

نانوذرات مغناطیسی: ساخت، تثبیت آنزیم و تولید انرژی سبز

پروانه اسمعیل نژاد اهرنجانی^{*1}

¹استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

Email: esmaeilnejadp@gmail.com

چکیده

نانوذرات مگنتیت با ارائه خواص مغناطیسی منحصر به فرد، برای کاربردهای متنوعی مانند کاتالیزورها، سنسورها، انتقال دارو، شناسایی سلول یا بافت و درمان حرارتی همواره مورد توجه بوده‌اند. در این میان، تثبیت آنزیم بر روی این نوع جامدات به منظور حفظ فعالیت آنزیمی و بازیابی سریع و آسان آنها کاربردیترین موضوع بوده است. اما باید توجه نمود مشکلات فیزیکی و شیمیایی ذرات مگنتیت مانع از کاربرد وسیع آنها می‌شود، بنابراین ترکیب نانوذرات مغناطیسی با سیلیکا و یا پلیمر برای توسعه‌ی مواد کامپوزیت با خصوصیات سطحی ویژه‌ی جدید مورد مطالعه قرار میگیرند. گزارش‌های مختلفی در رابطه با ساخت ذرات کامپوزیت سیلیکا و/یا پلیمر مغناطیسی و کاربرد آنها برای تثبیت آنزیم ارائه شده‌است. مطالعه ساختارهای هسته-پوسته مغناطیسی گزارش شده در منابع مختلف شامل ذرات مگنتیت در مرکز و پوسته‌ای ساخته شده از سیلیکای غیرمتخلخل، ترکیب سیلیکای غیرمتخلخل و سیلیکای متخلخل، سیلیکای متخلخل و ترکیب سیلیکا و پلیمر در انتخاب و طراحی ساختار مغناطیسی مناسب برای تثبیت آنزیم با مقدار بارگذاری بالا و حفظ فعالیت و پایداری آنزیمی بالا به پژوهشگران کمک خواهد نمود. همچنین با مطالعه یکی از کاربردهای مهم آنزیم‌های تثبیت شده یعنی در واکنش‌های ترانس استریفیکاسیون جهت تولید بیودیزل، عوامل تاثیرگذار بر بازدهی تولید این فرآیندها بیان شده‌است.

واژگان کلیدی: نانوذرات مغناطیسی، سیلیکا، پلیمر، تثبیت آنزیم، بیودیزل

Magnetic Nanoparticles: Preparation, Enzyme Immobilization and Green Energy Production

Parvaneh Esmaeilnejad-Ahramjani^{1*}

¹Assistant professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Email: esmaeilnejadp@gmail.com

Abstract

Magnetite nanoparticles with a unique magnetic characteristics have been always considered to be practical in various fields such as catalysts, sensors, drug delivery, cells and tissue identification, and thermal therapy. Amongst these applications, enzyme immobilization on such solid materials is of an important utilization in order to the preservation of enzymatic activity and easy recovery of enzymes. However, some physico-chemical properties of magnetite particles act as a barrier for their widely application, hence the combination of magnetic nanoparticles with silica and polymers are studied to produce composite materials with specific surface properties. A wide range of scientific studies have been reported on the synthesis of silica or polymer magnetic nanocomposite particles and their application for enzyme immobilization. Studying the core-shell magnetic structures reported in the literature including a core of magnetite particles and a shell of whether nonporous silica, porous silica, combined nonporous and porous silica, or combined silica and polymer could be helpful for researchers in the selection and design of an appropriate magnetic structure for enzyme immobilization with high loading capacity, activity and stability. Furthermore, studying one of the important applications of immobilized enzymes, *i.e.*, biodiesel production through enzymatic transesterification reactions, would illustrate the parameters of such a process highly influencing production yield.

Keywords: Magnetic nanoparticles, Silica, Polymer, Enzyme immobilization, Biodiesel

مقدمه

از جمله کاربردهای مهم نانوزیست کاتالیزورها (آنزیم‌های تثبیت‌شده بر روی نانوذرات) در فرآیندهای تولید سوخت-زیستی است. با کاهش منابع سوخت فسیلی و افزایش نگرانی-ها در مورد آلودگی‌های حاصل از احتراق این سوخت‌ها، نیاز به سوخت‌های تجدیدپذیر و زیست‌دوست افزایش یافته است. سوخت بیودیزل، حاصل از فرآیند ترانس‌استریفیکاسیون روغن‌های گیاهی یا چربی‌های حیوانی، جایگزین مناسبی به جای سوخت‌های فسیلی است. روش‌های مرسوم تولید این سوخت از طریق کاتالیزورهای شیمیایی دارای معایب بسیار زیادی از لحاظ مصرف انرژی بالای فرآیند و آلودگی‌های ناشی از آن است. با استفاده از نانوزیست کاتالیزورها، فرآیند تولید سوخت بیودیزل پاک‌تر و شرایط عملیاتی ملایم‌تر میشود و با امکان بازیافت زیست کاتالیزور و استفاده‌ی مجدد آن، هزینه‌های فرآیند کاهش می‌یابد [10 و 11].

در این مقاله ابتدا مروری بر مطالعه‌های علمی در رابطه با ساخت ذرات با ساختار هسته-پوسته ذرات اکسید آهن پوشیده‌شده با لایه‌ی سیلیکا، لایه‌ی پلیمر و یا ترکیب دو لایه‌ی سیلیکا-پلیمر ارائه شده است. سپس مطالعه‌های صورت گرفته در رابطه با تثبیت آنزیم بر روی ذرات مغناطیسی و تولید بیودیزل با استفاده از آنزیم‌های تثبیت شده بر روی نانوذرات مختلف گزارش شده است.

ذرات با ساختار هسته-پوسته سیلیکای غیرمتخلخل مغناطیسی

از جمله ساختارهای هسته-پوسته ذرات مگنتیت پوشیده‌شده با سیلیکای غیرمتخلخل توسط هوو و همکارانش [12] گزارش شد. در این تحقیق، ذرات مگنتیت تهیه شده با روش هم‌رسوبی دارای اندازه و مغناطش اشباع به ترتیب برابر با 15 نانومتر و 70 واحد الکترومگنتیک بر گرم بود. لایه‌ی سیلیکا با روش استوبر بر روی ذرات مگنتیت با تعداد کنترل نشده در هسته ذرات، شکل گرفت. اندازه نهایی ذرات کامپوزیت در محدوده 75-150 نانومتر و مغناطش اشباع آنها در محدوده 3-10 واحد الکترومگنتیک بر گرم متغیر بود. نتیجه مهم این

هزینه‌ی بالای آنزیم، پایداری عملیاتی کوتاه مدت و بازیابی دشوار آنزیم‌ها به عنوان محدودیت بزرگ در استفاده‌ی گسترده آنها در صنایع مختلف شیمیایی، غذایی، دارویی و سوخت‌های زیستی¹ است [1 و 2]. این مشکلات با پایدار-ساختن آنزیم‌ها توسط تثبیت کردن بر روی حامل جامد تا حدودی قابل حل است [3-5]. از میان مواد مختلف آلی یا معدنی، طبیعی و یا مصنوعی، ذرات مغناطیسی و به ویژه نانو-ذرات مگنتیت (Fe_3O_4) پایه‌ی مناسبی برای تثبیت آنزیم به شمار می‌روند. ساخت سریع و کم هزینه‌ی این ذرات، غیر-سمی بودن، قابلیت عامل‌دار شدن با دیگر مواد آلی یا معدنی و جداسازی سریع آنها تحت میدان مغناطیسی از مزایای این ذرات است [2، 5، 6]. در مقابل، ظرفیت بارگذاری این ذرات برای تثبیت مولکول‌های زیستی مانند آنزیم کم است و از طرف دیگر، عدم پخش مناسب این ذرات و تمایل این ذرات به کلوخه شدن باعث تغییر ساختار آنزیم تثبیت شده و کاهش فعالیت کاتالیزوری آنزیم می‌شود. بنابراین، اصلاح سطح همزمان و یا بعد از ساخت یک مرحله مهم است. پوشش‌دهی این ذرات با لایه‌ی سیلیکا (SiO_2) بنا به ویژگی‌های مفید این ماده که یک سطح بی‌اثر شیمیایی و سازگار با بسیاری از مواد و مولکول‌ها برای اتصال مواد زیستی و قابل استفاده در سامانه‌های زیستی است، مورد توجه بوده است [6 و 7]. همچنین با ساخت لایه‌ی سیلیکای متخلخل، میتوان ظرفیت بارگذاری ذرات برای تثبیت آنزیم افزایش داد ولی ساخت سیلیکای متخلخل و سپس عامل‌دار کردن آن برای تثبیت آنزیم تقریباً فرآیندی زمان‌بر و پیچیده است. بنابراین، مطالعه‌های اخیر نشان می‌دهد که پوشش‌دهی ذرات با لایه‌ی پلیمر یک روش مناسب برای تغییر ویژگی‌های سطح ذرات است. ذرات کامپوزیت با لایه‌ی پلیمری دارای تعداد جایگاه-های پیوندی زیادی (گروه‌های عاملی) برای جذب فیزیکی و یا پیوند کووالانسی چند نقطه‌ای مولکول‌های آنزیم هستند و در نتیجه ظرفیت بارگذاری بالا برای تثبیت آنزیم فراهم می-کنند [8 و 9].

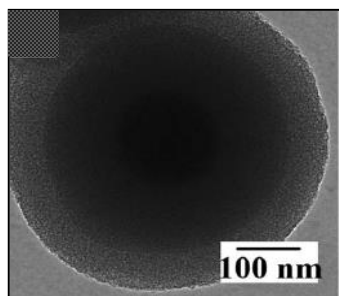
¹ Biofuel

ذرات نهایی در محدوده 7/3-17/6 واحد الکترومگنتیک بر گرم متغیر بود.

