

# 超顺磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 空心亚微球固定脂肪酶的研究

刘长霞 刘曼丽 张亚男 谭天伟\*

(北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029)

**摘 要:** 采用溶剂热法合成磁性亚微米球,并且利用扫描电镜、透射电镜、傅里叶红外光谱仪、X-射线衍射仪、振动样品磁强计等对合成样品进行了分析表征,结果表明所获样品为平均粒径为 350 nm 的超顺磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  空心亚微球。对该样品进行了  $\text{SiO}_2$  包覆或氨基硅烷修饰,分别将  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  空心亚微球、 $\text{SiO}_2$  包覆  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  空心亚微球和氨基功能化  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  空心亚微球作为固定化载体进行脂肪酶固定化。研究表明  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  空心亚微球经  $\text{SiO}_2$  包覆或氨基功能化后对脂肪酶的固载量分别提高 3.2 和 4.0 倍,固定化酶比活力提高 2.9 和 3.4 倍。固定化的最优条件为 pH 6、25  $^{\circ}\text{C}$  的条件下固定 22 h。

**关键词:** 超顺磁性;  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  亚微球;  $\text{SiO}_2$  包覆; 氨基修饰; 脂肪酶; 固定化

**中图分类号:** Q814.2

## 引 言

脂肪酶(三酰基甘油酰基水解酶, E. C. 3.1.1.3)可以催化水解、酯交换、酯化、醇解、酸解、氨解等多种反应<sup>[1]</sup>,是具有重要工业应用价值的酶。利用磁性载体对脂肪酶固定化,易于实现固定化脂肪酶的分离和连续化操作,在工业生产中应用潜力巨大<sup>[2-3]</sup>。

常用的脂肪酶固定化方法有吸附法和共价法等。共价法固定的脂肪酶具有更好的稳定性,不易受环境影响解析脱落或变性失活,但可能会因化学键连接掩盖了酶活性中心或限制构象变化而使其活性丧失;吸附法是基于物理吸附和离子键将脂肪酶固定在介质材料表面,依靠的是较弱的分子间作用力,该法酶负载量高,对酶活力的影响不大,但因是弱连接,酶分子易从载体材料脱落<sup>[4]</sup>。脂肪酶的固定化材料中,超顺磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  微粒子具有良好的生物相容性和高饱和磁化强度,在外加磁场的作用下能够方便地定位、导向和分离,是生物催化的理想磁性载体材料<sup>[5-6]</sup>。人们对磁性粒子表面改性以提高脂肪酶负载量的研究,大多是氨基功能化后与偶联试剂反应,通过共价连接固定脂肪酶<sup>[7-8]</sup>。

本文将溶剂热方法合成的超顺磁性  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  空心亚微球经  $\text{SiO}_2$  包覆或氨基硅烷修饰,利用载体表面包覆  $\text{SiO}_2$  或修饰氨基可有效负载蛋白质特性<sup>[9-10]</sup>,直接进行脂肪酶固定化,减少反应步骤,实现脂肪酶有效固定。通过固定化效果的比较,为磁性固定化脂肪酶的工业应用提供实验依据和理论参考。

## 1 实验部分

### 1.1 实验原料和仪器

#### 1.1.1 实验试剂

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、NaOH、盐酸、乙二醇、乙酸钠、3-氨基硅烷(APTES),北京化工厂;聚乙二醇 4000(PEG-4000),北京益利精细化学品有限公司;正硅酸乙酯(TEOS),天津福晨化学试剂厂;橄榄油,国药集团化学试剂有限公司;蛋白 Marker,美国 Bio-Rad 公司。除橄榄油为化学纯,其他均为分析纯。*Candida* sp 99-125 脂肪酶粉,工业级,实验室自制<sup>[11]</sup>。

#### 1.1.2 实验仪器

SUPRA 55 型扫描电镜(SEM),德国 Zeiss 公司;H-800 型透射电镜(TEM),日本 Hitachi 公司;3100 型傅里叶红外光谱仪(FT-IR),美国 Varian 公司;D/max-Ultima III 型 X-射线衍射仪(XRD),日本 Rigaku 公司;7410 型振动样品磁强计(VSM),美国 Lake Shore 公司;WD-9403F 紫外-可见分光光度计、DYY-10C 电泳仪,北京六一仪器厂;Universal Hood2 拍胶仪,美国 Bio-Rad 公司。

