

CATEGORY	Page
1- Metal-Organic Framework Cu ₂ (OBA) ₂ (BPY) as efficient catalyst for C–O bond formation via oxidative cross-coupling reaction of benzaldehyde and 1,4-dioxane - Huynh Quoc Thai, Nguyen Thi Ngoc Tran, Ha Thanh My Phuong, Dang Huynh Giao, Doan Hoai Son, Phan Thanh Son Nam	2
2- Well-defined rod coil diblock copolymers based on poly(3-hexylthiophene) and poly(methyl methacrylate) via metal-free atom transfer radical polymerization - Nguyen Huu Tam, Tran Minh Hoan, Truong Thu Thuy, Nguyen Tran Ha	10
3- Study the effects of reaction parameter on degradation of janus green B by using nano zinc oxide loaded on activated carbon - Pham Quang Minh, Nguyen Thi Van, Vu Anh Tuan	16
4- Improved photocatalytic activity of ZnO by modification with CuO - Nguyen Van Kim, Nguyen Thi Viet Nga, Tran Thi Thanh Cam, Pham Thi Trinh, Nguyen Thi Lan, Nguyen Van Nghia, Tran Thi Thu Phuong, Vo Vien	23
5- Study on preparation of TiO ₂ Sol using TiCl ₄ as a Precursor for catalytic applications - Pham Minh Tu, Do Manh Hung, Au Thi Hang, Nguyen Bich Ngoc, Vu Thi Thu Ha	30
6- Synthesis of TiO ₂ -V ₂ O ₅ composites for photocatalytic degradation of methylene blue under visible light irradiation - Le Thi Thanh Thuy, Nguyen Anh Thoang, Le Si	36
7- Synthesis and photocatalytic activity of magnetic Fe ₃ O ₄ -ZnO composite - Tran Thi Phuong Hong, Nguyen Thi Hong Nhung, Nguyen Van Kim, Nguyen Thi Viet Nga, Vo Vien	43
8- Synthesis of Fe-MIL-101 material and evaluation of photocatytic activity under visible light - Huynh Thi Minh Thanh, Tran Ngoc Tuyen, Dinh Quang Khieu	49
9- Study on phenol adsorption onto Fe-MIL101 in aqueous solution - Tran Ngoc Tuyen, Nguyen Duc Vu Quyen, Ha Thi Thu Hoai, Nguyen Thanh Tan, Huynh Thi Minh Thanh	54
10- Study on the preparation of activated carbon from coffee husk toward the adsorption of dye in aqueous solution - Ta Huu Son, Le Van Khu, Luong Thi Thu Thuy	61
11- Study on building Sylop graph of H ₂ S after activated carbon layer - Bui Van Tai, Hoang Trung Hieu	67
12- Research on column adsorption of Pb ²⁺ by hydroxyapatite granules - Le Thi Duyen, Le Thi Phuong Thao, Do Thi Hai, Vo Thi Hanh, Pham Tien Dung, Pham Thi Nam, Nguyen Thi Thom, Cao Thi Hong, Le Thi Sau, Dinh Thi Mai Thanh	71
13- Synthesis, structural characterization and adsorption capacity of H-δ-MnO ₂ - Dang Thi To Nu, Nguyen Thi My Duyen, Cao Van Hoang, Nguyen Thi Lieu, Nguyen Phi Hung	80
14- Study on catalyst based on CuO modified with Boron applied for selective oxidation of propylene to acrolein - Pham Thi Mai Phuong, Vu Quoc Quan, Le Minh Thang	86
15- Immobilization of glucose oxidase onto core-shell structure materials Fe ₃ O ₄ NP@SiO ₂ and testing it's catalytic activity - Hoang Ngoc Anh Nhan, Nguyen Ba Trung	92
16- Preparation of bio-char from Acacia Sawdust and Sugarcane bagasse for Solid acid Catalyst Fabrication - Le Quang Dien, Nguyen Trung Thanh, Nguyen Thanh Long, Nguyen Thi Nhi, Nguyen Minh Chau, Nguyen Hoang Chung	98
17- Synthesis of alkanolamide nonionic surfactant using used cooking oil - Tran Thi Thanh Ngoc, Nguyen Thanh Nhat, Bui Tan Nghia	105
18- Mathematical model and simulation of a heterogeneous catalytic reactor for reforming process of heavy gasoline - Nguyen Huu Duong, Vu Hong Thai	111
19- Synthesis of adsorbed materials from Bentonite Co Dinh – Thanh Hoa, Application for removal of ammonium in water treatment - Truong Quoc Anh, Mai Van Tien, Bui Thi Thu	116
20- Study on preparation of nano-ZIF-67 in ethanol - Le Van Duong, Dinh Quang Toan, Pham Thu Huong, Le Ngoc Duong, Nguyen Thi Xuan, Ninh Thi Phuong, Ta Ngoc Don	122
21- Hydropolymerization of ethylene - A future manufacture of fuel production - Nguyen Quang Minh, Dao Quoc Tuy	128