ذرات با ساختار هسته-پوسته سیلیکای غیرمتخلخل

مغناطیسی پوشیده‌شده با سیلیکای متخلخل

از جمله ساختارهای نانوکامپوزیت با ساختار هسته-پوسته‌ی ذرات مگنتیت پوشیده‌شده با دو لایه‌ی سیلیکای غیرمتخلخل و سیلیکای متخلخل توسط کلانتری و همکارانش گزارش شده‌است [4]. در آن تحقیق، ابتدا ذرات مگنتیت ساخته شده با روش هم‌رسوبی با روش استور با لایه سیلیکای غیرمتخلخل پوشش داده شد. ذرات نهایی شامل هسته‌ای از کلاستر ذرات مگنتیت با قطر متوسط 130 ± 30 نانومتر و لایه‌ی سیلیکا با ضخامت 90 ± 10 نانومتر بودند (تصاویر میکروسکوپ الکترون عبوری روبشی (STEM)³ در شکل 1). ذرات دارای خاصیت سوپرپارامغناطیسی بودند و مغناطش اشباع ذرات مگنتیت و ذرات نهایی سیلیکای مغناطیسی به ترتیب برابر با 60 و 19 واحد الکترومگنتیک بر گرم بود. در ادامه، این ذرات با لایه‌ی سیلیکای متخلخل از طریق روش حذف الگو با استفاده از عامل فعال‌ساز سطحی ستیل‌تری‌متیل‌آمونیم بروماید (CTAB)⁴، پوشیده شدند [4].



شکل 1- تصاویر STEM ذرات هسته-پوسته کلاستر ذرات مگنتیت در پوسته‌ای از سیلیکای غیرمتخلخل و سیلیکای متخلخل [4].

بود که هنگام ساخت ذرات مگنتیت استفاده از ماده‌ای مانند سیترات سدیم برای پایدارکردن و ممانعت از کلوخه‌شدن ذرات نهایی و توزیع یکنواخت اندازه ذرات ضروری است. گائو و همکارانش [13] با کنترل شرایط واکنش، نانوذرات با ساختار هسته-پوسته سیلیکای غیرمتخلخل مغناطیسی با حضور تک ذره‌ی مگنتیت در هسته را تهیه کردند. برای جلوگیری از تشکیل ذرات سیلیکای بدون مگنتیت و یا تعداد ذرات مگنتیت متفاوت در هسته لازم بود که پارامترهای حاکم بر فرآیند استور برای تشکیل لایه سیلیکا در مرحله‌ی تشکیل هسته (آبکافت) و مرحله‌ی رشد (چگالش) کنترل شوند. نتایج آزمایش‌ها این گروه نشان داد که در سرعت بالای مرحله چگالش نسب به سرعت مرحله آبکافت، سیلیکا تمایل بیشتری به شکل‌گیری دور ذرات مگنتیت را دارد. دمای پایین، pH کمتر، غلظت کم پیش‌ماده‌ی سیلیکا (تترااتیل اورتوسیلیکات (TEOS)²) و آب کمتر در محیط برای افزایش سرعت رشد (مرحله‌ی چگالش) موثر بود. اندازه ذرات مگنتیت و ذرات سیلیکای مغناطیسی بسته به غلظت پیش‌ماده‌ی سیلیکا در طول فرآیند به ترتیب برابر با 20 و 45-110 نانومتر بود. مغناطش اشباع ذرات مگنتیت و سیلیکای مغناطیسی بسته به ضخامت لایه‌ی سیلیکا به ترتیب برابر با 57 و 37-44 واحد الکترومگنتیک بر گرم بود. در تحقیق دیگری، ساخت ذرات سیلیکای غیرمتخلخل مغناطیسی با اندازه‌های کوچکتر از 50 نانومتر، توزیع اندازه‌ی یکنواخت، حضور تک ذره‌ی مغناطیسی در هسته و امکان کنترل ضخامت لایه‌ی سیلیکا با روش میکروامولسیون معکوس ارائه شد [14]. ذرات مگنتیت ساخته شده با روش هیدروترمال دارای اندازه و مغناطش اشباع ذرات مگنتیت به ترتیب برابر با 9/5 نانومتر و 81 واحد الکترومگنتیک بر گرم بود. با کنترل شرایط واکنش در سامانه میکروامولسیون شامل تریتون، هگزانول، آب و سیکلوهاگزان، لایه‌ی سیلیکا با ضخامت‌های متفاوت در محدوده‌ی 5-13 نانومتر ساخته شد. بنابراین مغناطش اشباع

⁴ Cetyltrimethylammonium bromide

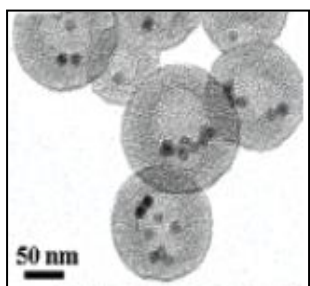
² Tetra Ethyl Ortho Silicat

³ Scanning (transmission) electron microscope

27/3 واحد الکترومگنتیک بر گرم حاصل شد. لازم به ذکر است که با کلسینه کردن ذرات تحت حرارت بالا جهت ایجاد ساختار متخلخل سیلیکا، کلوخه شدن ذرات سیلیکای مغناطیسی غیرقابل اجتناب است که این بر روی پخش مناسب ذرات در محلول‌ها اثر منفی دارد. به علاوه، اگرچه ذرات مگنتیت با اندازه‌ی بزرگ دارای مغناطش اشباع بالایی هستند ولی به خاطر بزرگتر بودن اندازه‌ی تک ذره مگنتیت از اندازه بحرانی (10-15 نانومتر)، دارای خاصیت سوپر پارامغناطیسی نیستند.

ذرات با ساختار هسته-پوسته سیلیکای متخلخل مغناطیسی

کیم و همکارانش [17] نانوذرات سیلیکای متخلخل مغناطیسی با قطر متوسط 50-150 نانومتر را تهیه کردند (تصاویر میکروسکوپ الکترون عبوری (TEM) در شکل 2). واکنش سل-ژل با افزایش ماده‌ی پیش‌ساز سیلیکا (TEOS) به محلول حاوی مقدار کمی اتیل‌استات و ذرات مگنتیت 12 نانومتری و پایدار شده با اسیداولئیک و CTAB انجام شد. با شستشوی ذرات با اتانول، عامل فعال‌ساز سطحی حذف و ساختار متخلخل حاصل شد.



شکل 2- تصاویر TEM ذرات هسته-پوسته سیلیکای مغناطیسی [17].

بنابراین CTAB نه تنها به پایدار شدن ذرات آبریز مگنتیت در محلول آبی کمک میکند، همچنین به عنوان الگوی آلی برای ایجاد ساختار سیلیکای متخلخل است. سطح ویژه و اندازه‌ی تخلخل این ذرات به ترتیب برابر با 720 مترمربع بر

ذرات نهایی با خاصیت سوپر پارامغناطیسی دارای اندازه، مساحت ویژه، اندازه تخلخل، حجم تخلخل و مغناطش اشباع به ترتیب برابر با 450 ± 50 نانومتر، 168 مترمربع بر گرم، 2/44 نانومتر، 0/158 سانتی‌مترمکعب بر گرم و 13 واحد الکترومگنتیک بر گرم بودند. دنگ و همکارانش [15]، ساختار هسته-پوسته ذرات مگنتیت پوشیده شده با دو لایه‌ی سیلیکای غیرمتخلخل و سیلیکای متخلخل را با استفاده از روش سل-ژل ارائه کردند. در این تحقیق، با پوشش دهی لایه-ی سیلیکای غیرمتخلخل با ضخامت 10 نانومتر از طریق روش استور بر روی ذرات مگنتیت تهیه شده از طریق واکنش هیدروترمال ذرات اولیه ساخته شدند. در ادامه با استفاده از عامل فعال‌ساز سطحی CTAB و پیش‌ماده‌ی سیلیکا، لایه‌ی از CTAB/سیلیکا بر روی ذرات سیلیکای غیرمتخلخل مغناطیسی شکل گرفت. در نهایت CTAB با شستشوی ذرات توسط استون حذف شد و میکرو ذرات سیلیکای متخلخل مغناطیسی با ضخامت متوسط لایه‌ی سیلیکای متخلخل برابر با 70 نانومتر حاصل شد. اگرچه ذرات مغناطیسی نهایی دارای مغناطش اشباع بسیار بالا (53 واحد الکترومگنتیک بر گرم) بودند ولی خاصیت سوپر پارامغناطیسی نداشتند. سطح ویژه و حجم تخلخل این ذرات به ترتیب برابر با 365 مترمربع بر گرم و 0/29 سانتی‌مترمکعب بر گرم بود.

شی و همکارانش [16] یک روش ساخت چند مرحله‌ای برای حصول ذرات سیلیکای مغناطیسی را بیان کردند. ذرات هماتیت ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) با پخش خوب در آب، ابتدا با لایه‌ی سیلیکای غیرمتخلخل با روش استور پوشیده شدند. ذرات حاصل شده با یک لایه‌ی ترکیبی آلی-معدنی با استفاده از TEOS و اوکتادسیل‌تری‌متوکسی‌سیلان⁵ از طریق فرآیند سل-ژل پوشیده شدند. با کلسینه کردن ذرات، لایه سیلیکای متخلخل شکل گرفت. سپس تحت دمای بالا و مخلوط گاز نیتروژن و هیدروژن، ذرات هماتیت در هسته به ساختار مگنتیت احیا شدند. در نتیجه ذرات سیلیکای مغناطیسی با قطر متوسط 270 نانومتر، سطح ویژه 273 مترمربع بر گرم، اندازه تخلخل برابر با 3/8 نانومتر و مغناطش اشباع برابر با

⁶ Transmission electron microscopy

⁵ n-Octadecyltrimethoxysilane (C18TMS)

یک روش پسا-بارگذاری^۷ مناسبتری را گزارش کردند. ابتدا ذرات سیلیکای متخلخل با قطر متوسط 650 نانومتر و اندازه تخلخل برابر با 2/5 نانومتر را ساختند. سپس ذرات سیلیکا با محلول الکل فورفوریل و پیش‌ماده‌ی آهن (فروسن کربالدهید) اشباع شدند و پلیمریزاسیون درجا^۸ اتفاق افتاد. بعد از کلسینه کردن، ذرات با مغناطش اشباع برابر با 6/2 واحد الکترومگنتیک بر گرم و سطح ویژه بسیار کم (حدود 10 متر-مربع بر گرم) حاصل شد. اگرچه روش پسا-بارگذاری دارای فوایدی مانند حصول ذرات با شکل مناسب و توزیع اندازی یکنواخت بهتر نسبت به ذرات حاصله با روش سل-ژل است، از جمله مضرات این روش (پسا-بارگذاری) مربوط به انسداد تخلخل‌ها با ذرات مغناطیسی است که موجب کاهش حجم تخلخل، سطح ویژه و دسترسی به تخلخل‌ها می‌شود. بنابراین دستیابی به بارگذاری زیاد ذرات مغناطیسی جهت تولید ذرات نهایی با مغناطش اشباع بالا بسیار دشوار خواهد بود. همچنین، به خاطر پخش ذرات مغناطیسی در میان تخلخل‌ها و دسترسی راحت به این ذرات، امکان از بین رفتن این ذرات در محلولهای اسیدی و کاهش خاصیت مغناطیسی آنها وجود دارد.

