

分类号：061

单位代码：10363

密 级：公开

学 号：2210610106

题 目 磁性固定化漆酶的制备及其光热催化研究

Title Synthesis of magnetic immobilized laccase
and their photothermal catalysis

学生姓名： 卫雨航

指导教师： 陈志明 教授

专 业： 化学

研究方向： 新型催化材料合成与应用

论文答辩日期：2024 年 5 月 29 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：卫雨航

日期：2024 年 5 月 29 日

安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☒，在 2 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☐。

学位论文作者签名：卫雨航

指导教师签名：陈志明

日期：2024 年 5 月 29 日

日期：2024 年 5 月 29 日

磁性固定化漆酶的制备及其光热催化研究

摘 要

漆酶是应用最广泛的多酚氧化酶，它能利用电子受体氧气氧化酚类、芳香环类、羧酸衍生物等多种底物，且副产物为水。然而，漆酶对所处的环境十分敏感，对热、强酸、强碱、有机溶剂等均不够稳定，在反应过程中容易失活，且不易长期储存，也不能重复使用。为了解决上述问题本文以磁性纳米粒子作为载体，利用酰胺反应和铜离子螯合吸附法固定漆酶，制备固定化漆酶。探究了固定化漆酶的最适 pH、最适温度、耐热性、耐酸性、重复性和抗污染性，并探究了固定化漆酶光热条件下对染料和染料废水的降解性能。主要研究结果如下：

1. 采用共沉淀法制备磁性 Fe_3O_4 纳米粒子，并在磁性 Fe_3O_4 纳米粒子表面包裹海藻酸钠(SA)，再经水热炭化处理，制备出羧基功能化的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子；用 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子表面的羧基，再利用酰胺化反应，将漆酶固定在 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子表面，制备出磁性固定化漆酶。用 TEM、XRD、XPS、FT-IR、M-H 测试手段对 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子进行了表征分析。研究了游离漆酶和固定化漆酶的催化活性，结果表明磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子提高了漆酶的稳定性、抗污染性和可重复性。考察了 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子的光热转换性能，结果表明 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子固定漆酶(1.4 mg/mL)能够在 120 min 内将体系温度从 24.9℃ 提升到 51.5℃。还考察了固定化漆酶在光热条件下对染料和染料废水的降解性能，结果表明固

定化漆酶在 2,2'-联氨双（3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸）(ABTS)存在下可在 60-90 min 内完成对三苯甲烷类染料和染料废水的脱色降解，重复使用 10 次后固定化漆酶对染料和染料废水降解率依然保持在 90% 左右。

2. 采用共沉淀法制备磁性 Fe_3O_4 纳米粒子，并在磁性 Fe_3O_4 纳米粒子表面修饰 3-巯丙基三乙氧基硅烷，再与硫脲和醋酸铜反应后制备出 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子；再利用铜离子螯合法将漆酶固定在磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子表面，制备出固定化漆酶。用 TEM、XRD、XPS、FT-IR、M-H 测试手段对 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子进行表征分析。研究了游离漆酶和固定化漆酶的催化活性，结果表明磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶的酶活回收率可达 128.84%；考察了 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子的光热转换性能，结果表明 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子固定漆酶(1.4 mg/mL)能够在 120 min 内将体系温度从 25.1°C 提升到 47.1°C。考察了固定化漆酶在光热条件下对染料和染料废水的降解性能，结果表明固定化漆酶可在 90-150min 内完成偶氮类染料和染料废水的降解，降解率为 96-99%，且重复降解 10 次后染料和染料废水降解率依然保持在 82%以上。

关键词： $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子， $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子，固定化漆酶，催化活性，光热降解，三苯甲烷类染料，偶氮类染料，染料废水

Synthesis of magnetic immobilized laccase and their photothermal catalysis

Abstract

Laccase is the most widely used polyphenol oxidase, which can oxidase a wide range of substrates such as phenols, aromatic rings, carboxylic acid derivatives, etc., using electron acceptor oxygen and with water as a by-product. However, laccase is sensitive to the environment, and is not stable enough to heat, strong acid, strong base, organic solvents, etc. It is easily inactivated during the reaction process and cannot be stored for a long time or reused. To solve the above defects, magnetic carriers were developed and used to immobilize laccase via amide reaction or Cu^{2+} ion chelating adsorption. The optimal pH and temperature, thermal and pH stabilities, recyclability and tolerances of immobilized laccase were investigated in detail. Also, the performance of photothermal degradation of immobilized laccase to dyes and dye wastewater were investigated. The main results are as follows:

1. Magnetic Fe_3O_4 nanoparticles were prepared by co-precipitation method. After coated with sodium alginate (SA) and the subsequently hydrothermal carbonization treatment, carboxyl-functionalized $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ nanoparticles were synthesized. After the carboxyl groups activated by 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS), laccase was immobilized on the surface of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ nanoparticles via the amide reactions. The $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$

nanoparticles were characterized by TEM, XRD, XPS, FT-IR, and M-H tests. The catalytic activities of free and immobilized laccase were investigated, and the results showed that magnetic $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ nanoparticles can improve the stabilities, recyclability and tolerances of immobilized laccase. The photothermal properties of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ nanoparticles were also investigated. The results showed that the laccase immobilized on $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ nanoparticles (1.4 mg/mL) could raise the temperature of the system from 24.9°C to 51.5°C within 120 min. The photothermal degradation of immobilized laccase towards dyes and dye wastewater was investigated. It is found that the immobilized laccase could decolorize triphenylmethane dyes and dye wastewater within 60-90 min in the presence of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), and the degradation rate of dye and dye wastewater remained about 90% after repeated use for 10 times.

