.

و حالت خطی شده این معادله نیز به صورت زیر می‌باشد:

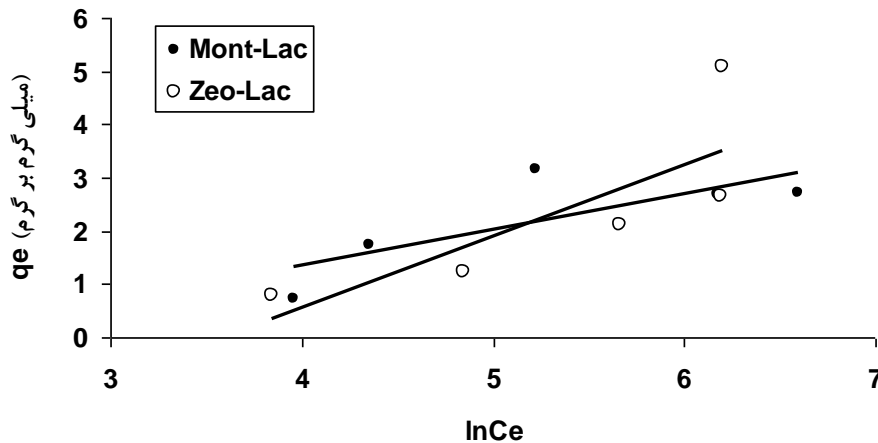
$$q_e = B \ln A + B \ln C_e \quad (9)$$

در این معادله، B برابر با (RT/b) است و b (J/mol) ثابت تمکین است که گرمای جذب را نشان می‌دهد. همچنین، A ثابت ایزوترم تمکین (L/g)، R ثابت عمومی گازها (۸/۳۱۴ J/mol.K) و T



شکل ۶- نمودار خطی ایزوترم فروندلیچ جذب لاکاز بر کانی‌های مونت‌موریلونیت K10 (Mont-Lac) و زئولیت (Zeo-Lac) در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد

Figure 6- Linear plot of Freundlich isotherm of laccase sorption on montmorillonite K10 (Mont-Lac) and zeolite (Zeo-Lac) minerals at 25°C



شکل ۷- نمودار خطی ایزوترم تمکین جذب لاکاز بر کانی‌های مونت‌موریلونیت K10 (Mont-Lac) و زئولیت (Zeo-Lac) در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد

Figure 7- Linear plot of Temkin isotherm of laccase sorption on montmorillonite K10 (Mont-Lac) and zeolite (Zeo-Lac) minerals at 25°C

جدول ۲- ثابت‌ها و ضرایب تعیین مدل‌های ایزوترم لانگمویر، فروندلیچ و تمکین و D-R برای جذب لاکاز بر مونتموریلونیت K10 و زئولیت
 Table 2- Constants and R²s for Langmuir, Freundlich, Temkin and D-R isotherms of laccase absorption on montmorillonite K10 and zeolite

ایزوترم Isotherm	زئولیت-لاکاز Zeo-Lac	مونتموریلونیت-لاکاز Mont-Lac
لانگمویر Langmuir		
Q ₀ (mg/g)	6.579	3.095
b (L/mg)	0.002	0.012
R ²	0.435	0.956
فروندلیچ Freundlich		
K _F (mg/g(L/mg) ^{1/n})	0.054	0.225
n	1.491	2.436
R ²	0.874	0.609
تمکین Temkin		
A (L/g)	0.028	0.139
B	1.345	0.670
b (J/mol)	1842.472	3700.078
R ²	0.640	0.611
دوبینین-رادوشکویچ Dubinin-Redushkevich (D-R)		
qm (mg/g)	2.629	3.000
B (×10 ³ mol ² /J ²)	0.471	0.619
E (KJ/mol)	1.030	0.900
R ²	0.596	0.965

۱ < R_L < ۰ باشد، جذب مطلوب است، ۲) اگر R_L > ۱ باشد، جذب نا مطلوب است، ۳) اگر R_L = ۱ باشد، جذب خطی است و ۴) اگر R_L = ۰ باشد، جذب برگشت ناپذیر است (۱۱، ۱۴، ۲۲ و ۳۳). مقادیر R_L برای هر دو مونتموریلونیت و زئولیت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در گستره ۰-۱ بودند که یک جذب مطلوب را نشان می‌دهد. با این حال، با افزایش C₀ مقدار R_L به سمت صفر میل کرد که نشان می‌دهد جذب لاکاز بر کانی‌ها در غلظت اولیه بالای لاکاز از مطلوب بودن بیشتری برخوردار است.