ذرات با ساختار هسته-پوسته سیلیکای مغناطیسی پوشیده شده با پلیمر

اسمعیل‌نژاد و همکارانش نانوکامپوزیت‌های سیلیکای مغناطیسی پوشیده شده با پلیمر از طریق اتصال کووالانسی پلی‌اتیلن‌ایمین (PEI)^۹ و پلی‌آکرلیک اسید (PAA)^{۱۰} بر روی سطح ذرات مگنتیت-سیلیکا با ساختار هسته-پوسته ساختند (شکل 3) [23و22]. اندازه نانوذرات مگنتیت 7/8 نانومتری با مغناطش اشباع 60 واحد الکترومگنتیک بر گرم با پوشش دهی لایه‌ی سیلیکا، یک ساختار هسته-پوسته با قطر متوسط 210 نانومتر شامل خوشه‌ای از ذرات مگنتیت با قطر متوسط 130 نانومتر به عنوان هسته و لایه‌ی سیلیکا با ضخامت متوسط 40 نانومتر با مغناطش اشباع نهایی 24

گرم و 4 نانومتر بودند. ذرات ساخته شده با مغناطش اشباع 2 واحد الکترومگنتیک بر گرم دارای خاصیت سوپر پارامغناطیسی بود. سانچز و همکارانش [18] یک روش خشک کن اسپری برای ساخت میکروذرات سیلیکای متخلخل مغناطیسی را ارائه کردند. در این روش، نانوذرات $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ در محلول اتانول شامل آب و عامل فعال ساز سطحی پخش شدند و سپس پیش‌ماده‌ی سیلیکا تحت همزدن به محلول اضافه شد. سل حاصل شده وارد خشک کن اسپری شد و میکرو ذرات ساخته شدند. عامل فعال ساز سطحی با شستشو توسط اتانول و یا کلسینه کردن خارج شد. ذرات نهایی دارای توزیع اندازه وسیع بین 1 تا 5 میکرومتر، اندازه تخلخل بین 2/3 تا 8 نانومتر و خاصیت سوپر پارا مغناطیسی با مغناطش اشباع بالا همانند ذرات مگنتیت (40 واحد الکترومگنتیک بر گرم) بودند. روش خشک کن اسپری یک روش ساده برای ساخت میکروذرات سیلیکای مغناطیسی می‌تواند باشد، ولی با توجه به دشوار بودن کنترل دینامیک تشکیل آبروسل، ساخت ذرات هم‌اندازه با پخش مناسب ذرات مگنتیت در هسته و شکل-گیری مناسب لایه‌ی سیلیکا امکان پذیر نمی‌باشد [19].

تارتاج و همکارانش [20] یک روش بر مبنای تلقیح را برای ساخت کامپوزیت سیلیکای متخلخل مغناطیسی ارائه دادند. در ابتدا ذرات سیلیکای متخلخل در محلول نمک نیترات آهن غوطه ور شدند، و پودر آهن-سیلیکای حاصل شده به آهستگی با اتیلن گلیکول احیاکننده اشباع شدند و نهایتاً آهن بارگذاری شده در تخلخل‌ها با حرارت دهی در دمای 450 درجه سلسیوس و تحت نیتروژن احیا شد. در مقایسه با ذرات سیلیکا با سطح ویژه برابر با 690 مترمربع بر گرم و حجم تخلخل برابر با 1/21 مترمکعب بر گرم، ذرات سیلیکای مغناطیسی دارای سطح و حجم تخلخل کوچکتر (به ترتیب 330 مترمربع بر گرم و 0/56 مترمکعب بر گرم) بودند. معمولاً در روش تلقیح با یون‌های آهن، اجتناب از تشکیل نانوذرات مغناطیسی بر روی سطح ذرات سیلیکای متخلخل دشوار می‌باشد. برای غلبه بر این مشکل، کاکامورا و همکارانش [21]

⁹ Polyethylenimine

¹⁰ Polyacrylic acid

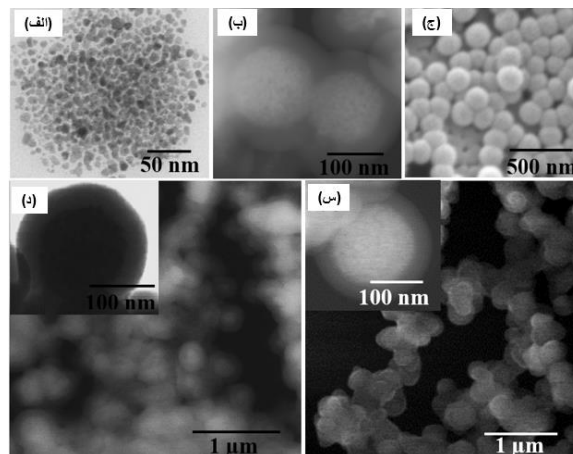
⁷ Post-loading

⁸ In-situ polymerization

آمینوپروپیل)-N اتیل کربودی‌ایمید^{۱۲} با پیوند کووالانسی بر روی ذرات پوشش‌یافت. تفاوت ناچیز اندازه و مغناطش اشباع کامپوزیت نهایی با اندازه ذرات سیلیکای مغناطیسی شاید مربوط به مقدار کم لایه پلیمری (4٪ جرمی) بود. در کار دیگری، ذرات سیلیکای مغناطیسی پوشیده‌شده با لایه‌ی PEI توسط وایئو و همکارانش [25] معرفی شد. ذرات سیلیکای متخلخل ساخته شده با روش حذف الگو در محلول استیل‌استونیت آهن پخش شدند و در ادامه با حذف حلال و حرارت‌دهی ذرات، ذرات مگنتیت بر سطح و در میان تخلخل-های سیلیکا با روش تجزیه حرارتی ساخته شدند. برای پوشش‌دهی ذرات با لایه‌ی پلیمری، ذرات سیلیکای مغناطیسی در محلول حاوی PEI با وزن مولکولی‌های مختلف پخش شدند و بنابراین با جذب فیزیکی بر سطح ذرات پوشیده‌شدند. اندازه ذرات کروی سیلیکای متخلخل برابر با 300 نانومتر بود و ذرات مگنتیت با اندازه‌ی در محدوده 30-60 نانومتر متشکل از ذرات 8 نانومتری چسبیده به هم بر سطح ذرات شکل گرفتند. بنابراین ساختار کروی ذرات سیلیکا بعد از فرآیند تلقیح حفظ نشد. با توجه به اندازه تخلخل 4 نانومتر، ذرات کلوخه‌شده مگنتیت بر روی سطح ذرات سیلیکا شکل گرفتند. مغناطش اشباع ذرات نهایی برابر با 6/2 واحد الکترومگنتیک بر گرم بود.

نانوذرات سوپراپارامغناطیس پوشیده‌شده با لایه‌ی سیلیکا و سپس پلیمری با اندازه‌ی کنترل‌شده‌ی تقریباً برابر با 30 نانومتر و شامل تک ذره مگنتیت با اندازه 6 نانومتر در هسته توسط لین و همکارش [26] ساخته شد. نانوذرات مگنتیت با روش هیدروترمال ساخته‌شدند و سپس لایه‌ی سیلیکای غیر-متخلخل با روش استوبر بر سطح هر تک ذره پوشیده‌شد. در ادامه با پلیمریزاسیون مونومرهای نرمال‌ایزوپروپیل‌آکریل-آمید^{۱۳}، لایه‌ی پلیمری بر روی سطح ذرات شکل گرفت. ذرات سیلیکای مغناطیسی و ذرات پوشیده‌شده با لایه‌ی پلیمری دارای مغناطش اشباع نسبتاً کم و به ترتیب 3/1 و 2/5 واحد الکترومگنتیک بر گرم بودند. به‌طور مشابه، هوانگ و

واحد الکترومگنتیک بر گرم شکل گرفت. ضخامت لایه‌ی پلیمری روی ذرات در حدود 2 نانومتر و مغناطش اشباع نهایی ذرات برابر با 23 واحد الکترومگنتیک بر گرم بود. مقدار مغناطش اشباع کمتر برای ذرات نانوکامپوزیت در مقایسه با ذرات مگنتیت به خاطر حضور لایه‌ی غیرمغناطیسی سیلیکا است.



شکل 3- تصاویر STEM ذرات (الف) مگنتیت، (ب و ج) مگنتیت سیلیکا، (د) مگنتیت سیلیکا پوشیده شده با PAA (س) مگنتیت سیلیکا پوشیده شده با PEI [23و24].