2. Magnetic Fe_3O_4 nanoparticles were fabricated by co-precipitation method. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ nanoparticles were synthesized by modifying 3-mercaptopropyltriethoxysilane on the magnetic Fe_3O_4 nanoparticles and the subsequently reacted with thiourea and copper acetate. The immobilized laccase was obtained by fixing laccase on the surface of magnetic $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ nanoparticles via Cu^{2+} ion chelation. The $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ nanoparticles were characterized by TEM, XRD, XPS, FT-IR and M-H tests. The catalytic activities of free laccase and immobilized laccase were investigated. The results showed that the catalytic recovery of immobilized laccase on $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ nanoparticles was about 128.84%. The photothermal properties of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ nanoparticles were investigated, and the results showed that immobilized laccase on $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ nanoparticles (1.4 mg/mL) could raise the temperature of the system from 25.1°C to 47.1°C within 120 min. The photothermal degradation of immobilized laccase towards dyes and dye wastewater

was also investigated. The results showed that the immobilized laccase could decolorize azo dyes and dyes wastewater was 96-99% within 90-150 min, and the degradation rate of dye and dye wastewater remained about 82% after 10 consecutive reuses.

KEY WORDS: $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ nanoparticles, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ nanoparticles, Immobilized laccase, Catalytic activity, Photothermal degradation, Triphenylmethane dyes, Azo dyes, Dye wastewater

Wei Yuhang (Chemistry)

Supervised by Chen Zhiming

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
第 1 章 绪论.....	1
1.1 光热转换材料.....	2
1.1.1 金属纳米材料.....	2
1.1.2 半导体纳米材料.....	2
1.1.3 Fe_3O_4 纳米材料.....	3
1.1.4 碳基纳米材料.....	4
1.1.5 有机高分子纳米材料.....	4
1.2 漆酶.....	5
1.3 漆酶的固定化技术.....	7
1.3.1 物理吸附法.....	7
1.3.2 包埋法.....	7
1.3.3 包封法.....	8
1.3.4 共价固定法.....	9
1.3.5 交联法.....	10
1.4 固定化漆酶的应用.....	10
1.4.1 废水处理.....	10
1.4.2 染料降解.....	11
1.4.3 木质素降解.....	12
1.4.4 生物传感器.....	12
1.4.5 生物燃料电池.....	12
1.5 选题指导思想与研究意义.....	13
第 2 章 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶的制备及其催化活性研究.....	14
2.1 实验试剂及仪器.....	15
2.1.1 主要实验试剂.....	15
2.1.2 主要实验仪器.....	15
2.2 实验方案.....	15
2.2.1 磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶的制备.....	15
2.2.2 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶催化性能研究.....	17
2.2.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶降解染料及其废水.....	21
2.3 结果与讨论.....	25
2.3.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子的表征与分析.....	25
2.3.2 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶催化性能研究.....	29
2.3.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶染料和染料废水降解研究.....	34
2.4 小结.....	40
第 3 章 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶的制备及其催化活性研究.....	41
3.1 实验试剂及仪器.....	42
3.1.1 主要实验试剂.....	42

3.1.2 主要实验仪器.....	42
3.2 实验方案.....	42
3.2.1 磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶的制备.....	42
3.2.2 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶催化性能研究.....	43
3.2.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶降解染料及其废水.....	48
3.3 结果与讨论.....	52
3.3.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子的表征与分析.....	52
3.3.2 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶催化性能研究.....	57
3.3.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶染料及其废水降解研究.....	63
3.4 小结.....	68
总结与展望.....	69
参考文献.....	70
攻读学位期间发表的学术论文目录.....	80
致 谢.....	81

第1章 绪论

由于快速的城市化和工业化，环境污染已成为一个严重的问题^[1]。污染环境的主要污染物有农药、药物化合物、微塑料、内分泌干扰物、有机染料、重金属等，它们会导致土壤、水和空气污染^[2]。各种化学和物理方法已被用于污染物去除，如吸附、高级氧化、离子交换、膜过滤、沉淀、人工湿地、混凝和电化学方法^[3]。但这些传统方法存在一些缺陷，如成本过高、污泥产生、非特异性和二次污染的可能性等^[4]。因此，环保和高效的生物修复方法引起了人们的兴趣，它可以定义为利用细菌、真菌、绿色植物或其酶通过细胞内积累、生物吸附或酶转化将被污染的环境恢复到自然状态的过程^[5]。影响生物降解速率的因素有环境条件（温度、pH 值、曝气）、污染物特性（浓度、化学结构、疏水性）和土壤特征（厚度、污染物老化等）^[6]。酶是高度特异性的催化剂，在微生物修复中起着重要作用。来自各种细菌、真菌、藻类和植物的不同酶，如水解酶、过氧化物酶、卤素酶、氧化还原酶、单加氧酶或双加氧酶以及磷酸三酯酶已被用于有机和无机底物的生物修复^[7]。在这些酶中，漆酶属于蓝色多铜氧化酶家族，即单体、二聚体或三聚体糖蛋白，在三个氧化还原位点中含有四个铜原子（一个 I 型顺磁性蓝铜、一个顺磁性 II 型非蓝铜、两个抗磁性 III 型自旋耦合 Cu-Cu 对），由于其广泛的底物范围和高氧化还原电位，在环境应用中获得了更多的关注^[8]。漆酶是在氮限制生长条件下产生的次生代谢产物^[9]。这种苯二醇氧化还原酶 EC（1.10.3.2）可以氧化各种酚类和非酚类化合物，包括氯化酚、二恶英、除草剂、杀虫剂、甲酚、药品、合成染料、个人护理产品等。漆酶也被称为绿色催化剂，因为它能够氧化不同底物，并产生水分子这种完全无毒的副产物^[10]。漆酶广泛应用于工业生产过程，例如漆酶被用于果汁澄清、酚类污染物的检测、染料脱色^[11]、微塑料降解^[12]、抗生素去除^[13]、除草剂降解^[14]和新兴污染物转化等。在各种污染物中，染料是环境中的主要污染物之一。染料是高度可溶的有机化合物，具有发色团和辅助色基。据报道，全球 10-15% 的废水来自纺织工业^[15]，染料是纺织工业废水的主要污染物。此外，纺织工业中产生的染料废水的 80% 被排放进入河流中^[16]。因此，开发高效的染料脱色方法至关重要，漆酶降解就是其中一种脱色方法。