收稿日期: 2013-05-22

第一作者: 女,1969 年生,在职博士生

\* 通讯联系人

E-mail: twtan@mail.buct.edu.cn

<http://www.journal.buct.edu.cn>

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 空心亚微球 (HMSF) 的合成

参照文献[12]方法合成 HMSF: 首先配制浓度为 0.13 mmol/mL 的  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  的无水乙二醇溶液, 接着加入乙酸钠、PEG 4000, 使二者的质量浓度分别为 100 和 25 mg/mL; 剧烈搅拌 30 min, 转移至衬有聚四氟乙烯内壁反应釜中, 200 °C 恒温反应 8 h; 自然冷却至室温, 用乙醇、去离子水各洗涤 3 次, 无水乙醇洗涤 2 次, 存于无水乙醇中。

### 1.2.2 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 空心亚微球包覆 $\text{SiO}_2$ (HMSF@ $\text{SiO}_2$ )

称取 500 mg HMSF, 加入 1 mol/L 的 NaOH 溶液 100 mL, 加热升温至 90 °C, 400 r/min 搅拌 10 min, 再加入 3 mL 油酸, 反应 30 min, 无水乙醇、丙酮洗涤数次; 加入 8 mL TEOS、0.8 g 的表面活性剂 Triton X-100, 超声 5 min, 加入 50 mL 去离子水, 超声 20 min 混匀; 将上述混合液转移到 500 mL 圆底烧瓶, 加入 40 mL 氨水、100 mL 无水乙醇, 90 °C、400 r/min 电动搅拌 4 h, 乙醇和去离子水洗涤 3 次, 产物即为 HMSF@ $\text{SiO}_2$ , 无水乙醇封存。

### 1.2.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 空心亚微球氨基功能化 (AHMSF)

取 0.5 g HMSF 加 300 mL 无水乙醇, 4 mL 去离子水, 置于烧瓶中超声 30 min, 待充分分散后, 逐滴加入 1.2 mL APTES, 室温下 450 r/min 搅拌反应 7.5 h, 磁性分离, 用无水乙醇洗涤得到 AHMSF。

### 1.2.4 脂肪酶固定化条件优化

将上述 3 种磁性空心亚微球载体 40 °C 真空干燥过夜, 分别进行 pH、温度及反应时间等条件优化。

反应结束后去离子水反复洗涤, 磁性分离, 冷冻干燥, 密封后 4 °C 保存。

## 1.3 分析方法

### 1.3.1 固定化脂肪酶水解比活力的测定

采用橄榄油乳液水解法<sup>[4]</sup>测定并定义固定化脂肪酶水解比活力为: 单位质量固定化脂肪酶在 38 °C、pH 8.0 下每 min 水解橄榄油或产生脂肪酸的物质的量为固定化脂肪酶水解比活力。

将 5 mL 的橄榄油乳液加入到 4 mL 的 pH 8.0、0.05 mol/L 的 PBS 缓冲溶液中, 38 °C 水浴预热 5 min; 加入 0.020 g 固定化脂肪酶, 迅速摇匀, 反应 10 min, 秒表计时。做 3 个平行样品取平均值, 反应体系不加固定化酶做为对照, 用标准氢氧化钠溶液滴定。

### 1.3.2 固定化载体的脂肪酶酶载量测定

采用 Bradford 方法<sup>[10]</sup>测定脂肪酶固定化前后的反应液吸光度值  $A_{595}$ , 计算脂肪酶浓度作为固定

到载体上的脂肪酶量。

### 1.3.3 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

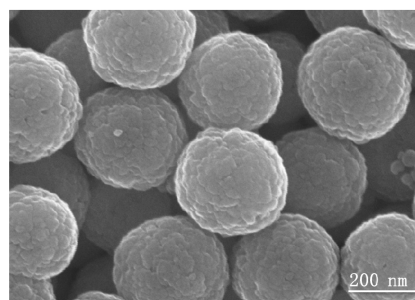
参照文献[13]配制电泳过程中使用到的各种缓冲液及电泳胶。待测样品各取 5 mg 加入到 10 mL 的 2×SDS 缓冲液中, 沸水浴 10 min, 冷却至室温后取上清液 5  $\mu\text{L}$  上样, SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。分离胶的质量分数为 12%, 电泳条件为 18 mA, 恒流 50 min。