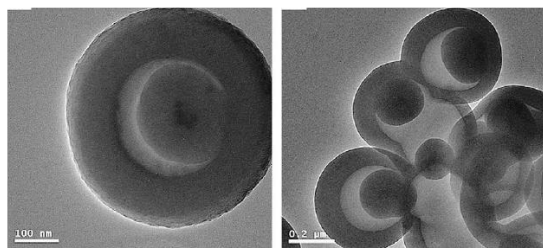
وانگ و همکارانش [24] ذرات سیلیکای مغناطیسی پوشیده-شده با PAA را گزارش کردند. ذرات مگنتیت با استفاده از افزایش نمک سولفات آهن به محلول حاوی هیدروکسید-پتاسیم و نیترات پتاسیم تحت حرارت 90 درجه سلسیوس با اندازه 260 نانومتر و مغناطش اشباع برابر با 71 واحد الکترومگنتیک بر گرم ساخته شدند. لایه‌ی سیلیکای غیر-متخلخل با ضخامت‌های مختلف 25 تا 100 نانومتر و در نتیجه مغناطش اشباع متغیر 47 تا 34 واحد الکترومگنتیک بر گرم با استفاده از روش استوبر بر روی ذرات تشکیل یافت. سپس این ذرات با گروه‌های آمین توسط ماده‌ی پیش‌ساز ماده آمینواتیل‌تری‌اتوکسی‌سیلان^{۱۱} عامل‌دار شد و در ادامه پلی-آلکریلیک‌اسید با استفاده از واکنشگر N-(3-دی‌متیل

¹³ n-Isopropyl acrylamide (NIPAM)

¹¹ Aminoethyltrimethoxysilane

¹² N-(3-dimethyl aminopropyl)-N ethyl carbodiimide (EDC)

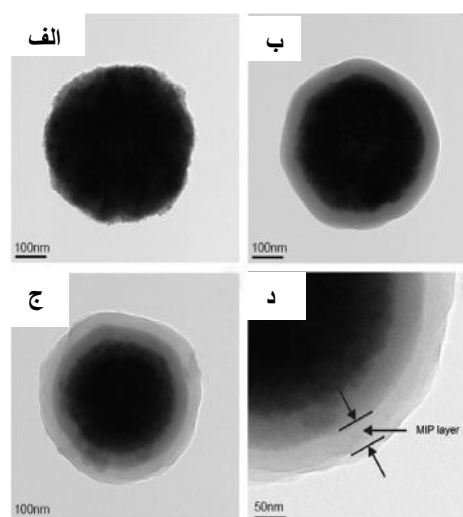
پروپیل متاکریلات پتاسیم بر سطح ذرات پوشش داده‌شد. اندازه ذرات مگنتیت، ضخامت لایه سیلیکای و ضخامت لایه پلیمری به ترتیب 355، 55 و 42 نانومتر بود. همچنین، مغناطش اشباع ذرات مگنتیت، سیلیکای مغناطیسی و سیلیکای مغناطیسی پوشیده‌شده با پلیمر به ترتیب برابر با 69، 31 و 15 واحد الکترومگنتیک بر گرم بود. میکرو ذرات توخالی پلی(N-N'-متیلن‌بی‌ساکریل‌آمید)¹⁶ متاکریلیک‌اسید¹⁷ با هسته سیلیکای مغناطیسی متحرک با استفاده از حذف لایه میانی پلی‌متاکریلیک‌اسید¹⁸ از ساختار ذرات مگنتیت پوشیده‌شده با سه لایه سیلیکای، PMAA و P(MBAA+MAA)، توسط یانگ و همکارانش [29] گزارش شد (شکل 5). ذرات مگنتیت 10 نانومتری پوشش یافته با لایه سیلیکای با ضخامت 80 نانومتر دارای اندازه و مغناطش اشباع به ترتیب 214 نانومتر و 3/7 واحد الکترومگنتیک بر گرم بود.



شکل 5- تصاویر TEM ذرات توخالی P(MBAA-co-MAA) با هسته‌ی متحرک سیلیکای مغناطیسی [29].

لایه‌ی پلیمری PMAA با روش پلیمریزاسیون رسوبی مونومرهای متاکریلیک‌اسید بر سطح ذرات سیلیکای مغناطیسی شکل گرفت. در ادامه لایه‌ی نهایی پلیمر ترکیبی با ضخامت‌های متفاوت بین 35 تا 159 نانومتر با روش پلیمریزاسیون رسوبی و همزمان دو مونومر بر سطح ذرات مگنتیت پوشیده‌شده با سیلیکای و PMAA (به عنوان هسته) پوشیده شد. جهت حذف لایه‌ی پلیمر میانی PMAA و حصول ساختار توخالی، ذرات نهایی در محلول آب و اتانول

همکارانش [27] ذرات مگنتیت را با روش هیدروترمال ساختند و سپس این ذرات با لایه‌ی سیلیکای غیرمتخلخل با روش استوبر پوشانده شدند. ترکیبی از مونومرهای اتیلن-گلیکول و آکریلیک‌اسید با پلیمریزاسیون انتقال زنجیر برگشت‌پذیر افزایش-تجزیه‌ای¹⁴ بر روی سطح ذرات سیلیکای مغناطیسی پوشانده‌شده (شکل 4)، اندازه‌ی میانگین ذرات مگنتیت برابر با 400 نانومتر بود. ضخامت لایه‌ی سیلیکای لایه‌ی پلیمری به ترتیب تقریباً 40 و 50 نانومتر بود. مغناطش اشباع ذرات مگنتیت، سیلیکای مغناطیسی و ذرات کامپوزیت پوشیده‌شده با پلیمر به ترتیب برابر با 68، 44 و 22 واحد الکترومگنتیک بر گرم بود.



شکل 4- تصاویر TEM ذرات (الف) مگنتیت، (ب) مگنتیت پوشیده‌شده با سیلیکای، (ج) مگنتیت پوشیده‌شده با دو لایه سیلیکای و پلیمر و (د) لایه‌ی پلیمر [27].

وانگ و همکارانش [28] ذرات سیلیکای مغناطیسی پوشیده‌شده با لایه‌ی پلیمری پلی‌سولفوپروپیل متاکریلات پتاسیم¹⁵ برای جذب آب جهت جداسازی آن در سامانه‌هایی مانند سامانه‌ی نفتی حاوی آب را گزارش کردند. ذرات مگنتیت با روش هیدروترمال ساخته‌شد و سپس سیلیکای با روش استوبر بر سطح ذرات پوشش‌یافت. در ادامه، مونومرهای سولفو

¹⁶ N-N'-methylenebisacryl amid (MBAA)

¹⁷ Methacrylic acid (MAA)

¹⁸ Poly methacrylic acid (PMAA)

¹⁴ Reversible addition-fragmentation chain-transfer polymerization (RAFT)

¹⁵ Poly sulfopropyl methacrylate potassium (PSPMA)

شدت کلوخه شدند. وانگ و همکارانش [30] نانوکپسول‌های با ساختار زرده‌ی تخم‌مرغ-پوسته¹⁹ سیلیکای مغناطیسی پوشیده‌شده با PEI را گزارش کردند. تفاوت ساختار زرده‌ی تخم‌مرغ-پوسته با ساختار هسته-پوسته مربوط به متحرک-بودن ذره مگنتیت در میان پوسته‌ی سیلیکا است. در این تحقیق، با پوششدهی ذرات مگنتیت (25 نانومتر) ساخته‌شده با روش هیدروترمال با سیلیکا، ذرات هسته-پوسته‌ی سیلیکای مغناطیسی با اندازه 63 ± 2 نانومتر حاصل شد. سپس این ذرات وارد محلول PEI شد و این مولکول‌های پلیمری با جذب الکترواستاتیکی بر سطح ذرات سیلیکای مغناطیسی پوشیده‌شده‌اند. ذرات نهایی سیلیکای مغناطیسی پوشیده‌شده با PEI در داخل آب تا دمای 50 درجه سلسیوس حرارت داده‌شدند تا اینکه ذرات با ساختار زرده-تخم‌مرغ-پوسته حاصل شد. با تغییر ساختار ذرات سیلیکای مغناطیسی پوشیده با PEI از حالت هسته-پوسته به زرده‌ی تخم‌مرغ-پوسته، مغناطش اشباع از 13 به 19 واحد الکترومگنتیک بر گرم افزایش یافت.

شدت کلوخه شدند. در تحقیق یانگ و همکارانش [32]، ذرات مگنتیت با ترکیبی از روش هم‌رسوبی و هیدروترمال با اندازه‌ی 50 نانومتر و مغناطش اشباع برابر با 68 واحد الکترومگنتیک بر گرم ساخته شدند. سپس ذرات مگنتیت در محیط قلیایی پخش شد و همگام با حرارت‌دهی، محلول PEI به مخلوط ذرات اضافه شد و در نتیجه لایه‌ای از PEI با ضخامت 2 نانومتر بر روی سطح ذرات مگنتیت تشکیل شد. مغناطش اشباع این ذرات هسته-پوسته برابر با 57 واحد الکترومگنتیک بر گرم بود. لی و همکارانش [33] ذرات سوپرپارامگناطیس مگنتیت ساخته‌شده با روش هم‌رسوبی و سپس پوشیده‌شده با لایه‌ی پلیمری حاصل از پلیمریزاسیون مونومرهای متاکریلات²¹ و متاکریل‌اوکسی‌اتیل تری‌متیل‌آمونیم کلراید²² را ارائه کردند. اندازه و مغناطش اشباع نانوذرات مگنتیت به ترتیب برابر با 20 نانومتر و 45 واحد الکترومگنتیک بر گرم بود. با پوشش لایه‌ی پلیمری، ذرات با شکل‌های متفاوت و کنترل‌نشده با اندازه‌های 200-400 نانومتر و مغناطش اشباع برابر با 27 واحد الکترومگنتیک بر گرم تولید شد.