بر اساس مطالعه وبر و چاکرابورتی (۲۸)، ایزوترم لانگمویر می‌تواند بر حسب پارامتر تعادل (R_L) بیان شود (معادله ۱۰).

$$R_L = \frac{1}{1 + bC_0} \quad (10)$$

در اینجا، C₀ (mg/L) غلظت اولیه لاکاز و b (L/mg) ثابت لانگمویر می‌باشد.

تغییرات پارامتر تعادل (R_L) با غلظت اولیه لاکاز (C₀)، در جدول ۳ نشان داده شده است. برای مقدار R_L چهار حالت وجود دارد: ۱) اگر

جدول ۳- تغییرات پارامترهای تعادل (R_L) و درصد جذب آنزیم به عنوان تابعی از غلظت اولیه آنزیم لاکاز

Table 3- Changes in equilibrium parameter (R_L) and enzyme removal percentage as a function of the initial concentration of laccase enzyme

C ₀ (mg/L)	R _L		Removal (%) درصد جذب	
	مونتموریلونیت-لاکاز Mont-Lac	زئولیت-لاکاز Zeo-Lac	مونتموریلونیت-لاکاز Mont-Lac	زئولیت-لاکاز Zeo-Lac
	125	0.393 ^a	0.792 ^a	58.26 ^c
250	0.245 ^b	0.656 ^b	69.00 ^a	48.93 ^c
500	0.139 ^c	0.488 ^c	62.87 ^b	42.49 ^d
750	0.097 ^d	0.388 ^d	35.79 ^d	35.16 ^e
1000	0.075 ^e	0.322 ^e	27.12 ^e	50.92 ^b

اعداد دارای حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار (p < 0.05) نمی‌باشند
 Numbers followed by the same letter in each column are not significantly different (P < 0.05)

درحالی بود که جذب لاکاز بر ژئولیت بهترین تطابق را با مدل فروندلیچ نشان داد و بنابراین احتمال جذب چندلایه‌ای آنزیم بر سطح این کانی و نیز شرایط جذب مطلوب بر این کانی محتمل است. همچنین، بر اساس مقادیر R_L ، گرچه جذب برای هر دو کانی مورد مطالعه مطلوب بود، اما این مطلوب بودن در غلظت‌های اولیه بالای لاکاز بیشتر بود. بطور کلی به دلیل جذب چند لایه‌ای لاکاز بر سطح ژئولیت، احتمالاً درجه بالاتری از ممانعت فضایی و تغییرات در ساختار آنزیم اتفاق می‌افتد و بنابراین احتمال می‌رود که کارایی کاتالیزوری آنزیم نیز کاهش یابد. لذا، ظاهراً مونتموریلونیت از شرایط مناسب‌تری برای استفاده به عنوان حامل آنزیم برخوردار است. در هر صورت، مطالعات تکمیلی نظیر آزمایشات سینتیکی جهت تصمیم‌گیری‌های نهایی کمک کننده خواهند بود.

بر اساس پارامتر %Removal بالاترین درصد جذب لاکاز بر مونتموریلونیت K10 و ژئولیت به ترتیب مربوط به غلظت‌های ۲۵۰ و ۱۲۵ mg/L بود که تفاوت آماری معنی‌داری را با سایر غلظت‌ها نشان دادند.