1.1 光热转换材料

太阳作为太阳系的核心，每时每刻都在散发着耀眼的光芒，这些光芒跨越空间来到地球并为地球上的一切生命活动提供了几乎所有的能量^[17]。发射紫外线、可见光和红外线这三种光线是太阳辐射能量的表现形式，而这些光线中光子拥有各不相同的振动频率，所以当物体被这些光线碰撞时，其中的一部分光子会被吸收，从而使其升温。因此，大气、陆地和海洋会吸收到达地球的太阳光大部分能量，从而促使自身变暖，这是自然界最基本的过程之一。这种光到热的转换过程被称为光热转换。光激发材料的光热性能主要取决于两个关键的固有特性——光收集能力和光热转换效率。光热材料已用于许多方面，例如光催化^[18, 19]、太阳能发电^[20, 21]和水处理^[22, 23]。光热载体的选择非常重要，它直接决定了光热转换的效率^[24, 25]。不同种类的材料各有优势，一般分为金属纳米材料、半导体材料、碳基纳米材料、有机高分子纳米材料。

1.1.1 金属纳米材料

局部表面等离子体共振（LSPR）通常被用作贵金属材料光热转换的驱动力^[26]。局部表面等离子体共振的基本原理是金属纳米材料表面自由电子会被光源激发形成电子云，并和带正电的原子核之间产生电荷的相互作用，从而导致一系列不规则震荡^[27]。如果入射激光与金属颗粒表面自由电子的共振频率相匹配，纳米颗粒的电子就会被集体激发，产生强大的局部电场，引发强烈的相干振荡。在此过程中，大量激光能量可能被吸收并转化为等离子体振荡的能量，然后动能可通过能量辐射转化为热能并释放到外部环境中^[28]。

目前，应用最广泛的金属光热纳米材料有金、银、钯和钼。在这些贵金属材料中，金纳米粒子因其制备简单、光热性能较好、价格较低而更受欢迎^[29]。金纳米粒子的光热性能非常好，光热转换效率几乎可以达到 50%。它们被广泛应用于癌症的成像和治疗。同时，在危害检测方面，研究人员将侧流免疫分析条与金纳米粒子的光热效应结合起来检测细菌，与目测相比，检测灵敏度提高了一个数量级。此外，只需更换识别分子即可实现对其他病原体或生物标记物的检测^[30, 31]。

1.1.2 半导体纳米材料

半导体纳米材料由于其具有成本低廉，制备过程简单等优点，被人们认为

是一种光热转换的特殊候选材料。半导体纳米材料包括金属氧化物和硫族化合物等，其具有可调控的吸收波长以及近红外区域强消光系数的优势^[32]。同时，为了扩大半导体纳米材料在可见光区的吸收范围，对半导体纳米材料进行掺杂是一种经典方法。掺杂后的半导体纳米材料不仅可以提高光吸收率，还可以增加非辐射重组的概率，从而提高光热转换效率^[33]。

半导体纳米材料引入缺陷或杂质能够产生一些变化，如图 1-1 所示。包括：

(1) 带内能态的出现；(2) 带隙的缩小；(3) 简并掺杂半导体中杂质带的形成。

N 掺杂 TiO_2 于 2001 年首次制备，它具有可见光吸收能力^[34]。基于这种现象，人们开始在 TiO_2 的 O 位上进行掺杂 C、S、P、N 等非金属阴离子以及在 Ti 位上掺杂 Fe、Co、Ni、Cr、Cu 等过渡金属阳离子的研究^[35-39]。另外，人们还发现半导体纳米材料的带隙变窄会导致吸收边的加宽和红移，同时在光照下可以将额外的能量转化为热量。目前，人们已经研究了多种窄带隙半导体，包括黑色 TiO_2 ^[40]， Ti_2O_3 ^[41]， MoO_3 ^[42]和 Fe_3O_4 ^[43, 44]，并且已被开发为光热转换器。