تثبیت آنزیم بر روی ذرات مغناطیسی

اسمعیل نژاد و همکارانش ذرات سیلیکای مغناطیسی پوشیده شده با پلیمرهای مختلف را که ساختار آنها در بخش قبلی معرفی شد برای تثبیت آنزیم لیپاز مورد مطالعه قرار دادند [22و23]. نتایج نشان داد که به دلیل حضور تعداد بسیار زیاد جایگاه‌های پیوندی بر روی سطح ذرات پوشیده شده با پلیمر-ها، با استفاده از این ذرات، مقادیر بازدهی تثبیت لیپاز (86-97٪) و ظرفیت بارگذاری بسیار بالاتر (817-786 میلی گرم آنزیم بر گرم ذرات) از مقادیر گزارش شده در منابع علمی دیگر برای ذرات مغناطیسی و یا غیرمغناطیسی حاصل شد. همچنین، فعالیت هیدرولیکی (حدود 1/7-2/2 برابر لیپاز آزاد)، پایداری ساختار آنزیمی، پایداری حرارتی (حفظ حدود 72-85٪ فعالیت)، پایداری ذخیره سازی (حفظ 73-87٪ فعالیت بعد از 20 روز نگه‌داری در 4 درجه سلسیوس)

ذرات با ساختار هسته-پوسته پلیمر مغناطیسی

مهدویان و همکارش [31] ذرات مگنتیت پوشیده‌شده با PAA را گزارش کردند. در این تحقیق ذرات مگنتیت تهیه شده به روش هم‌رسوبی با اندازه 10 نانومتر و مغناطش اشباع 57 واحد الکترومگنتیک بر گرم با استفاده از 3-آمینوپروپیل تری‌اتوکسی‌سیلان²⁰ با گروه‌های آمینی عامل‌دار شدند. در ادامه مونومرهای آکریلیک‌اسید بر سطح ذرات پلیمریزه شدند. درصد جرمی PAA پوشیده‌شده بر روی ذرات مگنتیت برابر با 4٪ بود. اندازه و مغناطش اشباع ذرات کامپوزیت تفاوت چندانی با ذرات مگنتیت نداشت. سولانکی و همکارش [5] ذرات مگنتیت پوشیده‌شده با PEI به روش جذب فیزیکی (الکترواستاتیکی) را گزارش کردند. اندازه نانوذرات مگنتیت و ذرات پوشیده‌شده با PEI برابر با 5 ± 2 نانومتر بود. اگرچه اندازه ذرات متفاوت نبود ولی ذرات پوشیده‌شده با PEI به

²² Methacryloxyethyl trimethylammonium chloride

¹⁹ Yolk-shell structures

²⁰ 3-Aminopropyltriethoxy-silane

²¹ Methacrylate

بیشتری را نسبت به لیپاز آزاد حفظ کردند. با ذخیره‌سازی آنزیم‌ها در دمای 4 درجه سلسیوس و محلول بافر فسفات سدیم با pH 7 به مدت 21 روز، بیشتر از 74٪ از فعالیت اولیه‌ی لیپازهای تثبیت‌شده محفوظ ماند، درحالی‌که لیپازهای آزاد قادر به حفظ فقط 46٪ از فعالیت اولیه بودند. در مطالعه‌ی امکان استفاده‌ی مکرر لیپازهای تثبیت‌شده پس از 6 سیکل متمادی، بیشتر از 65٪ از فعالیت اولیه این لیپازهای تثبیت‌شده محفوظ ماند.

لی و همکارانش [35] ذرات مگنتیت (8-12 نانومتر) با سطح آبگریز را به عنوان پایه‌ای برای تثبیت لیپاز پورسین پانکریس از طریق جذب فیزیکی گزارش کردند. بیشترین ظرفیت بارگذاری این ذرات برابر با 57 میلی‌گرم آنزیم به ازای یک گرم از ذرات بود. فعالیت ویژه لیپاز آزاد و تثبیت‌شده به ترتیب برابر با 6/37 و 7/72 واحد فعالیت بر میلی‌گرم بود. لیپازهای تثبیت‌شده فعالیت و مقاومت بیشتری را نسبت به لیپاز آزاد نسبت به تغییرات دما و pH محیط واکنش نشان دادند. لیپازهای تثبیت‌شده پس از 6 مرحله بازیافت و استفاده‌ی متمادی در واکنش‌های آبکافت با دماهای 37 و 50 درجه سلسیوس به ترتیب 50٪ و 45٪ از فعالیت اولیه‌شان را حفظ کردند. کوئو و همکارانش [36] در تثبیت کووالانسی آنزیم لیپاز کاندیدا/روگوسا²⁵ بر روی ذرات مگنتیت-کیتوسان (30 نانومتر)، بازده تثبیت آنزیم و ظرفیت بارگذاری برابر با 100٪ و 700 میلی‌گرم لیپاز به ازای یک گرم از ذرات را گزارش کردند. فعالیت ویژه‌ی لیپازهای تثبیت‌شده تقریباً 87٪ فعالیت ویژه‌ی لیپاز آزاد بود. بیشترین فعالیت هیدرولیکی لیپاز تثبیت‌شده و لیپاز آزاد در pH 7 و به ترتیب در دمای 40 و 30 درجه سلسیوس به دست آمد. بعد از 13 روز نگهداری آنزیم‌ها در دمای 25 درجه سلسیوس در محلول بافر فسفات سدیم با pH 7، بر خلاف لیپازهای تثبیت‌شده که هیچگونه کاهش فعالیت نداشتند، لیپازهای آزاد فقط 20٪ فعالیت اولیه را حفظ کرده بودند. لی و همکارانش [37] میکروذرات مغناطیسی (300-500 نانومتر) تهیه‌شده با

و عملیاتی لیپازهای تثبیت‌شده بسیار بالاتر از لیپاز آزاد و به صورت معکوس با وزن مولکولی پلیمرها در ارتباط بود. مطالعه‌ی ساختار مولکول‌های لیپاز با فعالیت هیدرولیکی آنها نشان داد که ارتباط مستقیمی بین افزایش فعالیت لیپازهای تثبیت‌شده در دماهای بالا و افزایش مقدار صفحه‌های بتا در ساختار آنها وجود دارد.

در مطالعه‌ای توسط گروه کلانتری، ذرات سیلیکای متخلخل مغناطیسی که ویژگی آنها در بخش قبلی بررسی شد، برای تثبیت آنزیم لیپاز سودوموناس سپاسیا²³ به کار گرفته شدند [4]. بازده تثبیت برابر با 49٪ و 62٪ و در نتیجه ظرفیت بارگذاری برابر با 490 و 620 میلی‌گرم لیپاز به ازای یک گرم به ترتیب برای ذرات سیلیکای غیرمتخلخل مغناطیسی و سیلیکای غیرمتخلخل مغناطیسی پوشیده‌شده با سیلیکای متخلخل حاصل شد. با مطالعه‌ی خاصیت کاتالیزوری آنزیم‌ها در واکنش آبکافت 4-نیتروفنیل پالمیتات، لیپازهای تثبیت‌شده حدود 87٪-91٪ از فعالیت حالت طبیعی (لیپاز آزاد) را حفظ کردند. دما و pH بهینه برای بیشترین فعالیت همگی لیپازهای تثبیت‌شده یکسان و به ترتیب 45 درجه سلسیوس و pH 8 بود. در حالی‌که بیشینه‌ی فعالیت لیپاز آزاد در دمای 40 درجه سلسیوس و pH 7/5 حاصل شد. پایداری حرارتی لیپاز با تثبیت بسیار بهبود یافت، به طوری‌که لیپازهای تثبیت‌شده در حدود 87٪ از فعالیت اولیه‌شان را پس از 10 ساعت ذخیره‌سازی در دمای 40 درجه سلسیوس حفظ کردند، در حالی‌که لیپاز آزاد فقط 40٪ از فعالیت اولیه‌ی خود را نگاه داشت. لیپازهای تثبیت‌شده دارای پایداری عملیاتی خوبی (حفظ 80٪ از فعالیت اولیه) پس از 5 مرتبه بازیافت و استفاده‌ی مکرر بودند. بردبار و همکارانش [34] تثبیت کووالانسی آنزیم لیپاز پورسین پانکریس²⁴ بر سطح ذرات مگنتیت-سیلیکای غیرمتخلخل با اندازه متوسط 18 نانومتر را مطالعه کردند. بیشترین ظرفیت بارگذاری این ذرات برابر با 17 میلی‌گرم لیپاز به ازای یک گرم از نانوذرات بود. در واکنش آبکافت 4-نیتروفنیل پالمیتات، لیپازهای تثبیت‌شده فعالیت

²⁵ Lipase from *Candida rugosa*

²³ Lipase from *Pseudomonas cepacia*

²⁴ Lipase from *Porcin pancreas*

ذرات مگنتیت آمینه‌شده با ماده 3-آمینوپروپیل‌تری‌اتوکسی-سیلان را برای تثبیت کووالانسی لیپاز ترمومیسین لانوگنوسا²⁶ مورد بررسی قرار دادند. بازده تثبیت لیپاز و ظرفیت بارگذاری به ترتیب برابر با 84٪ و 42 میلی‌گرم لیپاز به ازای یک گرم از ذرات کسب شد. با تثبیت کردن لیپاز، حدود 70٪ از فعالیت حالت آزاد آن باقی‌ماند. دما و pH بهینه برای بیشترین فعالیت هیدرولیکی آنزیم به ترتیب از 45 درجه سلسیوس و 7 pH برای لیپاز آزاد به مقادیر بالاتر (50 درجه سلسیوس و 7 pH) برای لیپاز تثبیت‌شده افزایش یافت. لی و همکارانش [33]، با پلیمریزاسیون گلیاسیدیل‌متاکریلات²⁷ و متاکریل‌اکسی‌اتیل تری‌متیل‌آمونیم کلراید بر روی سطح ذرات مگنتیت، ذرات سوپر پارامغناطیسی را برای تثبیت آنزیم لیپاز *کاندیدا روگوسا* از طریق جذب الکترواستاتیکی ارائه نمودند. بازده تثبیت آنزیم و ظرفیت بارگذاری به ترتیب برابر با 47/5٪ و 105 میلی‌گرم لیپاز به ازای یک گرم از ذرات به دست آمد. فعالیت ویژه لیپازهای تثبیت‌شده حدود 70٪ فعالیت ویژه لیپاز آزاد بود. لیپاز تثبیت‌شده دارای بیشترین فعالیت در محدوده‌ی دمای 35-45 درجه سلسیوس بود و با افزایش دما، فعالیت بیشتری را نسبت به لیپاز آزاد حفظ کرد. لیپازهای تثبیت‌شده بیشتر از 70٪ فعالیت اولیه‌شان را پس از 5 مرتبه بازیافت و استفاده‌ی مکرر در سامانه واکنش آبکافت حفظ کردند.