Cố định enzyme glucose oxidase lên vật liệu từ tính cấu trúc core-shell $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP@SiO}_2$ và thử hoạt tính xúc tác của nó
Immobilization of glucose oxidase onto core-shell structure materials $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP@SiO}_2$ and testing its catalytic activity

Hoàng Ngọc Ánh Nhân¹, Nguyễn Bá Trung^{1,*}

¹Khoa Y Dược, Đại học Đà Nẵng

*Email: nbtrung@ud.edu.vn

ARTICLE INFO

Received: 05/5/2018

Accepted: 22/5/2018

Keywords:

Iron oxide magnetic nanoparticles,
Surface modification,
Enzyme Immobilization,
Glucose oxidase,
Reusability.

ABSTRACT

This work demonstrates herein a method to fabricate magnetic nano enzyme in a form of core-shell structure denoted as $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP@SiO}_2\text{-GOx}$. The core $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ was synthesized from the mixture of Fe^{2+} and Fe^{3+} in alkaline medium using co-precipitation method, which was coated with SiO_2 and then functionalized with (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES). Afterward, Glucose oxidase (GOx) was chemically immobilized onto amine-functionalized $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP@SiO}_2$ using glutaraldehyde as a cross-linking agent. Physical characterization by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), X-ray powder diffraction (XRD), magnetic saturation, transmission electron microscopy (TEM), and thermal gravimetric analysis (TGA) showed that $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP@SiO}_2\text{-GOx}$ are spherical with diameter in the range of $17 \div 28$ nm, magnetic saturation value of 34.2 emu/g, catalytic activity of $125 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{phút}^{-1}$ for glucose oxidation, ease of separation from the reaction mixture by applied magnetic field.

Giới thiệu chung

Enzyme là xúc tác sinh học phong phú trong tự nhiên, đã và đang được sử dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp chế biến thực phẩm, dược phẩm, phát triển hệ cảm biến sinh học, pin nhiên liệu sinh học... Xu hướng sử dụng xúc tác enzyme thay cho xúc tác vô cơ, hữu cơ truyền thống trong chuyển hóa các hữu cơ ngày càng tăng do những ưu điểm nổi bật của nó như: độ đặc hiệu cao với cơ chất, phản ứng xảy ra ngay trong điều kiện êm dịu với nhiệt độ thấp và pH trung tính, nguồn thu nhận phong phú. Tuy vậy, hạn chế lớn nhất của xúc tác enzyme là thời gian sống thấp do chúng dễ bị biến tính bởi sự thay đổi của pH, nhiệt

độ, cũng như các tác nhân hóa học. Vì vậy, để ứng dụng enzyme trong sản xuất công nghiệp, hai vấn đề then chốt cần được quan tâm chính là độ ổn định và hoạt độ của xúc tác. Chính lẽ đó, trong thời gian gần đây, các hướng nghiên cứu liên quan đến tăng độ ổn định và duy trì hoạt tính xúc tác lâu dài của enzyme bằng cách cố định enzyme lên chất mang đang được các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu [1,2,3,4].

Chất mang truyền thống được sử dụng nhiều để cố định enzyme là các polymer hữu cơ, và các chất mang vô cơ. Những vật liệu này có ưu điểm là điều chế đơn giản, nhưng giới hạn về kích thước lớn, dẫn đến hiệu quả tương tác giữa enzyme và cơ chất chưa cao. Xu hướng sử dụng chất mang có kích thước nano đang

được quan tâm sử dụng nhằm tăng cường hiệu quả chất chứa enzyme, cũng như tương tác giữa enzyme và cơ chất. Trong số đó, chất mang là hạt nano từ tính (Magnetic nano particle(s) – MNP(s)) được các nhà khoa học trên thế giới đang tập trung nghiên cứu do những ưu điểm nổi bật của loại vật liệu này như: (1) kích thước hạt nano có thể hiệu chỉnh phù hợp cho việc gắn kết các phân tử sinh học (tế bào, protein, gene hoặc virus) nhờ sử dụng các phương pháp tổng hợp khác nhau; (2) tính tương thích sinh học cao, dễ dàng biến tính bề mặt bằng các phương pháp lý, hóa để gắn kết các phân tử sinh học nói chung và enzyme nói riêng; (3) tính đồng nhất về kích thước cao, diện tích bề mặt lớn và từ độ bão hòa lớn ngay ở nhiệt độ phòng nên dễ dàng tách ra khỏi hỗn hợp phản ứng.