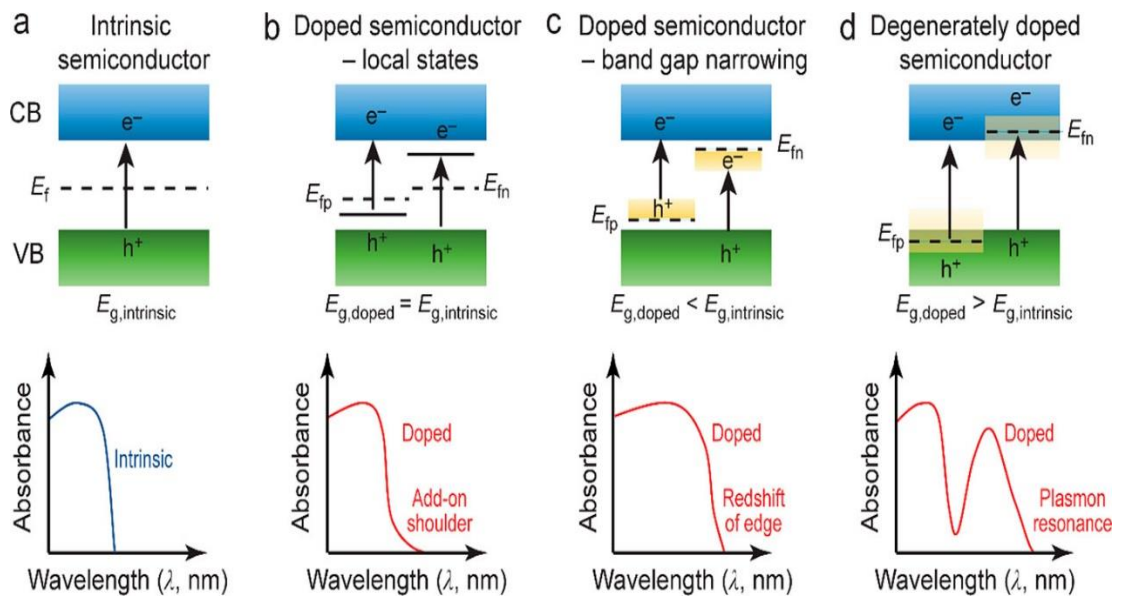


图 1-1 半导体能带结构工程示意图(a) 本征半导体(b) 掺杂诱导在带隙中形成的浅能级能态(c) 掺杂诱导在带隙中形成的深层能态(d) 去能级掺杂诱导的 LSPR^[45]

Figure 1-1 Schematics for engineering the band structures of semiconductors (a) An intrinsic semiconductor (b) Doping-induced formation of shallow-level energy states in the bandgap (c) Doping-induced formation of deep-level energy states in the bandgap (d) Degenerate-doping-induced LSPR^[45]

1.1.3 Fe_3O_4 纳米材料

Fe_3O_4 纳米粒子吸收光的范围广，对可见光到近红外都能吸收。 Fe_3O_4 纳米

粒子在近红外区的吸收归因于 Fe(III)3d 电子的间接带隙跃迁。电子跃迁有助于 Fe_3O_4 的吸收, 即 Fe(II) 和 Fe(III) 离子在可见光-近红外波长范围内的 d-d 跃迁。由于 Fe_3O_4 优异的光热性能, 所以现在人们对于 Fe_3O_4 光热性能方面的应用研究越来越关注。Pan 等^[46]系统地研究了 Fe_3O_4 纳米粒子的磁场增强光热效应 (MFEP), MFEP 引起的温度升高明显大于孤立的光热和磁热效应的总和, 这归因于热声子瓶颈效应, Fe_3O_4 纳米粒子的 MFEP 可以作为癌症治疗的有效治疗方法。Zhao 等^[47]研究利用 Fe_3O_4 纳米粒子的光热效应, 在太阳照射下单层玻璃可通过 Fe_3O_4 纳米颗粒涂层的光热效应实现“自加热”。这可以有效降低外部温度差, 从而增强隔热性能。Chu 等^[48]研究了 Fe_3O_4 磁性纳米粒子用于癌症治疗的光热效应, 表面功能化的 Fe_3O_4 纳米粒子可被食管癌细胞吸收, 并且不会对细胞结构和活力产生明显影响。然而, 在 808 nm 波长的激光照射下, 食管癌细胞的活力会受到有效抑制, 细胞器在与近红外激光激活的 Fe_3O_4 纳米粒子一起孵育时会受到明显的破坏。经过光热治疗后, 肿瘤组织结构出现断裂, 细胞明显萎缩, 部分细胞最终解体。Lyu 等^[49]通过共价固定的方式将醛标记的枯草芽孢杆菌脂肪酶 A 成功固定在 Fe_3O_4 单分散微球上, 并且固定化率超过了 90%。固定化脂肪酶的活性和热稳定性得到提高, 经过 10 个循环后, 固定化脂肪酶的活性保持在 90%。

1.1.4 碳基纳米材料

碳元素在自然界中含量丰富, 其存在于各种生命形式中。碳原子具有 sp 、 sp^2 、 sp^3 这三种杂化状态, 碳的同素异形体的形成就是这三种杂化状态的碳原子相互结合导致的。所有的碳同素异形体都是光热材料的优秀候选者, 因为它们具有高化学稳定性、宽带光吸收^[50]、轻质和低成本, 它们的光热转换依赖于松散的 π 电子的激发和弛豫到基态。碳基纳米材料制备方法的改变会导致碳基纳米材料结构参数 (尺寸、形状、掺杂和层数) 的改变, 而结构参数的改变最终会导致碳基纳米材料的光学特性的改变。例如, 由剥离石墨层和碳泡沫层组成的双层结构已经被制备出来, 这种多孔纳米结构的反射率在 250 ~ 2250 nm 的太阳光谱范围内低至 3%^[51]。