## 2 结果与讨论

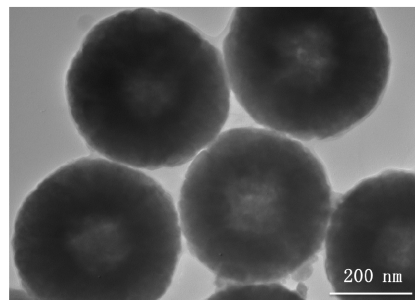
### 2.1 合成产物的表征

#### 2.1.1 HMSF

图 1 为溶剂热方法合成的 HMSF 的 SEM 与 TEM 图。由图 1 可见 HMSF 的粒径为 310 ~ 400 nm, 平均粒径 350 nm, 具有空心结构。



(a) SEM



(b) TEM

图 1 HMSF 的 SEM 和 TEM 图

Fig. 1 SEM (a) and TEM (b) images of HMSF

HMSF 的 XRD 谱图如图 2 所示。XRD 衍射峰与反尖晶石结构  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  标准卡片 (JCPDS card, No. 75-0033) 一致<sup>[14]</sup>, 表明所合成的 HMSF 晶型良好。

经 VSM 检测, HMSF 具有超顺磁性, 饱和磁化强度达到 86.7 emu/g (图 3); 在磁场条件下, HMSF 被吸附到瓶壁, 无磁场条件下则又分散在水溶液中 (图 4)。

#### 2.1.2 HMSF@ $\text{SiO}_2$ 和 AHMSF

$\text{SiO}_2$  纳米粒子对蛋白有良好的吸附能力, 因此

常被用于吸附固定蛋白质<sup>[15]</sup>,有文献报道  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  纳米粒子表面包覆  $\text{SiO}_2$  吸附蛋白质<sup>[16]</sup>。本文通过 HMSF 包覆  $\text{SiO}_2$  形成核壳结构  $\text{HMSF@SiO}_2$  复合粒子,其 SEM 和 TEM 照片如图 5 所示,HMSF 表面包覆一层厚度为 20 nm 的  $\text{SiO}_2$  外壳。

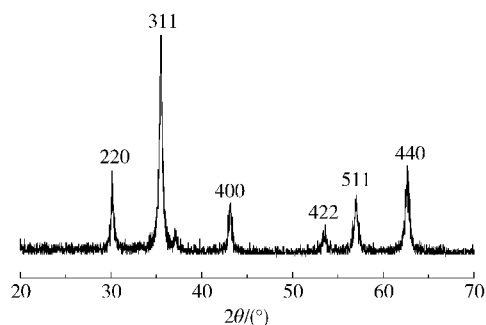


图2 HMSF 的 XRD 谱图

Fig. 2 XRD pattern of HMSF

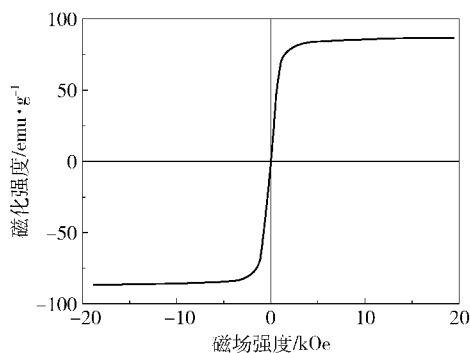


图3 HMSF 的磁力曲线

Fig. 3 Room-temperature magnetization curve of HMSF

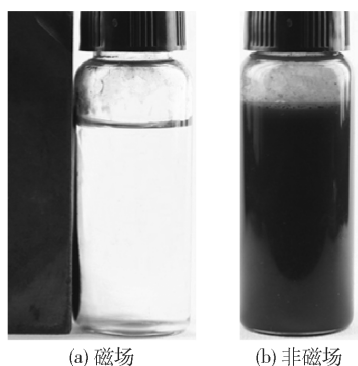
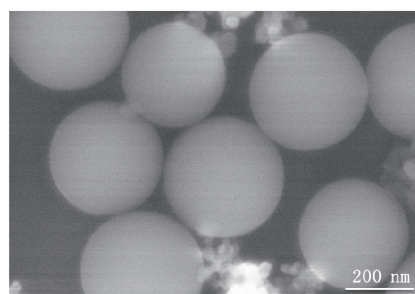