نتیجه‌گیری

جذب آنزیم بر سطوح کانی‌های مونتموریلونیت K10 و ژئولیت در قالب ایزوترم‌های جذبی مورد مطالعه قرار گرفت. بر این اساس، جذب لاکاز بر مونتموریلونیت تطابق بالایی را نخست با مدل دو بینین-رادوشکوویچ و سپس با مدل ایزوترم جذبی لانگمویر نشان داد. بر اساس این مدل‌ها، جذب لاکاز بر کانی مونتموریلونیت فیزیکی بود و توزیع همگنی از جایگاه‌های فعال بر سطح این کانی وجود داشت. این

منابع

- Balarak D., Kord Mostafapour F., Azarpiraand H., and Joghataei A. 2017. Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin–radushkevich isotherms studies of equilibrium sorption of ampicilin unto montmorillonite nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 20: 1-9.
- Chapman H.D. 1965. Cation exchange capacity. p. 891-901. In C.A. Black (ed.) *Methods of Soil Analysis*. Part 2. American Society of Agronomy, Madison, Wis, USA.
- Cowan D.A., and Fernandez-Lafuente R. 2011. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*, 49: 326–346.
- Dubinin M.M., Zaverina E.D., and Radushkevich L.V. 1947. Sorption and structure of active carbons. I. Adsorption of organic vapors. *Zhurnal Fizicheskoi Khimii*, 21: 1351–1362.
- Dwevedi A. 2016. Basics of Enzyme Immobilization. p. 21-44. In *Enzyme Immobilization*. Chapter 2. Springer International Publishing Switzerland.
- Eastoe J., and Dalton J.S. 2000. Dynamic surface tension and adsorption mechanisms of surfactants at the air water interface. *Advances in Colloid and Interface Science*, 85: 103–144.
- Freundlich H. 1906. Über die adsorption in lösungen (adsorption in solution). *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 57: 384–470.
- Ghiaci M., Aghaei H., Soleimanian S., and Sedaghat M.E. 2009. Enzyme immobilization Part 1. Modified bentonite as a new and efficient support for immobilization of *Candida rugose* lipase. *Applied Clay Science*, 43: 289–295.
- Gianfreda L., and Bollag J.M. 1994. Effect of soils on the behavior of immobilized enzymes. *Soil Science Society of America Journal*, 58: 1672–1681.
- Habeeb A.F.S.A., and Hiramoto R. 1968. Reaction of proteins with glutaraldehyde. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 126: 16-26.
- Hall K.R., Eagleton L.C., Acrivos A., and Vermeulen T. 1966. Pore- and solid- diffusion kinetics in fixed-bed adsorption under constant-pattern condition. *Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals*, 5: 212–223.
- Hameed B.H., Mahmoud D.K., and Ahmad A.L. 2008. Equilibrium modeling and kinetic studies on the adsorption of basic dye by a low-cost adsorbent: coconut (*Cocos nucifera*) bunch waste. *Journal of Hazardous Materials*, 158: 65–72.
- Ho Y.S., and McKay G. 1998. Sorption of dye from aqueous solution by peat. *Chemical Engineering*, 70: 115–124.
- Ho Y.S., Huang C.T., and Huang H.W. 2002. Equilibrium sorption isotherm for metal ions on tree fern. *Process Biochemistry*, 37: 1421–1430.
- Jesionowski T., Zdarta J., and Krajewska B. 2014. Enzymes immobilization by adsorption: A review. *Adsorption*, 20: 801–821.
- Lai C., Zeng G.M., Huang D.L., Zhao M.H., Huang H.L., Huang C., Wei Z., Li N.J., Xu P., Zhang C., and Xie G.X. 2013. Effect of ABTS on the adsorption of *Trametes versicolor* laccase on alkali lignin. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 82: 180-186.
- Linke D., Bouws H., Peters T., Nimitz M., Berger R.G., and Zorn H. 2005. Laccases of *Pleurotus sapidus*: Characterization and cloning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 9498–9505.