1.1.5 有机高分子纳米材料

具有共轭结构的有机高分子纳米材料因其具有分子设计的多变性、对近红外光的强吸收、高光热转换效率和良好的生物相容性等优点, 现在已成为一类

新的光热纳米材料^[52]。有机高分子纳米材料与碳基纳米材料类似，它们都因为其离域 π 电子的非辐射弛豫而具有可见光和近红外区的吸收能力。研究发现以最基本的共轭结构为基础，可以设计出各种共轭聚合物纳米材料。共轭聚合物可部分抑制分子荧光并增强非辐射弛豫，实现高效光热转换。

为了进一步提高光热转换效率和增强共轭聚合物的稳定性，超分子组装体被广泛用于制备新型聚合物基光热材料^[53, 54]。与传统的分子结构设计不同，该组装基于灵活的非共价分子间相互作用，如范德华相互作用、氢键和静电相互作用。与聚集引起的猝灭效应类似，分子的本征荧光发射在超分子体系中可以大量猝灭，从而导致热生成的增强^[55]。此外，通过形成超分子结构可以显著提高材料的稳定性。单体分子被困在超分子集合中，只有少数外围分子能受到外部环境的影响^[56]。光热分子的分离可以有效地避免分解或氧化，从而保持其光物理化学性质，可以大大提高不稳定分子的光热转化。由于超分子组装的这些独特优势，人们一直致力于探索新的组装方法和提高光-热转换性能^[57]。

1.2 漆酶

漆酶（Laccase, EC 1.10.3.2）是一种含有多个铜离子的多酚氧化酶^[58]，属于蓝色多铜家族，因其最早于漆树的分泌物中分离提取得到而被命名为漆酶。漆酶广泛存在于植物、真菌、细菌和昆虫中，因此根据漆酶的来源将其分为植物漆酶、真菌漆酶、细菌漆酶和昆虫漆酶四种类型^[59]。多年来，人们对真菌漆酶和细菌漆酶的研究相对较多，而植物漆酶和昆虫漆酶的研究相对较少。同时漆酶在不同的物种体内发挥的作用各不相同，细菌漆酶主要在黑色素生成、孢子壁防御、形态变化和铜离子解毒中发挥作用^[60, 61]，真菌漆酶主要与色素生成、植物病害和木质素降解有关^[62, 63]，植物漆酶与木质素的生物合成密切相关^[64]，昆虫漆酶的主要功能是控制表皮的骨化^[65]。

漆酶是一种糖蛋白，分子量范围为 50 至 140 kDa。它们的氨基酸序列可以跨越 220 到 800 个氨基酸，结构从单体、同源二聚体和异源二聚体到多聚体，形式不等，并且漆酶的一般形式是具有突出的铜氧还蛋白环的三结构域结构。这些结构域结合参与分子间电子转移反应的铜中心，构成漆酶的催化核心，如图 1-2 所示。漆酶的催化活性由嵌入漆酶结构中的四个铜原子保证，其中包括一个 I 型（T1）蓝色顺磁性铜，一个 II 型（T2）非蓝色顺磁性铜和两个 III 型

(T3) 自旋耦合抗磁性 Cu-Cu 对^[66]。T1 铜作为衬底氧化位点，因为它具有三角取向的高氧化还原电位。T2 和 T3 铜通过还原氧气来实现水的释放。漆酶的突出特性是稳定性，这是由结构的碳水化合物部分确保的，该部分提供构象的稳定性，以及对蛋白水解和自由基的抵抗力。漆酶的这些特性，如结构、分子量、氧化还原电位 (E°) 和稳定性，因漆酶的不同来源而异。由于漆酶的催化副产物只有水分子，因此其被称为“绿色催化剂”。

漆酶在三个不同位点存在的四个铜原子 (I 型、II 型、III 型) 的帮助下可以广泛催化降解合成染料、芳香族化合物、酚类化合物和脂肪胺等污染物。同时，由于漆酶与其他催化剂相比具有高特异性、催化能力和环境安全性等优点，使得漆酶在现代工业应用中有着巨大潜力和广阔前景。然而，游离漆酶操作稳定性和酶回收率较低，各种应用的大规模开发受到限制^[67]。酶的固定化技术是一种理想的技术，这种技术可以在酶催化反应过程中提高酶的操作稳定性、热稳定性、可重复使用性和对离子条件变化的耐受性。固定化的优化是工业过程中有效回收和经济过程的主要组成部分之一^[68]。

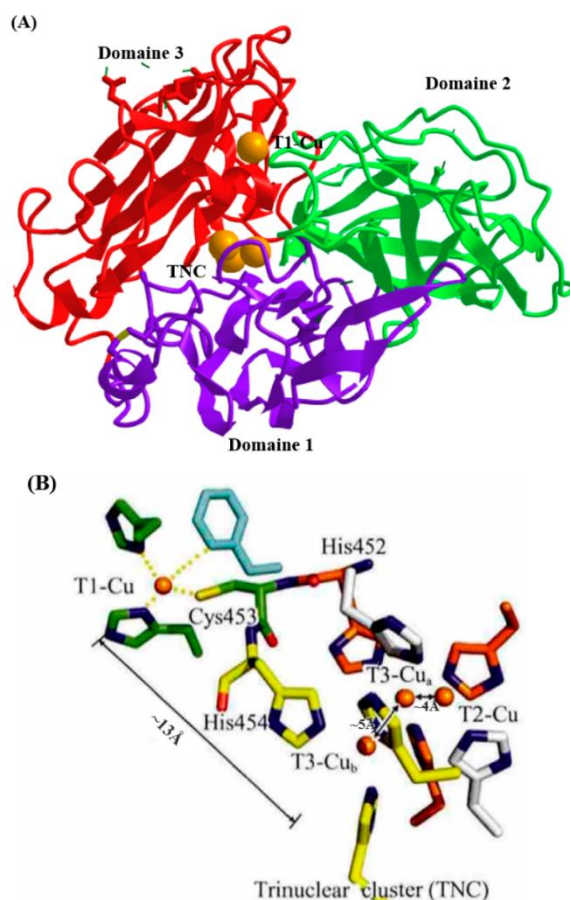


图 1-2 漆酶的整体结构 (a) 及四个活性铜中心的结构 (b) ^[69]