图4 HMSF 磁场和非磁场条件下照片

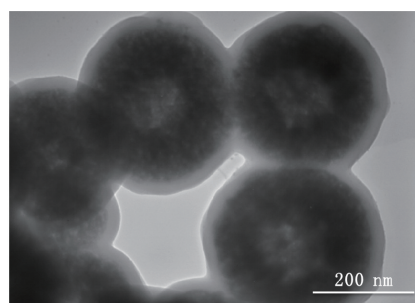
Fig. 4 Digital photographs of HMSF in a magnetic field and in the absence of a magnetic field

用 APTES 对 HMSF 进行修饰,得到氨基功能化的 AHMSF。在 HMSF 的 FT-IR 谱图(图 6 谱线 a)中,3419  $\text{cm}^{-1}$  和 563  $\text{cm}^{-1}$  分别是 HMSF 的—OH 和 Fe—O 的吸收峰;在  $\text{HMSF@SiO}_2$  的 FT-IR 谱图(图 6 谱线 b)中,Fe—O 偏移到了 622  $\text{cm}^{-1}$ ,1636  $\text{cm}^{-1}$  是

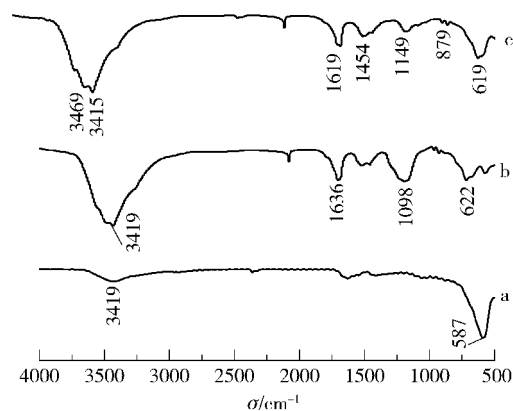
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2$  中 H—O—H 的弯曲振动峰,1098  $\text{cm}^{-1}$  是 Si—O—Si 的晶格振动峰,表明  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  表面成功包覆了  $\text{SiO}_2$ <sup>[17]</sup>;在 AHMSF 的 FT-IR 谱图(图 6 谱线 c)中,Fe—O 被转移到 619  $\text{cm}^{-1}$ ,在 3415  $\text{cm}^{-1}$  和 1620  $\text{cm}^{-1}$  有 2 个强的吸收尖峰,可归结为 N—H,  $\text{NH}_2$  伸缩振动峰,此外在 1149  $\text{cm}^{-1}$  和 1455  $\text{cm}^{-1}$  分别是 Si—O 和烷基吸收峰,880  $\text{cm}^{-1}$  弱吸收峰为 C—Si 伸缩振动峰<sup>[18-19]</sup>,表明偶联剂 APTES 修饰到 HMSF 表面。



(a) SEM



(b) TEM

图5  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2$  的 SEM 和 TEM 照片Fig. 5 SEM(a) and TEM(b) images of  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2$ 图6 HMSF(a)、 $\text{HMSF@SiO}_2$ (b)和 AHMSF (c) 的 FT-IR 谱图Fig. 6 FT-IR spectra of HMSF(a),  $\text{HMSF@SiO}_2$ (b) and AHMSF (c)

## 2.2 固定化条件的优化

### 2.2.1 pH

取实验室自制的 *Candida* sp 99-125 脂肪酶粉 3 g, 分别溶解到 100 mL、0.05 mol/L 的不同 pH 缓冲液中。将 3 种磁性空心亚微球载体各 0.5 g, 加入到不同 pH 的脂肪酶溶液中, 其中 pH 4.0~5.0 为柠檬酸-磷酸缓冲液, pH 6.0~8.0 是 PBS 缓冲溶液, pH 9.0 为硼砂-氢氧化钠缓冲液。25 °C、180 r/min 摇瓶, 固定 22 h, 结果如图 7 所示。