Hoạt tính xúc tác của hệ enzyme nano từ tính phụ thuộc vào nhiều yếu tố, trong đó sự ổn định về phân tán của hệ xúc tác là một trong những yếu tố khá quan trọng quyết định độ hoạt động của enzyme. Enzyme cố định trực tiếp trên MNPs trần dễ dàng ngưng kết trong quá trình thu hồi tái sử dụng bằng từ trường ngoài, do đó hoạt tính của enzyme MNPs sẽ bị giảm một phần do sự hạn chế tiếp xúc giữa enzyme và cơ chất. Vì vậy, việc duy trì độ bền phân tán của enzyme nano từ tính là điều cần thiết. Rossi và các cộng sự đã biến tính bề mặt MNP bằng ammonium persulfate để cố định enzyme glucose oxidase, tuy nhiên, hoạt tính của enzyme chỉ còn 50% so với ban đầu sau 5 lần sử dụng [5]. Ngoài ra, phương pháp được sử dụng để cố định enzyme lên chất mang cũng ảnh hưởng đến độ ổn định của xúc tác. Cố định enzyme bằng hấp phụ vật lý hoặc gói enzyme trong cấu trúc polymer tuy đơn giản, nhưng enzyme dễ dàng bị tách khỏi chất mang trong khi tiến hành phản ứng do khuấy trộn cơ học hoặc quá trình tái sinh xúc tác. Lee và các cộng sự đã cố định enzyme lipase trên bề mặt nano từ tính kỵ nước và nhận thấy hoạt tính của enzyme mất khoảng 50% sau lần sử dụng đầu tiên, nguyên nhân được giải thích là do hiện tượng giải hấp phụ enzyme ra khỏi chất mang ngay trong quá trình xúc tác cho phản ứng [6]. Cũng có một vài nghiên cứu về đóng gói enzyme trong nền silica, tuy nhiên giống như phương pháp gói enzyme trong nền polymer không có hạt nhân từ tính, phương pháp này cũng bộc lộ nhiều yếu điểm do sự tương tác hạn chế giữa enzyme và chất mang và có hiện tượng rò rỉ enzyme khỏi chất mang trong suốt quá trình xúc tác và tái sử dụng. Ngược lại với phương pháp cố định bằng hấp phụ vật lý đơn thuần trên bề mặt hoặc nhốt trong nền polymer, cố định bằng liên kết hóa học giúp duy trì bền vững trạng thái gắn kết của enzyme trên chất mang, mở rộng giới hạn phạm vi hoạt động về nhiệt độ và pH, tuy nhiên hoạt tính của

enzyme có thể bị giảm một phần sau cố định do việc sử dụng các tác nhân hóa học làm chất gắn kết.

Các nghiên cứu trong nước chỉ sử dụng xúc tác enzyme ở dạng hòa tan hoặc cố định trên nền polymer hữu cơ hoặc vật liệu vô cơ thô nên hiệu quả tương tác giữa enzyme với cơ chất là không lớn và là nguyên nhân gây giảm hiệu suất chuyển hóa [7,8,9]. Ngoài ra, việc thu hồi và tái sử dụng chúng vẫn là vấn đề cần được xem xét. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện cố định enzyme glucose oxidase (GOx) lên trên vật liệu có cấu trúc lõi-vỏ là $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP@SiO}_2$. Các phân tử enzyme GOx sau đó được cố định trên bề mặt $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP@SiO}_2$ bằng liên kết cộng hóa trị thông qua tác nhân tạo cầu nối là glutaraldehyde. Hoạt tính xúc tác $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP@SiO}_2\text{-GOx}$ được đánh giá thông qua phản ứng chuyển hóa đường glucose tạo D-gluconic acid và hydrogen peroxide. Kết quả nghiên cứu là cơ sở để đề xuất phương pháp cố định enzyme ứng dụng trong chuyển hóa các hợp chất hữu cơ nói riêng, hoặc cố định các phân tử sinh học trên vật liệu từ tính $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ ứng dụng trong y sinh nói chung.

Thực nghiệm và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Tetraethyl orthosilicates (TEOS), 3-Amino propyl triethoxysilane (APTES), Glutaraldehyde (25%, v/v) được sử dụng trong nghiên cứu do hãng Merck (Germany) sản xuất. Enzyme GOx từ *Aspergillus niger* ($\geq 15,000$ unit/g) được mua từ hãng Sigma – Aldrich. Ethanol (>99%) do Fisher Scientific (USA) sản xuất. Muối sắt (II) sulfate FeSO_4 , sắt (III) sulfate $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, Ammonium hydroxide (25–28%, w/w) là hóa chất tinh khiết; dung dịch các chất này được sục khí Ar để loại bỏ O_2 . Dung dịch đệm phosphate pH = 7.4 được pha từ muối NaH_2PO_4 và Na_2HPO_4 tinh khiết.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tổng hợp nano oxit sắt từ ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$)