- 18- Majeau J.A., Brar S.K., and Tyagi R.D. 2010. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology*, 101: 2331–2350.
- 19- Makboul H.E., and Ottow J.C.G. 1979. Michaelis constant (K_m) of acid phosphatase as affected by montmorillonite, illite, and kaolinite clay minerals. *Microbial Ecology*, 5: 207-213.
- 20- Rosevear A., Kennedy J.F., and Cabral J.M.S. (Eds), 1987. *Immobilised Enzymes and Cells*, IOP Publishing Ltd., Bristol.
- 21- Ruggiero P., Sarkar J.M., and Bollag J.M. 1989. Detoxification of 2,4-dichlorophenol by a laccase immobilized on soil or clay. *Soil Science*, 147: 361–370.
- 22- Saltali K., Sari A., and Aydin M. 2007. Removal of ammonium ion from aqueous solution by natural Turkish (Yildizeli) zeolite for environmental quality. *Journal of Hazardous Materials*, 141: 258–263.
- 23- Sheldon R.A. 2007. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 49: 1289–1307.
- 24- Sheldon R.A., and van Pelt S. 2013. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how? *Chemical Society Reviews*, 42: 6223–6235.
- 25- Shindo H., Watanabe D., Onaga T., Urakawa M., Nakahara O., and Huang Q. 2002. Adsorption, Activity, and Kinetics of Acid Phosphatase as Influenced by Selected Oxides and Clay Minerals. *Soil Science and Plant Nutrition*, 48: 763-767.
- 26- Temkin M.J., and Pyzhev V. 1940. Recent modifications to Langmuir isotherms. *Acta Physicochimica U.R.S.S*, 12: 217–222.
- 27- Treybal R.E. 1968. *Mass transfer operations*. 2nd ed. McGraw Hill, New York.
- 28- Weber T.W., and Chakraborti R.K. 1974. Pore and solid diffusion models for fixed-bed adsorbers. *American Institute of Chemical Engineers Journal (AIChE)*, 20: 228-238.
- 29- Wohlgemuth R. 2010. Biocatalysis—Key to sustainable industrial chemistry. *Current Opinion in Biotechnology*, 21: 713–724.
- 30- Wong L.S., Khan F., and Micklefield J. 2009. Selective covalent protein immobilization: Strategies and applications. *Chemical Reviews*, 109:4025–4053.
- 31- Zdarta J., Meyer A.S., Jesionowski T., and Pinelo M. 2018. A General overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. *Catalysts*, 8:92.
- 32- Zheng H., Liu D., Zheng Y., Liang S., and Liu Z. 2009. Sorption isotherm and kinetic modeling of aniline on Cr-bentonite. *Journal of Hazardous Materials*, 167: 141–147.
- 33- Zheng H., Wang Y., Zheng Y., Zhang H., Liang S., and Long M. 2008. Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies on the sorption of 4-hydroxyphenol on Cr-bentonite. *Chemical Engineering*, 143: 117–123.

Study of Laccase Adsorption Isotherms on Montmorillonite K10 and Zeolite Minerals

H. Rahmani¹- A. Lakzian^{2*}- A. Karimi³- A. Halajnia⁴

Received: 10-11-2018

Accepted: 02-01-2019

Introduction: Laccases are potent enzymes that are capable of oxidizing various phenolic and non-phenolic compounds as well as resistant environmental pollutants. One of the most effective methods for improving their properties, such as increasing the stability of these enzymes and even increasing their activity, is the immobilization of laccases on different carriers. In the process of immobilization, the enzyme is bonded to a solid carrier which is insoluble in the reaction mixture. In this process, the movement of the enzyme in space is severely restricted, while its catalytic activity is still maintained. One of the carriers used to create recyclable biocatalyst systems is mineral. Minerals as inorganic carriers are inexpensive, abundant in nature, readily available, and also have high biocompatibility. The objective of the present study was to investigate the adsorption properties of Laccase enzyme from *T. versicolor* fungus on montmorillonite K10 and zeolite minerals using Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin-Radushkevich isotherms.