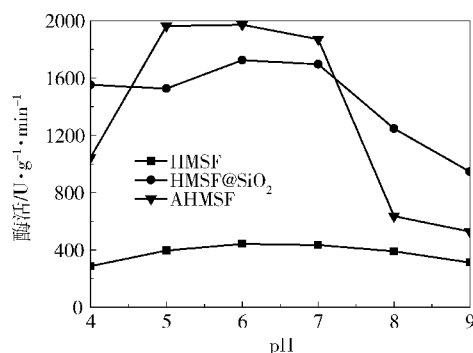


图 7 pH 对固定化脂肪酶活性的影响

Fig. 7 Effects of pH on the immobilized lipase activity for different carriers

HMSF、HMSF@SiO<sub>2</sub> 和 AHMSF 3 种载体固定脂肪酶较适合的 pH 范围分别为 pH 5.0~7.0、pH 5.0~7.0 及 pH 4.0~7.0。HMSF@SiO<sub>2</sub> 和 AHMSF 固定脂肪酶的效果远高于 HMSF, 且 AHMSF 效果最佳。*Candida* sp 99-125 脂肪酶提纯分离得到 4 种同工酶, pI 都在 5~6 之间, 在 pH 7.5~8.5 范围内都具有较高的稳定性, 酶活性随 pH 升高或下降而迅速下降<sup>[20]</sup>。所以, 不同 pH 固定条件下获得固定化脂肪酶活性不同的原因, 是酶吸附量及不同 pH 条件下酶活性不同。

### 2.2.2 温度

取 0.5 g 3 种磁性空心亚微球载体, 分别加入到 100 mL、pH 7.0、0.05 mol/L 的 PBS 的脂肪酶液中, 分别在 10、15、20、25、30、35、40 °C, 180 r/min 摇瓶, 固定 22 h, 结果如图 8 所示。

随温度升高, 脂肪酶的 4 种同工酶活性迅速下降<sup>[17]</sup>, 吸附反应是放热反应, 因此低温条件下有利于载体吸附固定脂肪酶。但低温延长达到吸附平衡时间。从图 8 可见 HMSF 固定脂肪酶适宜的温度范围是 25~35 °C, 而 HMSF@SiO<sub>2</sub> 和 AHMSF 受温度影响较大, 25 °C 脂肪酶固定化效果最佳。

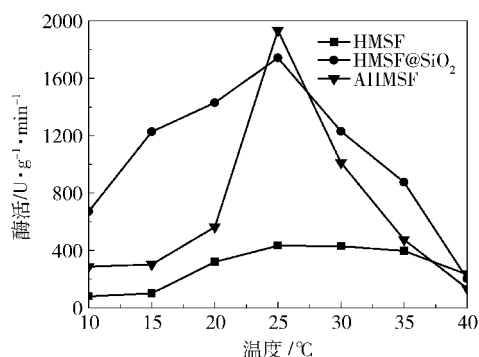


图 8 固定化温度对不同载体固定化酶活性的影响

Fig. 8 Effects of temperature on the immobilized lipase activity for different carriers

### 2.2.3 固定化时间

取 0.5 g 3 种磁性空心亚微球载体, 分别加入到 100 mL、pH 7.0、0.05 mol/L 的 PBS 的脂肪酶液中, 25 °C、180 r/min 摇瓶, 分别固定 2、8、16、20、22、24 h, 结果如图 9 所示。从图 9 可知, HMSF 固定脂肪酶 18 h 酶比活力达到最大值, 而 HMSF@SiO<sub>2</sub> 和 AHMSF 则是 22 h。

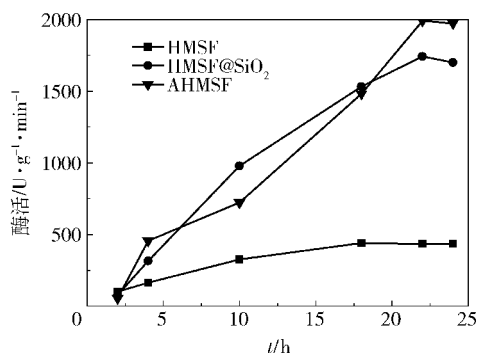


图 9 固定化反应时间对不同载体固定化酶活性的影响

Fig. 9 Effect of reaction time on the immobilized lipase activity for different carriers

总之, 固定化 pH、温度和时间对固定化脂肪酶的酶活性影响显著, AHMSF 固定脂肪酶的酶活性最高。最佳条件下 HMSF、HMSF@SiO<sub>2</sub> 和 AHMSF 载体固定脂肪酶的效果比较见表 1, AHMSF@SiO<sub>2</sub> 和 AHMSF 载体的脂肪酶固载量分别为 40.3、48.1 mg/g 载体, 水解酶活分别为 1743、1972  $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min}^{-1})$ , 固定化效果远高于 HMSF, 而单位蛋白水解比活力则差别不大。