Hòa tan 5,56 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và 8 g $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ trong 100 ml nước cất (tỉ lệ về số mol 1 : 2) cho vào bình cầu 3 cổ có gắn sinh hàn hồi lưu. Hỗn hợp được đặt trên máy khuấy từ có gia nhiệt và sục khí Ar. Thêm từ từ 50ml dung dịch amoniac (25 ~ 28%) vào hỗn hợp được khuấy đều ở trên đến khi pH = 9, tiếp tục khuấy hỗn hợp trong 60 phút, sau đó nâng nhiệt độ phản ứng lên 80°C và giữ trong 2 giờ, thu được sản phẩm $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ màu đen sẫm. Môi trường trở được đảm bảo trong

suốt quá trình phản ứng bằng cách sục khí Ar. Sản phẩm $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ được để nguội đến nhiệt độ phòng, tách và thu hồi bằng từ trường ngoài, rửa bằng nước cất đến pH trung tính. Sản phẩm sau cùng được làm khô qua đêm trong chân không ở nhiệt độ phòng.

2.2.2. Tổng hợp các hạt coreshell $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2$

Việc phủ silica lên trên bề mặt hạt $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ được thực hiện thông qua phản ứng thủy phân TEOS trong môi trường kiềm. Cho 300 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ đã được điều chế ở trên vào hỗn hợp chứa 80 ml ethanol và 20 ml nước cất, khuấy đều và rung siêu âm sau đó trong 60 phút để đảm bảo phân tán đều các hạt $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$. Thêm và khuấy đều từng giọt đến 3ml dung dịch NH_4OH , kế tiếp thêm 0,8 ml TEOS vào hỗn hợp trên, khuấy trong 6 giờ ở nhiệt độ phòng trong môi trường khí Ar. Sản phẩm sau đó được làm nguội, thu hồi bằng từ trường ngoài, rửa nhiều lần với nước cất và ethanol đến pH=7. Mẫu được sấy ở 60°C ở áp suất thấp trong 3 giờ thu được $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2$.

2.2.3. Tổng hợp $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$

Phân tán 300 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2$ trong 40 ml ethanol bằng siêu âm trong 60 phút. Kế tiếp, thêm 1 ml 3-aminopropyl triethoxysilane (APTES) và khuấy ở 40°C trong 6 giờ, sau đó làm nguội đến nhiệt độ phòng. Sản phẩm $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ được thu hồi bằng từ trường ngoài, rửa nhiều lần bằng ethanol, sấy ở 60°C trong áp suất thấp.

2.2.4. Cố định enzyme glucose oxidase lên $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$

Việc cố định enzyme GOx lên trên bề mặt vật liệu $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ được thực hiện thông qua tạo liên kết chéo với glutaraldehyde (GA). Quá trình thực hiện qua 2 giai đoạn:

Giai đoạn 1: Phân tán bằng cách siêu âm 30 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ trong 6 ml dung dịch đệm phosphate 0,01M; pH=7,4. Thêm 0,3 ml dung dịch glutaraldehyde (GA) 25% vào hỗn hợp và tiếp tục khuấy, ủ trong 6 giờ để tạo liên kết giữa nhóm -NH_2 và -CHO . Phần rắn được tách bằng từ trường ngoài và rửa với dung dịch đệm nhiều lần để loại bỏ hoàn toàn GA tự do không gắn kết, thu được sản phẩm $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ đã được hoạt hóa.

Giai đoạn 2: 10 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ được cho vào dung dịch chứa enzyme lipase 0,5 mg/ml pha trong đệm phosphate pH=7,4. Hỗn hợp được khuấy 100 rpm

ở 30°C trong 12 giờ. Sản phẩm enzyme cố định được tách bằng từ trường ngoài, rửa bằng dung dịch đệm phosphate pH = 7,4 cho đến khi không nhận dạng được sự có mặt của protein tự do có trong dịch rửa bằng phương pháp Bradford.

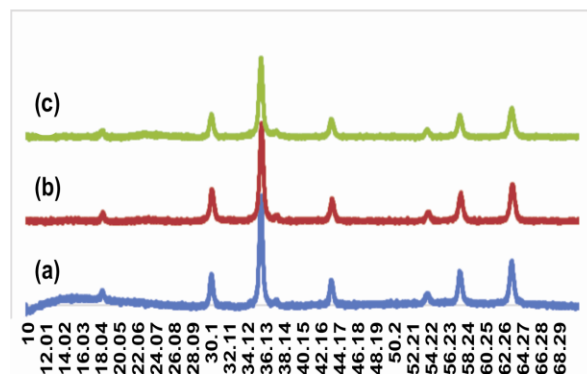
2.3. Phân tích đặc trưng lý, hoá của vật liệu