در گزارش دیگری، اکسو و همکارانش [40] ذرات مگنتیت (ساخته‌شده با روش هم‌رسوبی) آمینه‌شده (50 نانومتر) را برای تثبیت کووالانسی لیپاز *سراتیا مارسینسنس*²⁸ به کار بردند. بازده تثبیت آنزیم، ظرفیت بارگذاری و بازیافت فعالیت لیپاز پس از تثبیت نسبت به لیپاز آزاد به ترتیب برابر با 70٪، 35 میلی‌گرم لیپاز به ازای یک گرم از ذرات و 62٪ حاصل شد. بیشترین فعالیت لیپاز آزاد و تثبیت‌شده به ترتیب در دمای 50 و 45 درجه سلسیوس به دست آمد. پس از ذخیره‌سازی آنزیم‌ها در دمای 40 درجه سلسیوس، لیپازهای تثبیت‌شده حدود 65٪ از فعالیت اولیه‌شان را پس از 120

پلیمریزاسیون گلاسیدل متاکریلات، اتیلن‌گلیکول دی-متاکریلات و ونیل‌استات روی ذرات مگنتیت را برای تثبیت کووالانسی لیپاز *کاندیدا روگوسا* مطالعه و گزارش کردند. لیپازهای تثبیت‌شده حدود 64٪ از فعالیت ویژه‌ی اولیه‌ی حالت آزاد را حفظ کردند. بازده تثبیت لیپاز و ظرفیت بارگذاری به ترتیب برابر با 87٪ و 48 میلی‌گرم آنزیم به ازای یک گرم از ذرات به دست آمد. در آزمایش پایدار حرارتی (نگهداری آنزیم‌ها در دمای 50 درجه سلسیوس به مدت 210 دقیقه) حدود 60٪ از فعالیت اولیه لیپازهای تثبیت‌شده حفظ شد، درحالی‌که فعالیت لیپازهای آزاد پس از 150 دقیقه کاملاً از بین رفت. باقیمانده‌ی فعالیت هیدرولیکی لیپازهای تثبیت‌شده پس از 10 سیکل بازیافت و استفاده‌ی متمادی در واکنش آبکافت نسبتاً زیاد (80٪ از فعالیت اولیه) بود.

سولانکی و همکارش [5] تثبیت لیپاز *کاندیدا روگوسا* بر روی ذرات 10 نانومتری مگنتیت، مگنتیت پوشیده‌شده با اسید-اولئیک و مگنتیت پوشیده‌شده با PEI را بررسی کردند. ظرفیت بارگذاری ذرات مگنتیت، مگنتیت پوشیده‌شده با اسید اولئیک و مگنتیت پوشیده‌شده با PEI به ترتیب برابر با 23، 28 و 20 میکروگرم لیپاز به ازای یک گرم از ذرات به دست آمد. فعالیت ویژه‌ی لیپاز تثبیت‌شده بر روی ذرات مگنتیت پوشیده‌شده با PEI تقریباً 2/8 برابر فعالیت ویژه‌ی لیپاز آزاد بود. رن و همکارانش [38]، نانوذرات مگنتیت پوشیده‌شده با پلی‌دوپامین را به عنوان ذرات با بازده تثبیت بالا (85٪) و ظرفیت بارگذاری بالا (429 میلی‌گرم لیپاز به ازای یک گرم از ذرات) برای تثبیت لیپاز *کاندیدا روگوسا* با روش جذب فیزیکی معرفی کردند. لیپازهای تثبیت‌شده حدود 74٪ از فعالیت حالت طبیعی (لیپاز آزاد) را حفظ کردند. در واکنش آبکافت ماده‌ی تری‌بوترین‌استر، مقاومت لیپازهای تثبیت‌شده به تغییر فعالیت با تغییرات دما و pH محیط بیشتر از لیپاز آزاد بود. همچنین، لیپازهای تثبیت‌شده بیشتر از 70٪ از فعالیت اولیه‌شان را پس از 21 بار بازیافت و استفاده‌ی مکرر در واکنش آبکافت حفظ کردند. ایکسی و همکارش [39]

²⁸ Lipase from *Serratia marcescens*

²⁶ Lipase from *Thermomyces lanuginosa*

²⁷ Glycidyl methacrylate

بازدهی تولید بیودیزل برابر با 99٪ بود ولی با بازیافت و استفاده‌ی مکرر آنزیم و در سومین سیکل واکنش، فعالیت آنزیمی به صفر کاهش یافت. با استفاده از استات‌متیل، 2- پروپانول و بوتانول به جای متانول در واکنش، بازدهی تولید بیودیزل در مرحله اول بالای 90٪ بود و با بازیافت و استفاده‌ی مکرر از آنزیم در سامانه واکنش با 2-پروپانول و بوتانول در مرحله پنجم به 11٪ کاهش یافت. با استفاده از استات‌متیل، میزان بازده اولیه پس از 5 مرحله استفاده‌ی مکرر به 93٪ کاهش یافت.

در راستای دانش بر اثر مثبت حلال استات‌متیل در واکنش ترانس‌استریفیکاسیون، تالوکر و همکارانش [44] اثر مخلوط متانول و متیل‌استات را بر بازدهی تولید بیودیزل از روغن نخل با استفاده از لیپاز تثبیت‌شده‌ی تجاری Novozyme 435 بررسی کردند. بازدهی تولید بیودیزل با استفاده از مخلوط متانول و متیل‌استات برابر با 95٪ و با استات‌متیل برابر با 88٪ بود. پس از 10 سیکل بازیافت و استفاده‌ی مکرر آنزیم در واکنش ترانس‌استریفیکاسیون شامل مخلوط متانول و استات‌متیل، هیچگونه کاهش بازدهی تولید بیودیزل مشاهده نشد. اکسی و همکارش [45] لیپاز ترمومیسیس لانوگنوسا تثبیت‌شده بر روی ذرات مگنتیت (10 نانومتر) را در واکنش ترانس‌استریفیکاسیون روغن سویا با متانول به کار بردند. بازدهی تولید بیودیزل برابر با 90٪ بود و پس از 5 مرتبه بازیافت و استفاده‌ی مکرر از لیپاز تثبیت‌شده، بازدهی تولید بیودیزل به 45٪ کاهش یافت. درکاردیگری، اکسی و همکارش [46] تولید بیودیزل از روغن سویا با استفاده از لیپاز کاندیدا روگوسا تثبیت‌شده بر روی ذرات مگنتیت-کیتوسان را مطالعه نمودند. بازدهی تولید بیودیزل بعد از 4 مرحله از 87٪ به 72٪ رسید.

چانگ و همکارانش [47] لیپاز بورخولدریا سپاسیای تثبیت‌شده با روش جذب فیزیکی بر روی ذرات هسته-پوسته‌ی سیلیکای مغناطیسی را برای تولید بیودیزل از روغن زیتون بررسی کردند. بازده بیودیزل برابر با 90٪ در دمای 40 درجه

ساعت حفظ کردند، درحالیکه لیپازهای آزاد در طول زمان 80 دقیقه کاملاً فعالیت خود را از دست دادند. لیپازهای تثبیت‌شده بعد از 11 مرتبه بازیافت و استفاده‌ی مکرر در واکنش آبکافت، نزدیک به 59٪ از فعالیت اولیه خود را حفظ کرد.

تولید بیودیزل با استفاده از آنزیم تثبیت‌شده

کریگر و همکارانش [41] واکنش ترانس‌استریفیکاسیون روغن کستور با استفاده از لیپاز بورخولدریا سپاسیای²⁹ تثبیت‌شده را در سامانه عاری از حلال بررسی کردند. غشای پلیمری Accurel EP 100 به عنوان پایه با ویژگی آگریزی برای تثبیت آنزیم استفاده شد. ظرفیت بارگذاری این ذرات برابر با 45 میلی‌گرم لیپاز به ازای یک گرم از پایه بود. اگرچه سرعت اولیه‌ی واکنش با متانول بیشتر بود و در 24 ساعت اولیه، بازدهی تولید متیل‌استرها بیشتر از بازدهی تولیداتیل‌استرها بود، ولی با گذشت زمان و در 120 ساعت، میزان بازده هر دو نوع واکنش تقریباً یکسان شد (90٪ بازده آلکیل‌استرها). تولید آنزیمی بیودیزل در سامانه‌های عاری از حلال و یا با حلال ایزواکتان با استفاده از لیپاز بورخولدریا سنوسپاسیای³⁰ تثبیت‌شده بر رزین ماکروتخلخل NKA توسط لی و همکارانش [42] گزارش شده‌است. 98٪ بازدهی تولید بیودیزل در حضور ایزواکتان معادل با 50٪ جرمی (نسبت به جرم روغن) گزارش شد. اما در سیستم‌های بدون حلال، بازدهی تولید بیودیزل برابر با 82٪ به دست آمد. کاهش قابل ملاحظه‌ای در فعالیت لیپازهای تثبیت‌شده پس از 50 سیکل در سامانه واکنش شامل حلال ایزواکتان مشاهده نشده بود. هرچند در سامانه‌های عاری از حلال، بازدهی تولید پس از 5 سیکل متمادی به 58٪ کاهش یافت.

امکان استفاده از آنزیم تثبیت‌شده‌ی تجاری Novozyme 435 (لیپازکاندیدا آتارکتیکای³¹ تثبیت‌شده بر روی رزین آکرلیک) برای تولید بیودیزل از روغن آفتابگردان در سامانه بدون حلال توسط جوگوپیچ و همکارانش [43] بررسی شد.