通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (图 10) 也可以观察到 HMSF、HMSF@SiO<sub>2</sub> 和 AHMSF 的脂肪酶固载量依次升高。因表面引入 SiO<sub>2</sub> 或氨基基团, 不同基团及其引起的粒子表面电荷的变化可改变蛋白分



表 1 脂肪酶固定在不同载体的效果比较  
Table 1 Comparison of the performance of immobilized lipase on different carriers

载体	载酶量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	水解酶活/ $\mu\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{min}^{-1})^{-1}$	单位蛋白比活力/ $\mu\text{mol} \cdot (\text{g} \cdot \text{min}^{-1})^{-1}$
HMSF	9.7	445	45876
HMSF@SiO <sub>2</sub>	40.3	1743	43251
AHMSF	48.1	1972	41301

子的高级结构变化,从而影响蛋白质的负载量的变化<sup>[16-21]</sup>。

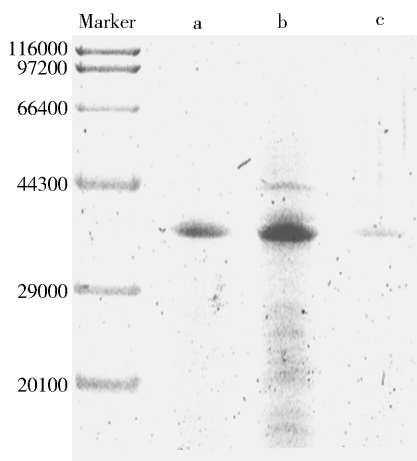


图 10 HMSF@SiO<sub>2</sub> (a)、AHMSF (b) 和 HMSF (c) 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig. 10 SDS-PAGE of HMSF@SiO<sub>2</sub> (a), AHMSF (b) and HMSF (c)

### 3 结论

(1) 采用溶剂热法合成出具有超顺磁性的 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 空心亚微球, 经 SiO<sub>2</sub> 包覆或氨基功能化 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性空心亚微球作载体, 最优条件下, 脂肪酶的固定量比裸 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性空心亚微球分别提高 3.2 和 4.0 倍, 固定化酶比活力提高 2.9 和 3.4 倍。

(2) SiO<sub>2</sub> 包覆或氨基功能化 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁性空心亚微球脂肪酶在 pH 6、25 ℃ 条件下, 固定 22 h 有最佳固定化效果, 脂肪固载量分别达 40.3、48.1 mg/g 载体, 水解比活力分别达 1743、1972  $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{min}^{-1})$ 。

#### 参考文献:

- [1] Pandey A, Benjamin S, Soccol C R, et al. The realm of microbial lipases in biotechnology[J]. Biotechnology Applied Biochemistry, 1999, 29(2): 119-131.
- [2] Caruntu D, Cushing B L, Caruntu G, et al. Attachment

of gold nanograins onto colloidal magnetite nanocrystals [J]. Chemistry of Materials, 2005, 17 (13): 3398-3402.

- [3] Ranjbakhsh E, Bordbar A K, Abbasi M, et al. Enhancement of stability and catalytic activity of immobilized lipase on silica-coated modified magnetite nanoparticles [J]. Chemical Engineering Journal, 2012, 179: 272-276.
- [4] Lumor S E, Akoh C C. Esterification and hydrolytic activities of *Candida rugosa* lipase isoform 1 (LIP1) immobilized on celite 545, duolite A7, and sephadex G-25 [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(21): 10396-10398.
- [5] Knežević Z D, Šiler-Marinković S S, Mojović L V. Immobilized lipases as practical catalysts[J]. Acta Periodica Technologica, 2004, 35: 151-164.
- [6] Abramčić M, Leščić I, Korica T, et al. Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus* [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1999, 25(6): 522-529.
- [7] 谭艳丽, 王玉军, 孙海涛, 等. 在 PVDF-SiO<sub>2</sub> 复合微球上的脂肪酶固定化[J]. 过程工程学报, 2012, 12(3): 472-477.  
Tan Y L, Wang Y J, Sun H T, et al. Immobilization of Lipase on PVDF-SiO<sub>2</sub> Composite Microspheres [J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2012, 12(3): 472-477. (in Chinese)
- [8] Maltas E, Ozmen M, Vural H C, et al. Immobilization of albumin on magnetite nanoparticles [J]. Materials Letters, 2011, 65: 3499-3501.
- [9] Hu B, Pan J, Yu H L, et al. Immobilization of *Serratia marcescens* lipase onto amino-functionalized magnetic nanoparticles for repeated use in enzymatic synthesis of diltiazem intermediate [J]. Process Biochemistry, 2009, 44(9): 1019-1024.
- [10] Xie W L, Ma N. Immobilized lipase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as biocatalyst for biodiesel production [J]. Energy & Fuels, 2009, 23: 1347-1353.
- [11] Tan T W, Zhang M, Wang B W, et al. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation [J]. Process Biochemistry, 2003, 39: 459-465.
- [12] Feng B, Hong R Y, Wang L S, et al. Synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/APTES/PEG diacid functionalized magnetic nanoparticles for MR imaging [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2008, 328(1): 52-59.