Đặc trưng của vật liệu đã tổng hợp được xác định bằng phổ FT-IR, nhiễu xạ tia X, chụp ảnh hiển vi điện tử truyền qua TEM, đo đường cong từ hoá, phổ tán sắc năng lượng EDX, và phân tích nhiệt trọng lượng TGA. Phổ FT-IR được ghi lại trên máy quang phổ kế Nicolet iS10 FT – IR trong khoảng 4000 đến 400 cm^{-1} sử dụng viên nén KBr. Giảm nhiễu xạ XRD được thực hiện ở nhiệt độ phòng trên máy Diffractometer (Rigaku), với tia phát xạ $\text{CuK}\alpha$ có bước sóng $\lambda = 1,5406\text{ \AA}$, công suất 40 KV, góc quét $2\theta = 10 - 70^\circ$, tốc độ quét $0,02^\circ/\text{giây}$. Ảnh TEM được ghi trên kính hiển vi truyền qua JEM1010 (JEOL). Phổ EDX được ghi trên máy Emax (Horiba). Phân tích nhiệt trọng lượng được thực hiện trên máy TGA/DSC STA 6000 (Perkin Elmer) với nhiệt độ thay đổi từ nhiệt độ phòng đến 800°C , tốc độ gia nhiệt $10^\circ\text{C}/\text{phút}$ trong môi trường khí N_2 . Đường cong từ hoá được đo ở nhiệt độ phòng bởi từ kế mẫu rung (VSM).

Kết quả và thảo luận

3.1. Phân tích các đặc trưng của vật liệu đã tổng hợp

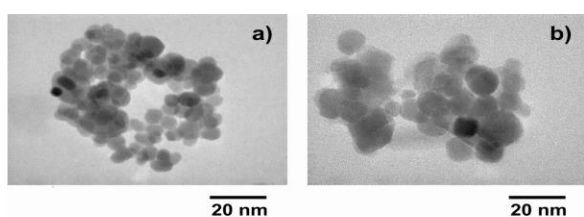
Kết quả phân tích nhiễu xạ cấu trúc tinh thể của 3 mẫu $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ (a), $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ (b), $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{-GOx}$ (c) được trình bày ở hình 1 xuất hiện 6 đỉnh nhiễu xạ lần lượt tại các góc $2\theta = 30,2^\circ$; $35,5^\circ$; $43,2^\circ$; $57,1^\circ$ và $62,7^\circ$, tương ứng là các đỉnh nhiễu xạ đặc trưng cho các mặt phản xạ (220), (311), (422), (511) và (440) của mạng cấu trúc tinh thể spinel của Fe_3O_4 [10].



Hình 1: Giảm nhiễu xạ tia X của $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ (a), $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ (b), $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2\text{-GOx}$ (c)

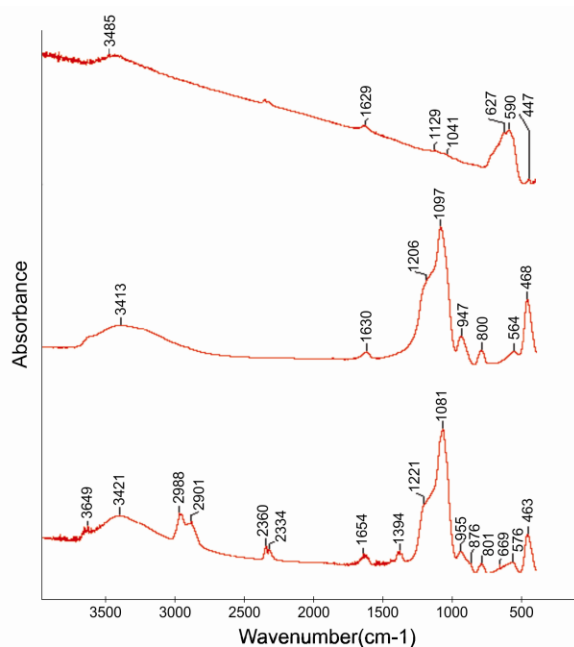
Giản đồ thu được cũng không xuất hiện đỉnh nhiễu xạ nào lạ có cường độ lớn, chứng tỏ chỉ có pha từ Fe_3O_4 trong cấu trúc tinh thể. Tuy nhiên, cường độ tín hiệu 6 peak đặc trưng tại các giá trị góc 2θ giảm ở hình 1(b) và hình 1(c), chứng tỏ bề mặt của tinh thể $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ đã bị thay đổi sau khi phủ SiO_2 và cố định enzyme GOx.

Kết quả chụp ảnh TEM xác định hình thái bề mặt và kích thước hạt cho thấy mẫu $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ đã tổng hợp có hình dạng hình cầu với kích thước ban đầu từ 10 ± 20 nm (hình 2a). Sau khi phủ lên bề mặt lớp SiO_2 và kết tiếp gắn kết GOx, hình dạng của vật liệu không có sự thay đổi nào đáng kể nhưng có sự tăng về kích thước (hình 2b), chứng tỏ vỏ SiO_2 đã được phủ trên bề mặt của lõi $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ để tạo ra vật liệu lõi-vỏ là $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2$.