Figure 1-2 Overall structure of laccase (a) and structure of the four active copper centres(b)^[69]

1.3 漆酶的固定化技术

酶的固定化被定义为附着在不溶性载体上,使其能够回收重复进行催化反应。酶固定化载体的选择需要从多个方面进行考虑,例如载体必须具有无毒性,能够和生物相容并且需要具有固定所需的功能基团。另外,还需要额外考虑载体的实际生产成本问题。因而,载体的选择是有限的。根据酶和载体之间接触的性质,漆酶的固定化技术主要分为物理吸附法、包埋法、包封法、共价固定法、交联法。

1.3.1 物理吸附法

物理吸附法是指通过离子相互作用、范德华力或偶极相互作用将酶附着在不溶性载体的外表面的一种固定方式^[70],酶固定化的载体材料包括无机固体、合成聚合物和生物聚合物^[71]。虽然物理吸附技术因其操作简便而被广泛采用,但由于混合条件导致的 pH 值变化、离子强度变化、酶脱落和酶表面磨损等缺点,导致物理吸附技术的应用受到限制^[72]。Nguyen 等^[73]采用颗粒活性炭(10 mg/g)固定漆酶,研究了填料床柱上漆酶对废水中 4 种微量污染物的降解效果。颗粒活性炭(GAC)固定化漆酶在酸性 pH 为 3.5 ~ 4 时表现出比游离酶更高的稳定性。由于微污染物在 GAC 载体表面的吸附有利于漆酶对微污染物的降解,因此 GAC 固定化漆酶对微污染物的降解效果比单独使用 GAC 载体要好 90%。

1.3.2 包埋法

包埋法是指通过共价或非共价键将酶笼罩在纤维网络中^[74],也可以说是将酶包裹在具有晶格结构或聚合物膜的载体材料或纤维中的一种固定技术^[75]。包埋技术最广泛使用的包裹载体是海藻酸盐、明胶、卡拉胶、水凝胶结构、海藻酸-壳聚糖微胶囊和金属连接酶珠等聚合物^[76]。包埋技术可以通过对载体聚合物结构孔径的控制实现反应底物或产物的自由扩散,从而避免酶的掉落,如图 1-3。同时包埋法使用的载体不会和所要固定的酶发生反应,因此可以使所包埋的酶不易发生变性。包埋法具有多种优点,例如较高的酶负载能力、较低的制造成本、较强的机械稳定性以及较低的传质^[77]。包埋法使用的载体不是一成不变的,可以通过对载体材料进行改性,以此达到固定酶的最适反应环境^[78]。最常用的酶包埋方法是在添加多价反离子后对聚阳离子或聚阴离子聚合物进行凝胶化^[79]。然而,包埋技术也存在缺点。例如,随着聚合延伸,基质厚度的增加,会出现

传质对抗，导致底物无法深入扩散到酶的功能位点^[80]。此外，如果载体的孔径较大，可能会导致被包裹的酶漏出，进而降低载体的负载能力。Ma 等^[81]分析了来自白腐真菌的漆酶对不同合成染料的降解效率，漆酶被固定在壳聚糖珠中，并以京尼平(Genipin)作为交联剂。固定化酶具有更高的 pH 值和操作稳定性，在 11 个循环后仍有 60%的残余活性。漆酶固定化壳聚糖珠与京尼平交联剂在 36 小时内实现了 60.81%的最大染料脱色率。Lassouane 等^[82]将海藻酸钙用于固定化漆酶，将制备的固定化漆酶加入含有双酚 a 的溶液中，双酚 a 的降解能够在短时间内实现，即使在固定化漆酶重复降解双酚 a 溶液达到 10 个循环后，固定化漆酶依旧能够维持 70%的双酚 a 降解效率。

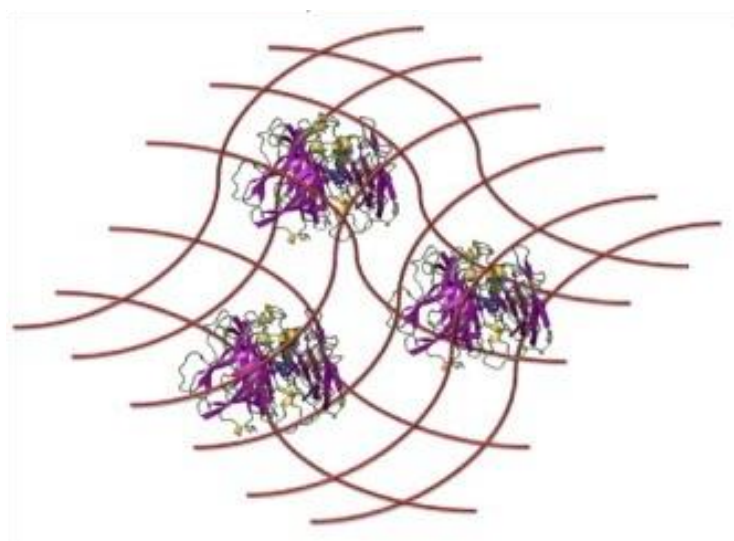


图 1-3 包埋法固定化漆酶^[83]