- [13] 余瑞元, 袁明秀, 陈丽蓉, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 2 版. 北京: 北京大学出版社, 2005: 262–267.
- Yu R Y, Yuan M X, Chen L R, et al. Principle and method biochemistry experiment[M]. 2nd ed. Beijing: Peking University Press, 2005: 262–267. (in Chinese)
- [14] Deng H, Li X L, Qing P, et al. Monodisperse magnetic single-crystal ferrite microspheres[J]. *Angewandte Chemie : International Edition*, 2005, 117(44): 2842–2854.
- [15] Lundqvist M, Sethson I, Jonsson B H. Protein adsorption onto silica nanoparticles: conformational changes depend on the particles' curvature and the protein stability[J]. *Langmuir*, 2004, 20(24): 10639–10647.
- [16] Li D, Teoh W Y, Selomulya C, et al. Flame-sprayed superparamagnetic bare and silica-coated maghemite nanoparticles: synthesis, characterization, and protein adsorption-desorption[J]. *Chemistry of Materials*, 2006, 18(26): 6403–6413.
- [17] Huang J, Zhao R, Wang H, et al. Immobilization of glucose oxidase on  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  magnetic nanoparticles[J]. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(6): 817–821.
- [18] Zhou J, Wang L J, Qiao X Y, et al. Pickering emulsions stabilized by surface-modified  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2012, 367(1): 213–224.
- [19] Galeotti F, Bertini F, Scavia G, et al. A controlled approach to iron oxide nanoparticles functionalization for magnetic polymer brushes[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2011, 360(2): 540–547.
- [20] Fu D Y, Yu M R, Tan T W, et al. Separation, characterization and catalytic properties of Lip2 isoforms from *Candida* sp. 99-125[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009, 56: 115–121.
- [21] Bai W, Yang Y J, Tao X, et al. Immobilization of lipase on aminopropyl-grafted mesoporous silica nanotubes for the resolution of (*R*, *S*)-1-phenylethanol[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2012, 76: 82–88.

## Lipase immobilized on superparamagnetic hollow sub-microspheres of $\text{Fe}_3\text{O}_4$

LIU ChangXia LIU ManLi ZHANG YaNan TAN TianWei

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

**Abstract:** Superparamagnetic hollow sub-microspheres of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (HMSF) with an average particle size of 350 nm were synthesized via a hydrothermal method, and then coated by  $\text{SiO}_2$  (HMSF@ $\text{SiO}_2$ ) or modified by aminosilanes (AHMSF). Scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and vibrating sample magnetometry (VSM) were used to characterize the as-prepared samples. Lipases from *Candida* sp 99-125 were immobilized on HMSF, HMSF@ $\text{SiO}_2$  and AHMSF. The amount and specific activity of immobilized lipases on HMSF@ $\text{SiO}_2$  and AHMSF were well above that on bare HMSF, and AHMSF showed the best immobilization effect under the optimized conditions of pH 6, temperature of 25 °C, and immobilization time of 22 h. Compared with bare HMSF, the amount of immobilized lipase was increased 3.2 times for HMSF@ $\text{SiO}_2$  and 4.0 times for AHMSF and the specific activities were improved 2.9 times for HMSF@ $\text{SiO}_2$  and 3.4 times for AHMSF.

**Key words:** superparamagnetic; sub-microspheres of  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ; silica coated; amino modified; lipase; immobilized