Hình 2: Ảnh TEM của $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ (a), $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2\text{-GOx}$ (b)

Phổ FT-IR được sử dụng để đánh giá sự thay đổi bề mặt vật liệu.

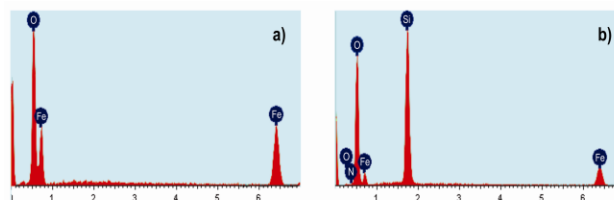


Hình 3: Phổ IR của Fe_3O_4 (a), $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ (b), $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2\text{-GOx}$ (c)

Giản đồ phổ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ (hình 3a) xuất hiện các dao động tại 590 cm^{-1} , 3485 cm^{-1} , 1629 cm^{-1} , lần lượt là dao

động của liên kết Fe – O, dao động hóa trị của O – H và dao động biến dạng O – H. Sự xuất hiện đỉnh tại 3485 cm^{-1} và 1629 cm^{-1} là do các hạt $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ được tổng hợp trong môi trường nước nên được phủ một số nhóm -OH. Giản đồ của $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ (hình 3b) xuất hiện peak có cường độ mạnh tại 1097 cm^{-1} và 800 cm^{-1} , đặc trưng cho dao động hoá trị bất đối xứng và đối xứng của liên kết Si – O – Si. Các dao động biến dạng của Si – O – Si và Si – OH được quan sát tại peak ở 468 cm^{-1} và 947 cm^{-1} . Các tín hiệu đo được trên đã chỉ ra sự tồn tại của lớp silica được bọc quanh lõi $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$. Trong phổ của $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ có 2 peak tín hiệu tại 3413 cm^{-1} và 1630 cm^{-1} có thể là dao động hoá trị của liên kết N – H và dao động biến dạng của liên kết N – H của nhóm -NH_2 tương ứng. Hình 3(c) là phổ FT-IR của các hạt $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2$ đã được hoạt hóa bằng APTES, xử lý bằng glutaraldehyde và gắn enzyme GOx. Trên phổ xuất hiện các đỉnh đặc trưng của protein. Đỉnh tại 1654 cm^{-1} đặc trưng cho dao động biến dạng của liên kết N – H của amin bậc 1 và 1394 cm^{-1} là dao động hóa trị của liên kết C – N của amin bậc 2. Đây là bằng chứng cho thấy nhóm -NH_2 của APTES đã tham gia phản ứng với nhóm -CHO của glutaraldehyde tạo thành nhóm imine (-C=N). Vùng phổ xuất hiện trong khoảng $2901 - 2988 \text{ cm}^{-1}$ là do dao động đối xứng và bất đối xứng của các nhóm $\text{-CH}_2\text{-}$ và -CH_3 được tìm thấy trong protein và lipid. Tại đỉnh 3421 cm^{-1} là do dao động hóa trị của O – H và N – H có trong nước và protein.

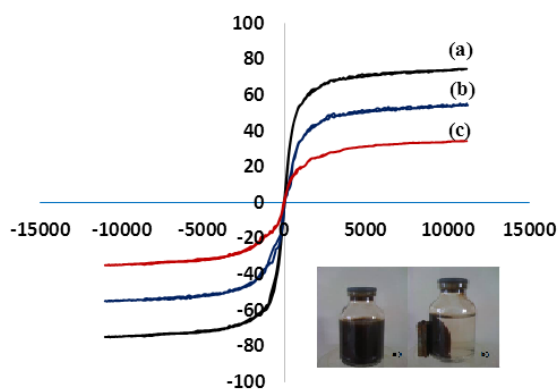
Kết quả đo phổ tán sắc năng lượng tia X (EDX) của $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2\text{-GOx}$ thể hiện ở hình 4a và 4b cho thấy các đỉnh peak ở các khu vực 0,75 keV; 6,5 keV tương ứng với năng lượng liên kết của Fe. Đỉnh peak có giá trị 0,5 keV ứng với nguyên tố O. Mặt khác, trong giản đồ EDX 4b còn có các đỉnh xuất hiện các peak ở vùng 0,25 keV, 0,35 keV và 2,75 keV, tương ứng với năng lượng liên kết của C, N và Si, chứng tỏ rằng các enzyme đã được gắn kết thành công lên $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$.