Figure 1-3 Immobilisation of laccase by embedding^[83]

1.3.3 包封法

包封法是将多种生物大分子封装到不同的聚合物基质中的一种固定技术^[84]。包封和包埋类似，但是包封的酶和细胞在受控空间溶液中是可以自由移动的。包封的目的是将酶和细胞溶液固定在具有多孔膜的微小囊泡中，体积较大的酶无法进出胶囊，而微小的底物或产物则可以在半透膜上自由移动^[85]。Gill 等^[86]研究了漆酶在海藻酸盐、海藻酸盐硅酸盐和溶胶-凝胶三种不同载体材料上的包封效果。这三种载体材料在催化效率、封装效率和操作稳定性方面存在差异。固载在溶胶-凝胶基质上的漆酶包封率最高，达 90.4%。固定化酶的催化效率高于游离酶。溶胶-凝胶支撑基质具有储存稳定性和可重复使用性，残余酶活性为 82.75%。另一项用海藻酸盐、硅-海藻酸盐复合凝胶和硅溶胶-凝胶包封漆酶的

研究表明,包封后的酶可以保存长达 6 周。海藻酸硅复合材料的包封效率相对较高。为了避免酶与环境直接接触,提高酶的催化效率,包封技术使用一层薄膜将反应系统封装在一起,如图 1-4 所示。同时,随着材料科学的发展,包封技术使用的材料有了更强的特性,增强了固定酶的形态稳定性,减少了酶的渗漏。但是包封技术也有其缺点,由于反应物在包封的膜空间内扩散严重,一旦反应产物聚集速度加快就可能导致膜破裂^[87]。

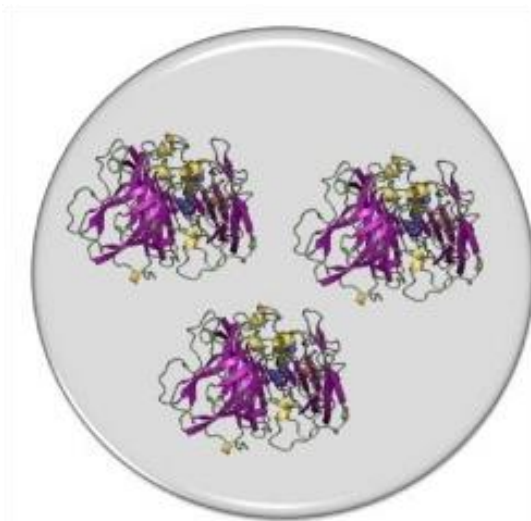


图 1-4 包封法固定化漆酶^[83]

Figure 1-4 Immobilisation of laccase by encapsulation^[83]

1.3.4 共价固定法

共价固定法是目前使用最广泛的漆酶固定方法。这种方法的原理是通过激活载体表面的化学基团来与酶上的亲核基团发生反应^[88]。由于赖氨酸是蛋白质表面的常见物质且反应活性很高,因此大多数酶都是利用赖氨酸中含有的氨基进行共价固定^[89]。共价固定法的载体一般基于惰性载体或者市售的活性载体^[90]。共价固定的载体应包含短间隔臂和高密度活性基团,这些特性是漆酶多点附着所必需的。共价固定具有不可逆结合和高稳定性等优点,但构象变化是一个在酶结合过程中的重要限制因素^[83]。Liu 等^[91]使用硅化和凝胶活化的二氧化硅纳米颗粒固定漆酶,提高了漆酶的热稳定性和操作稳定性。在 60°C 下运行 4 h 后保留了 61% 的残余活性,在 10 次循环后保留了 55% 的活性。利用磁性载体共价固定漆酶,可使固定酶在磁场中快速分离聚合^[92, 93]。Huang 等^[94]研究制备了一种四氨基酞菁铜-Fe₃O₄ 的磁性纳米颗粒复合材料,并将其与漆酶一起使用,固定化率为 20%。经过 1 个月的储存,发现固定化漆酶保留了 85% 的活性,而

游离漆酶仅保留了 30% 的活性。操作稳定性也得到了提高, 5 次循环后, 初始活性保持了 80%。

1.3.5 交联法

交联法固定是一种仅通过共价键相互连接就可以将酶固定在一起的方法^[95]。自固定化酶具有出色的特定活性和溶剂稳定性, 可用于工业开发和多种用途。自固定化球形酶(球酶)结构是通过在水油乳液中添加交联剂获得的。Jordan 等^[68]首次提出了将漆酶固定在球酶上的研究, 球酶经聚乙烯亚胺和乙醇胺后包被漆酶, 在温度为 60-70 °C 和 pH 值为 2 时, 漆酶的温度稳定性和酸稳定性分别提高了 2 倍和 4 倍。

双功能交联剂(如二醛、二胺、二酯)被广泛用于无载体的固定化技术。交联酶晶体和交联酶聚集体基于双功能自固定技术的原理, 具有很高的操作稳定性^[68]。漆酶与酸性膨胀胶原交联形成薄膜, 这些薄膜使用丹宁酸作为介质, 有助于改善胶原蛋白薄膜的热性能和机械性能^[96]。