³¹ Lipase from *Candida antarctica*

²⁹ Lipase from *Burkholderia cepacia*

³⁰ Lipase from *Burkholderia cenocepacia*

آبگریزی ذرات استارنیک و آبدوستی ذرات متاکریلیک بود. بنابر ضرورت حضور متانول برای پیشرفت واکنش، لازم است که مقدار متانول در سامانه شامل ذرات آبگریز استارنیک بیشتر باشد تا مقدار متانول مورد نیاز برای فعالیت تامین شود. اسمعیل‌نژاد و همکارانش با در نظر گرفتن شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط واکنش، ساختارهای جدید نانوذرات مغناطیسی پوشیده شده با پلیمر (ساختار و فعالیت آنزیمی آنها بخشهای قبلی ذکر شد) را در واکنش ترانس-استریفیکاسیون روغن‌های گیاهی سویا، آفتابگردان، کلزا و نخل با متانول و اتانول در سامانه‌های عاری از حلال و شامل حلال نرمال هگزان مورد مطالعه قرار دادند [51 و 52]. نتایج نشان داد که انتخاب نوع و اندازه‌ی پلیمر تأثیر مهمی در مقابله با مشکلات ناشی از عدم امتزاج‌پذیری الکل و روغن؛ مقاومت لایه‌ی آب و الکل در برابر نفوذ مولکول‌های روغن و غیرفعال شدن آنزیم با الکل دارد. در شرایط بهینه‌ی واکنش، فعالیت لیپازهای تثبیت شده بر روی ذرات پوشیده شده با PEI بیشتر از ذرات پوشیده شده با PAA بود، به علاوه در مورد PEI با جرم مولکولی بزرگتر و در مورد PAA با جرم مولکولی کوچکتر برای دستیابی به بازده بالا لازم بود. این موضوع مربوط به خاصیت آبگریزی نمونه‌های پوشیده شده با PEI بود که در ایجاد غلظت مناسبی از الکل و روغن در اطراف لیپازهای تثبیت شده و ممانعت از اثر منفی الکل بر فعالیت لیپازها تأثیر مهمی داشت. همچنین در سامانه‌های واکنش با اتانول بازده تولید بیودیزل بیشتر از متانول بود که این به دلیل افزایش امتزاج‌پذیری اتانول و روغن، برقراری غلظت مناسبی از اتانول و روغن در اطراف آنزیم و کاهش اثر سمیت الکل بر فعالیت آنزیم می‌باشد. بازدهی تولید بیودیزل از روغن نخل بیشتر از سه نوع روغن دیگر بود. همچنین، تفاوت قابل توجهی بین بازدهی تولید از روغن‌های سویا، آفتابگردان و کلزا وجود نداشت. با افزایش حلال نرمال هگزان به محیط واکنش، بازدهی تولید بیودیزل و حفظ فعالیت اولیه لیپازهای تثبیت شده طی بازیافت و استفاده مجدد بهبود یافت.

سلسیوس حاصل شد (جدول). با استفاده‌ی مکرر لیپاز تثبیت شده طی 10 مرحله بازیافت و واکنش در دمای 25 درجه سلسیوس، بازدهی تولید بیودیزل از 72٪ به 60٪ کاهش یافت. گروه چانگ، در کار دیگری [48]، همان ذرات سیلیکای مغناطیسی را برای جذب فیزیکی لیپاز بورخولدریا *Spiraea* به کار بردند. بهترین شرایط واکنش برای تولید بیودیزل با بازده 70٪ با استفاده از لیپاز تثبیت شده در دمای اتاق (30 درجه سلسیوس) بود. افزایش تک مرحله‌ای متانول بهتر از روش افزایش سه مرحله‌ای بود. آنزیم‌های تثبیت شده پس از 6 مرحله استفاده مجدد، هیچگونه کاهش فعالیت و یا کاهش بازدهی تولید بیودیزل را نشان ندادند. رودریگوس و همکارانش [49] تولید بیودیزل از روغن‌های سویا، آفتابگردان و سبوس برنج با استفاده از سه نوع لیپاز تثبیت شده تجاری Lipozyme TL-IM، Novozyme 435 و IM و Lipozyme RM-IM را ارائه کردند. بیشترین بازده تولید بیودیزل با استفاده از Novozyme 435 و هر سه نوع روغن در واکنش شامل متانول به دست آمد. با استفاده از Lipozyme TL-IM، بیشترین فعالیت برای تولید بیودیزل با استفاده از اتانول حاصل شد. در سامانه با Lipozyme RM-IM، بیشترین بازدهی تولید بیودیزل با استفاده از بوتانول حاصل شد. با 7 مرتبه بازیافت و استفاده‌ی مکرر لیپازهای تثبیت شده در شرایط واکنش بهینه‌ی متفاوت برای هر نوع آنزیم و شستشوی آنزیم تثبیت شده پس از هر واکنش با هگزان، حدود 90٪ از بازدهی تولید اولیه حفظ شد. درحالی‌که، با شستشوی میان مرحله‌ای آنزیم‌های تثبیت شده با آب، اتانول یا پروپانول، فعالیت حفظ شده خیلی کم بود. گاردوسی و همکارانش [50] آنزیم‌های تثبیت شده تجاری CaL-M (کاندیدا آنتارتیکای تثبیت شده بر روی میکرو ذرات رزین طبیعی متاکریلیک (300-500 میکرومتر)) و CaL-S (کاندیدا آنتارتیکای تثبیت شده بر رزین طبیعی استارنیک) را برای تولید بیودیزل از روغن پسماند دانه‌ی قهوه را بررسی کردند. لیپازهای تثبیت شده بر ذرات استارنیک نسبت به لیپاز تثبیت شده بر ذرات متاکریلیک فعال تر بودند (دارای بازدهی تولید بیودیزل بیشتر). این تفاوت ناشی از ویژگی

جدول 1- مقایسه‌ی گزارش‌های علمی در رابطه با تولید بیودیزل از طریق واکنش ترانس‌استریفیکاسیون روغن‌های مختلف با الکل‌های مختلف با استفاده از لیپازهای تثبیت‌شده.

مرجع	% بهره‌وری باقیمانده	بازدهی تولید بیودیزل	نوع الکل	نوع روغن	% جرمی آنزیم	لیپاز تثبیت‌شده
[41]	گزارش نشده	90%	اتانول	روغن کاستور	4%/5	لیپاز بورخولدریا Spassia/پلیمر Accurel EP 100
[42]	83% (50 سیکل)	98%	متانول	روغن سویا	2%/5	لیپاز بورخولدریا سنوسپاسیا/رزین NKA ماکروتخلخل
[43]	5% (3 سیکل)	95%	متانول	روغن آفتابگردان	3%	Novozyme 435 (لیپاز کاندیدا آنتارکتیکا/ رزین آکرلیک)
[44]	82% (10 سیکل)	95%	متانول و متیل استات	روغن نخل	30%	Novozyme 435
[45]	50% (5 سیکل)	90%	متانول	روغن سویا	40%	لیپاز ترمومیسس لانوگوسا/نانو ذرات مگنتیت
[46]	82% (4 سیکل)	87%	متانول	روغن سویا	60%	لیپاز کاندیدا/ روگوسا/نانوذرات مگنتیت-کیتوسان
[47]	72%	90%	متانول	روغن زیتون	11%	لیپاز بورخولدریا سپاسیا/نانوذرات مگنتیت-سیلیکای متخلخل
[48]	100% (6 سیکل)	70%	متانول	روغن زیتون	22%	لیپاز بورخولدریا سپاسیا/نانوذرات مگنتیت-سیلیکای غیر متخلخل
[49]	92% (7 سیکل)	45%	متانول	روغن سویا	15%	Novozyme 435
[50]	گزارش نشده	54%	متانول	روغن دانه‌ی قهوه	10%	لیپاز کاندیدا/آنتارکتیکا/رزین استایرنیک (تجاری)

شده و بیان‌شده در این مطالعه در جدول 1 گزارش شده است. به طور کلی، ذرات نانوکامپوزیت سیلیکای مغناطیسی پوشیده‌شده با پلیمرها می‌توانند به عنوان گزینه‌ی مناسبی برای تثبیت آنزیم‌ها با بازده بالا همراه با بهبود فعالیت و پایداری ساختار مولکولی و عملیاتی آنها و به عنوان سامانه‌های مغناطیسی با قابلیت بازیافت و استفاده‌ی مجدد مناسبی در واکنش ترانس‌استریفیکاسیون برای تولید بیودیزل با بازدهی بالا پیشنهاد شوند.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق، روش ساخت و ویژگی‌های ساختاری انواع مختلف نانوذرات کامپوزیت مغناطیسی و متعاقباً کاربرد آنها

همانطور که ذکر شد بیشترین مقادیر بازدهی تولید بیودیزل، با استفاده از لیپاز تثبیت‌شده بر روی ذرات پوشیده‌شده با PEI با وزن مولکولی بالا حاصل شد که در ترانس-استریفیکاسیون روغن نخل با متانول و اتانول به ترتیب برابر با 81/2% و 88/3% بود. در حضور حلال نرمال‌هگزان، مقدار بازدهی تولید بیودیزل در محیط‌های حاوی متانول یا اتانول به ترتیب 7/7% و 5% افزایش یافت. طی 5 بار استفاده‌ی مجدد، لیپاز تثبیت‌شده بر روی ذرات پوشیده‌شده با PEI با وزن مولکولی بالا در حدود 70/4% و 77/8% از عملکرد اولیه‌ی برای تولید بیودیزل از روغن نخل با اتانول به ترتیب در محیط عاری از حلال و محیط حاوی نرمال‌هگزان حفظ شد. خلاصه نتایج تولید بیودیزل با استفاده از آنزیم‌های تثبیت