Hình 4: Phổ EDX của $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ (a), $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2\text{-GOx}$ (b)

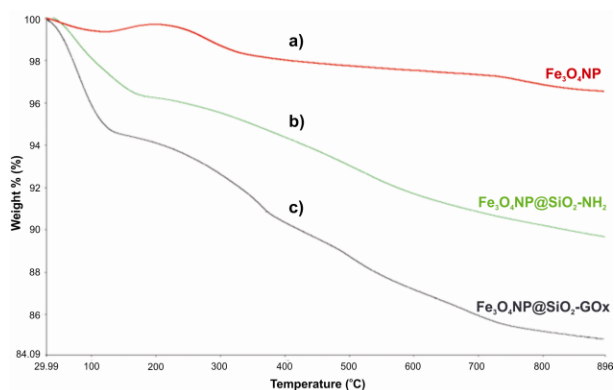
Từ độ bão hòa là yếu tố được cần quan tâm cho việc ứng dụng làm xúc tác của vật liệu đã tổng hợp. Giá trị từ độ bão hòa càng lớn, vật liệu xúc tác càng dễ dàng

được tách ra khỏi hỗn hợp phản ứng bằng từ trường ngoài để dừng phản ứng / tái sử dụng tiếp theo.



Hình 5: Đường cong từ hóa của $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ (a), $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP@SiO}_2\text{-NH}_2$ (b), $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP@SiO}_2\text{-GOx}$ (c) đo ở nhiệt độ phòng; Hình chèn là ảnh ghi lại trạng thái phân tán của mẫu xúc tác trước và sau khi áp từ trường ngoài

Kết quả đo từ độ bão hòa của các mẫu $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ (a), $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP@SiO}_2\text{-NH}_2$ (b), $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP@SiO}_2\text{-GOx}$ (c) ở nhiệt độ phòng chỉ ra ở hình 5 cho thấy ở cả 3 mẫu đều có lực kháng từ gần bằng 0, nên đều có tính siêu thuận từ. Từ độ bão hòa của mẫu $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ giảm dần theo sự phủ SiO_2 và gắn kết GOx để tạo ra sản phẩm cuối cùng có cấu trúc lõi-vỏ ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP@SiO}_2\text{-GOx}$) tương ứng với các giá trị 75,18 emu/g; 55,03 emu/g và 34,24 emu/g. Điều này được giải thích là do bao phủ SiO_2 và xúc tác enzyme lên trên bề mặt của lõi $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$, bề dày lớp phủ càng lớn thì tính chất từ thể hiện càng giảm. Tuy nhiên, xúc tác $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP@SiO}_2\text{-GOx}$ vẫn dễ dàng bị tập hợp, tách khỏi môi trường phân tán (dung dịch đệm phosphate pH = 7,4) dưới tác dụng của từ trường ngoài để tái sử dụng cho những lần tiếp theo.

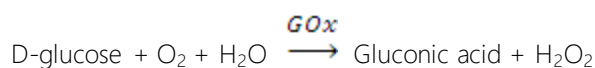


Hình 6: Phân tích TGA biểu diễn sự giảm khối lượng của $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ (a), $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP@SiO}_2\text{-NH}_2$ (b), $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP@SiO}_2\text{-GOx}$ (c)

Thành phần của vật liệu tổng hợp một lần nữa được đánh giá thông qua phép phân tích nhiệt trọng lượng. Kết quả thu được cho thấy trong khoảng từ 60 – 180^oC vật liệu $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ không có sự thay đổi trọng lượng đáng kể theo sự tăng nhiệt độ với phần trăm khối lượng giảm 0,488%, chủ yếu do mất lượng nước hấp thụ trên vật liệu (hình 6a), trong khi đó độ giảm khối lượng của $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP@SiO}_2\text{-NH}_2$ là 3,692% và $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP@SiO}_2\text{-GOx}$ là 5,574%, lớn hơn so với $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ là do sự gắn kết các nhóm chức phân cực lên vật liệu $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$, làm tăng khả năng hấp phụ nước. Sự phân rã của APTES xảy ra trong khoảng nhiệt độ 250^o – 500^oC, của protein bắt đầu tại nhiệt độ 220^o đến 500^oC mà chủ yếu tại 280^oC, do vậy trong khoảng nhiệt độ 250 – 600^oC, phần trăm khối lượng của các hạt nano phủ APTES giảm khoảng 4,466% là do sự phân hủy APTES. Cũng khoảng nhiệt độ này, sự mất khối lượng của mẫu $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP@SiO}_2\text{-GOx}$ là do mất khối lượng của lớp phủ APTES và GOx khoảng 7,113%. Kết quả này phù hợp với công bố của các nghiên cứu trước đó [11, 12].