Materials and Methods: For this study, the pure laccase enzyme ($> 10U\text{ mg}^{-1}$), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) substrate and montmorillonite K10 mineral (with a specific surface area of $220\text{-}270\text{ m}^2/\text{g}$ and a cation exchange capacity (CEC) equal to $30\text{ meq }100\text{ g}^{-1}$) were purchased from Sigma-Aldrich. Zeolite mineral was provided from a mine located in southeast Semnan province. Scanning electron microscopy (SEM) images of both minerals, CEC of zeolite with sodium acetate solution ($\text{pH}=8.2$) and zeolite surface area were determined. X-ray Diffraction (XRD) and X-ray Fluorescence (XRF) analyzes of zeolite mineral were also done. In order to immobilize laccase on the minerals, 200 mg of both minerals were activated by shaking with 0.5N HNO_3 for 2 hours and a solution of 2% 3-aminopropyltriethoxylane in acetone. The activated minerals were treated by a 5% solution of glutaraldehyde in a 0.1M sodium acetate buffer ($\text{pH}=5$) and were shaken for 24 hours with 0.25-2.0 mg of the laccase dissolved in the buffer. Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin-Radushkevich isotherms were determined. The experiment was carried out at a constant temperature of 20°C . The results were analyzed using the MSTATC software and the means of the data were compared using Duncan's multiple range test.

Results and Discussion: Based on the results, the zeolite type was clinoptilolite with a chemical formula of $(\text{Na,K,Ca})_{2.5}\text{Al}_3(\text{Al,Si})_2\text{Si}_{13}\text{O}_{36}\cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Moreover, BET Surface Area, Langmuir Surface Area, t-Plot Micropore Area and t-Plot External Surface Area of zeolite were 40.2712, 645.4780, 3.5188 and $36.7524\text{ m}^2/\text{g}$, respectively. Laccase absorption on montmorillonite K10 showed the highest compliance first with the Dubinin-Radushkevich model ($R^2=0.97$) and then with the Langmuir adsorption isotherm model ($R^2=0.96$). Based on the D-R model, the theoretical monolayer sorption capacity (q_m) and the constant of the sorption energy (β) of montmorillonite K10 were 3 mg/g and $0.62 (\times 10^3\text{ mol}^2/\text{J}^2)$, respectively. According to the Langmuir isotherm, there was probably a homogeneous distribution of active sites on the montmorillonite K10 mineral surface. On the other hand, laccase adsorption on zeolite showed the best compliance with the Freundlich model ($R^2=0.87$). Accordingly, sorption capacity (K_F) of zeolite was 0.05 mg/g (L/mg)^{1/n}. The amount of n parameter as an indicator of the favorability of sorption process was 1.49 demonstrating favorable absorption condition. The values of R^2 obtained for Temkin isotherm model were, however, equal in both minerals ($R^2=0.62$ for montmorillonite K10 and $R^2 = 0.61$ for zeolite), and based on this model, the adsorption process was likely to be exothermic. According to the values of the equilibrium parameter (R_L) of montmorillonite K10, the absorption was favorable. However, with increasing the initial concentration of laccase, the amount of R_L approached zero indicating the laccase adsorption on the mineral is more favorable at higher initial concentrations of laccase. Based on % Removal parameter, the highest percentage of laccase adsorption on montmorillonite K10 and zeolite was related to concentrations of 250 and 125 mg/L, respectively, which showed a statistically significant difference with other concentrations.

1, 2, 3 and 4- Ph.D. Student of Soil Biology and Biotechnology, Professor, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Respectively

(*- Corresponding Author Email: lakzian@um.ac.ir)

Conclusion: In general, laccase absorption on montmorillonite K10 showed the best fit with Dubinin–Radushkevich and Langmuir adsorption isotherm models. On the other hand, adsorption of laccase on zeolite mineral showed the best fit with Freundlich model. A higher degree of steric hindrance and conformational changes in the enzyme structure is likely to occur and subsequently, the catalytic efficiency of the enzyme complexes may decrease. Therefore, montmorillonite is more suited to be used as a carrier of laccase enzymes. However, complementary studies such as kinetic tests will help to make final decisions.

Keywords: Immobilization, Isotherm, Laccase, Montmorillonite, Zeolite