- [2] R. A. Sheldon, S. Pelt, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6223.
- [3] R. C. Rodrigues, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. Fernandez-Lafuente, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6290.
- [4] M. Kalantari, M. Kazemeini, F. Tabandeh, A. Arpanaei, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 8385.
- [5] K. Solanki, M. N. Gupta, *New J. Chem.* 35 (2011) 2551.
- [6] H. Wu, S. Zhang, J. Zhang, G. Liu, J. Shi, L. Zhang, X. Cui, M. Ruan, Q. He, W. Bu, *Adv. Funct. Mater.* 21 (2011) 1850.
- [7] Y. Jiang, C. Guo, H. Xia, M. Iram, C. Liu, H. Liu, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 58 (2009) 103
- [8] Y. Shen, W. Guo, L. Qi, J. Qiao, F. Wang, L. Mao, *J. Mater. Chem. B* 1 (2013) 2260.
- [9] S. Cantone, V. Ferrario, L. Corici, C. Ebert, D. Fattor, P. Spizzo, L. Gardossi, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6262.
- [10] M. Kalantari, M. Kazemeini, A. Arpanaei, *Biochem. Eng. J.* 79 (2013) 267.
- [11] A. Guldhe, B. Singh, T. Mutanda, K. Permaul, F. Bux, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 41 (2015) 1447.
- [12] D. Yang, J. Hu, S. Fu, *J. Phys. Chem. C* 113 (2009) 7646.
- [13] C. Hui, C. Shen, J. Tian, L. Bao, H. Ding, C. Li, Y. Tian, X. Shi, H. J. Gao, *Nanoscale* 3 (2011) 701.
- [14] C. Vogta, M. S. Toprak, M. Muhammed, S. Laurent, J. L. Bridot, R. N. Muller, *J. Nanopart. Res.* 12 (2010) 1137.
- [15] Y. H. Deng, D. W. Qi, C. H. Deng, X. M. Zhang, D. Y. Zhao, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 28.
- [16] W. R. Zhao, J. L. Gu, L. X. Zhang, H. R. Chen, J. L. Shi, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 8916.
- [17] J. Kim, J. E. Lee, J. Lee, J. H. Yu, B. C. Kim, K. An, Y. Hwang, C. H. Shin, J. G. Park, J. Kim, T. Hyeon, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 688.
- [18] J. L. Beatriz, B. Cedric, C. Corinne, G. David, V. Sebastien, M. Sylvain, D. Etienne, S. Clement, *J. Mater. Chem.* 17 (2007) 1563.

برای تثبیت آنزیم و عملکرد آنها در واکنش ترانس-استریفیکاسیون جهت تولید بیودیزل مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج مطالعات نشان می‌دهد نوع پوشش بر روی ذرات مغناطیسی، نقش مهمی در تعداد جایگاه‌های پیوندی بر روی سطح ذرات و در نتیجه بر بازدهی تثبیت آنزیم، ظرفیت بارگذاری ذرات، ساختار و فعالیت کاتالیزوری آنزیم‌های تثبیت شده دارد. به دلیل حضور تعداد بسیار زیاد جایگاه‌های پیوندی بر روی سطح ذرات پوشیده شده با پلیمرها، با استفاده از این ذرات، مقادیر بازدهی تثبیت آنزیم و ظرفیت بارگذاری بسیار بالا گزارش شده است. نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیمی نشان می‌دهد فعالیت و پایداری ساختاری، پایداری حرارتی، ذخیره‌سازی و عملیاتی آنزیم‌های تثبیت شده در محدوده وسیعی از دما و pH بسیار بیشتر از آنزیم آزاد است. ارزیابی عملکرد نانوزیست کاتالیزورها نشان می‌دهد که انتخاب پوشش مناسب بر روی ذرات مغناطیسی تأثیر مهمی در مقابله با مشکلات ناشی از عدم امتزاج پذیری الکل و روغن؛ مقاومت لایه‌ی آب و الکل در برابر نفوذ مولکول‌های روغن و غیرفعال شدن آنزیم با الکل، دارد. نانوزیست کاتالیزورهای با خاصیت آبگریزی در ایجاد غلظت مناسبی از الکل و روغن در اطراف آنزیم‌های تثبیت شده و ممانعت از اثر منفی الکل بر فعالیت آنزیم‌ها تأثیر مهمی دارند. عوامل دیگری مانند نوع الکل، حلال و روغن در حفظ فعالیت آنزیم و بازده تولید بیودیزل موثر است. به طور کلی، ذرات نانوکامپوزیت سیلیکای مغناطیسی پوشیده شده با پلیمرها می‌توانند به عنوان گزینه‌ی مناسبی برای تثبیت آنزیم‌ها همراه با بهبود فعالیت و پایداری ساختار مولکولی و عملیاتی آنها پیشنهاد شوند. مهمتر اینکه آنزیم‌های تثبیت شده بر ساختارهای مغناطیسی آبگریز به عنوان سامانه‌های مغناطیسی با قابلیت بازیافت و استفاده‌ی مجدد می‌توانند به عنوان گزینه مناسبی برای تولید بیودیزل با بازدهی بالا مورد استفاده قرار بگیرند.

منابع

- [1] R. Diosimo, J. McAuliffe, A. J. Poulouse, G. Bohlmann, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6437.

- [36] C. H. Kuo, Y. C. Liu, C. M. J. Chang, J. H. Chen, C. Chang, C. J. Shieh, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 2538.
- [37] Y. Yong, Y. X. Bai, Y. F. Li, L. Lin, Y. J. Cui, C. G. Xi, *Process Biochem.* 43 (2008) 1179.
- [38] Y. Ren, J. G. Rivera, L. He, H. Kulkarni, D. K. Lee, P. B. Messersmith, *BMC Biotechnol.* 11 (2011) 2.
- [39] W. Xie, N. Ma, *Energy Fuels* 23 (2009) 1347.
- [40] B. Hu, J. Pan, H. L. Yu, J. W. Liu, J. H. Xu, *Process Biochem.* 44 (2009) 1019.
- [41] A. M. Baron, N. Barouh, B. Barea, P. Villeneuve, D. A. Mitchell, N. Krieger, *Fuel* 117 (2014) 458.
- [42] Y. Liu, T. Liu, X. Wang, L. Xu, Y. Yan, *Energy Fuels* 25 (2011) 1206.
- [43] N. Ognjanovic, D. Bezbradica, Z. Knezevic-Jugovic, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 5146.
- [44] M. M. R. Talukder, P. Das, T. S. Fang, J. C. Wu, *Biochem. Eng. J.* 55 (2011) 119.
- [45] W. Xie, N. Ma, *Biomass. Bioenerg.* 34 (2010) 890.
- [46] W. Xie, J. Wang, *Biomass. Bioenerg.* 36 (2012) 373.
- [47] D. T. Trana, C. L. Chena, J. S. Chang, *J. Biotechnol.* 158 (2012) 112.
- [48] C. H. Liu, C. C. Huang, Y. W. Wang, D. J. Lee, J. S. Chang, *Appl. Energ.* 100 (2012) 41.
- [49] R. C. Rodrigues, G. Volpato, K. Wada, M. Antonio, Z. Ayub, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 85 (2008) 925.
- [50] V. Ferrario, H. Veny, E. D. Angelis, L. Navarini, C. Ebert, L. Gardossi, *Biomolecules* 3 (2013) 514.
- [51] P. Esmailnejad-Ahranjani, M. Kazemeini, G. Singh, A. Arpanaei, *Renew. Energy* 116 (2018) 613.
- [52] P. Esmailnejad-Ahranjani, M. Kazemeini, A. Arpanaei, *Bioenerg. Res.* doi.org/10.1007/s12155-019-10022-9.
- [19] E. Ruiz-Hernandez, A. Lopez-Noriega, D. Arcos, I. Izquierdo-Barba, O. Terasaki, M. Vallet-Regi, *Chem. Mater.* 19 (2007) 3455.
- [20] T. Valdes-Solis, A. F. Rebolledo, M. Sevilla, P. Valle-Vigon, O. Bomati-Miguel, A. B. Fuertes, P. Tartaj, *Chem. Mater.* 21 (2009) 1806.
- [21] T. Nakamura, Y. Yamada, K. Yano, *J. Mater. Chem.* 16 (2006) 2417.
- [22] P. Esmailnejad-Ahranjani, M. Kazemeini, G. Singh, A. Arpanaei, *RSC Adv.* 5 (2015) 33313.
- [23] P. Esmailnejad-Ahranjani, M. Kazemeini, G. Singh, A. Arpanaei, *Langmuir* 32 (2016) 3242.
- [24] D. Shao, K. Xu, X. Song, J. Hu, W. Yang, C. Wang, *J. Colloid Interface Sci.* 336 (2009) 526.
- [25] H. H. P. Yiu, S. C. McBain, Z. A. D. Lethbridge, M. R. Lees, J. Dobson, *J. Biomed. Mater. Res. A* 92 (2010) 386.
- [26] Y. H. Lien, T. M. Wu, *J. Colloid Interface Sci.* 326 (2008) 517.
- [27] Y. He, Y. Huang, Y. Jin, X. Liu, G. Liu, R. Zhao, *ACS Appl. Mater. Interface.* 6 (2014) 9634.
- [28] G. Liu, M. Cai, X. Wang, F. Zhou, W. Liu, *ACS Appl. Mater. Interface.* 6 (2014) 11625.
- [29] G. Liu, H. Wang, X. Yang, *Polymer* 50 (2009) 2578.
- [30] L. Zhang, T. Wang, L. Li, C. Wang, Z. Sua, J. Li, *Chem. Commun.* 48 (2012) 8706.
- [31] A. R. Mahdavian, M. A. S. Mirrahimi, *Chem. Eng. J.* 159 (2010) 264.
- [32] L. Lou, K. Yu, Z. Zhang, B. Li, J. Zhu, Y. Wang, R. Huang, Z. Zhu, *Nanoscale* 3 (2011) 2315.
- [33] Y. Yong, Y. Bai, Y. Li, L. Lin, Y. Cui, C. Xia, *J. Magn. Magn. Mater.* 320 (2008) 2350.
- [34] E. Ranjbakhsh, A. K. Bordbar, M. Abbasi, A. R. Khosropour, E. Shams, *Chem. Eng. J.* 179 (2012) 272.
- [35] D. G. Lee, K. M. Ponvel, M. Kim, S. Hwang, I. S. Ahn, C. H. Lee, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 57 (2009) 62.