3.2. Kiểm tra hoạt tính xúc tác cho phản ứng chuyển hóa D-glucose

Việc đánh giá lại hoạt tính xúc tác enzyme sau khi cố định là điều cần thiết, bởi hoạt tính của nó dễ dàng bị giảm đáng kể sau khi được cố định trên chất mang bằng phương pháp hóa học. Bước đầu đánh giá hoạt tính của xúc tác $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP@SiO}_2\text{-GOx}$ trong phản ứng chuyển hóa D-glucose tạo D-gluconic acid được thực hiện bằng cách cho 1 gam xúc tác vào 40 ml dung dịch đường D-glucose 5% pha trong đệm phosphate pH = 7.4. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trộn có bổ sung O_2 không khí và duy trì ở 40^oC trong 10 phút. Dưới tác dụng của enzyme GOx, phản ứng chuyển hóa D-glucose xảy ra như sau:



Phản ứng được dừng hoàn toàn bằng cách bất hoạt enzyme bằng nhiệt và tách xúc tác ra khỏi hỗn hợp phản ứng nhờ từ trường ngoài. Thông qua định lượng glucose, xác định được phần trăm chuyển hóa là 3.75 %, tương ứng với giá trị hoạt độ tính được cho $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP@SiO}_2\text{-GOx}$ là 125 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{phút}^{-1}$. Điều này có thể khẳng định đã thành công trong việc cố định enzyme GOx trên chất mang từ tính $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP@SiO}_2\text{-NH}_2$

Kết luận

Bằng phương pháp đồng kết tủa, vật liệu $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ đã được tổng hợp với kích thước hạt tương đối đồng nhất, độ từ bão cao. Cấu trúc lõi-vỏ của vật liệu $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2$ đã được thực hiện thành công, giúp tăng độ bền tập hợp của $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ cũng như dễ dàng chức năng hóa bề mặt cho việc cố định enzyme GOx thông qua cầu nối glutaraldehyde. Từ độ bão hòa xúc tác $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}@ \text{SiO}_2\text{-GOx}$ có giảm so với lõi $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ ban đầu, nhưng vẫn còn khá cao nên dễ dàng thu hồi bằng từ trường ngoài. Kết quả của nghiên cứu có thể triển khai ứng dụng cố định enzyme khác nói riêng, hoặc các phân tử protein sinh học nói chung lên vật liệu nano từ cho các mục đích khác nhau.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Bộ Giáo dục và Đào tạo trong đề tài mã số B2016-01-08

Tài liệu tham khảo

1. M. Abbasi; R. Amiri; A. K. Bordbar; E. Ranjibakhsh; A. R. Khosropour, Applied surface Science, Improvement of the Stability and Activity of Immobilized Glucose Oxidase on Modified Iron Oxide Magnetic Nanoparticles 364 (2016)752-757.
2. YanLi, FeiGao, Wei Wei, Jian-Bo Qu, Guang-Hui Ma, Wei-Qing Zhoua, J. Mol. Catalysis B: Enzymatic, Pore size of macroporous polystyrene microspheres affects lipase immobilization 66(2010)182-189.
3. Shi, L.E.S.; Chen, M.; XINF, L.Y.; Guo, X.F.; Zhao, L.M, Journal of the Chemical Society of Pakistan, Chitosan nanoparticles as drug delivery carriers for biomedical engineering 33(2011)929-934.
4. G. Hang; H. Chen; Y. Zhang, A. Chen, International Journal of Biological Macromolecules, Immobilization of pectinase onto $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-NH}_2$ and its activity and stability 88(2016)189-195.
5. LM Rossi, AD Quach, Z Rosenzweig, Analytical and Bioanalytical Chemistry, *Glucose oxidase-magnetite nanoparticle bioconjugate for glucose sensing* 380(2004)606-613.
6. Lee, K. S.; Woo, M. H.; Kim, H. S.; Lee, E. Y.; Lee, I. S; Chem. Commun, Synthesis of hybrid Fe_3O_4 Silica NiO ... biocatalysts; 25 (2009)3780-3782.
7. Nguyễn Phú Thọ và Dương Thị Hương Giang, Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ, Nghiên cứu quy trình điều chế bột enzyme papain thô từ nhựa đu đủ 17(2011)158-166.
8. Huỳnh Ngọc Oanh, Vũ Thanh Thảo, Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ, Khảo sát quá trình cố định Enzyme α -Amylase (Termamyl) bởi chất mang Cmc-Alginate 12 (2007)76-81.
9. Nguyễn Thị Ái Vân, Phan Ngọc Hòa, Trần Bích Lam, Châu Trần Diễm Ái, Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ, Thủy phân dầu dừa bằng enzyme porcine pancreas tự do và cố định 19(2016).
10. Y Wu, Y Wang, G Luo, Y Dai, Bioresource Technology, In situ preparation of magnetic Fe_3O_4 -chitosan nanoparticles for lipase immobilization by cross-linking and oxidation in aqueous solution 100(2009) 3459-3464.
11. K K Can, M Ozmen, M Ersoz, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Immobilization of albumin on aminosilane modified superparamagnetic magnetite nanoparticles and its characterization 71(2009)154-159.
12. K. Csach, A. Juríková, J. Mikuf, M. Koneracká, V. Záviová, M. Kubovíková, Proceedings of the European Conference Physics of Magnetism, Thermogravimetric study of the decomposition of BSA-coated magnetic nanoparticles 121(2011)1293-1295.