1.4 固定化漆酶的应用

固定化漆酶比游离漆酶具有更长的使用寿命、更高的稳定性和更强的环境耐受性, 所以固定化漆酶被广泛应用于废水处理、染料降解、木质素降解、生物传感器和生物燃料电池。

1.4.1 废水处理

酶生物转化技术在废水处理领域引起了越来越多的关注, 因为它们能够在温和的条件下消除有毒化合物, 并且生物降解副产物较少^[97]。由于酶的底物特异性、降低生物催化剂对冲击负载效应的敏感性、高反应速率以及氧化剂的有效利用和在低底物浓度下的有效处理, 因此使用酶进行废水处理是有利的^[98]。从工业废水和环境上去除酚类化合物非常重要, 因为这些化合物对水生生物具有高毒性, 并且占有机污染物的最大比例^[99]。酚类化合物在许多工业过程中广泛使用, 如塑料和树脂的制造、木材的保存、石油的提炼、造纸、染料、农药、纺织品、药物和抗氧化剂^[100, 101], 因此它们在工业废水中占很大比例。大多数这些化合物没有被废水处理厂从液体部分去除, 而是被转移到污泥中。更重要的是, 它们不会被处理厂的活性污泥降解, 因此最终通过废水排放进入环境, 并通过农业应用成为生物固体^[102, 103]。由于其固有的毒性, 这些化合物与健康

问题和环境污染息息相关^[104]。因此，需要利用酶将这些化合物降解或转化为可降解或无毒的化合物^[105]。

漆酶能降解多种酚类化合物，且无严重副作用，这引起了人们对污染废水解毒的关注。这种酶不需要外来的辅助底物，使用容易获得的氧作为电子受体，而且漆酶氧化形成的自由基绕过了形成致癌胺的步骤。酚类衍生物被漆酶氧化后形成的大多是不溶性产物，很容易通过过滤或沉淀去除^[106]。Patel 等^[107]研究通过 3-氨基丙基三乙氧基硅烷和戊二醛将漆酶固定在 Cu 和磁性 Cu/Fe₂O₄ 纳米颗粒(NPs)上，使得其具有高效的酶负载和较高的相对活性。同时，该固定化漆酶对双酚 A 的降解率达到 99.3%，是相同条件下游离酶降解效果的 3.9 倍。

1.4.2 染料降解

纺织和染料工业是水污染的主要来源，其排出的废水中含有 10-30% 的初始染料，由于这些染料的不可生物降解性和复杂的分子结构，很难对其进行处理。裂解酶降解染料的最关键步骤是裂解染料的发色团，使染料片段更容易被其他专业性较低的生物催化剂生物降解。活性染料分子的化学结构和替代基团（如偶氮、硝基和磺基）的类型决定了染料的脱色率。由于染料对生物氧化具有很强的抵抗力，而且对活性污泥的吸附性很差，因此污水染料的生物处理过程效率很低。使用物理或化学方法（如吸附、沉淀、化学降解和光降解）进行脱色具有经济和方法上的劣势，不仅耗时，而且大多效果不佳。由于对污水排放到生态系统中制定了严格的法规和限制，许多研究将重点放在微生物上，因为微生物能够对这些染料进行脱色和生物降解。染料废水的酶处理方法因其反应条件温和，不会产生有毒污泥等二次污染而备受关注。Ma 等^[81]将从绒毛栓菌中引入的，京尼平交联剂活化的壳聚糖珠作为一种高度稳定的漆酶生物催化剂。固定化漆酶对酸性黑 172 染料的脱色率达到 77.49%。此外，载体支持的漆酶显示出良好的重复使用潜力，在连续使用 11 次后，剩余活性保留率大于 55%。它还表现出很高的储存稳定性，在 4℃ 下储存 30 天后，其原始活性保持在 57.14% 以上。Alsaiani 等^[108]使用戊二醛作为交联剂将漆酶固定在磁性氧化铁（Fe₃O₄）和铜铁氧体（CuFe₂O₄）纳米粒子载体上，成功制备出含有磁性的固定化漆酶。Fe₃O₄ 和 CuFe₂O₄ 纳米粒子固定化漆酶表现出对阴离子染料直接红 23(DR23) 的降解作用，在 60min 内对 DR23 的降解率分别为 83.0% 和 89.0%。同时，研究了固定化漆酶用于 DR23 染料生物降解的可重复使用性，连续 6 个

循环后脱色效率依然超过 70.0%。

1.4.3 木质素降解

在纸浆和造纸工业中，木质素降解、脱墨、沥青控制、废水解毒、生物制浆和纤维接枝影响纸张的物理、化学和机械性能^[109]。为了获得高质量的纸张，应在蒸煮后去除造成深色结构的嵌入木质素。传统的做法是使用氯基化学制剂进行漂白，这样会产生各种氯有机衍生物，一旦释放到环境中就会产生毒性^[110]。与其他酶（木聚糖酶和甘露聚糖酶）相比，漆酶对纸浆的最终产量没有降低作用^[111]。在纸浆工业中使用漆酶可改善纸浆特性，合理降低 Kappa 数值（残留木质素含量），提高纸张亮度，减少氯的消耗^[112]。Amin 等^[113]将漆酶固定在具有磁性的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{KIT-6}$ 多孔纳米复合材料上，制备的固定化漆酶由于在疏水性粒子液体中具有高稳定性，可将其应用于降解橄榄果渣中的木质素和酚类提取物。固定化漆酶加入橄榄果渣中降解 6 h，检测后发现橄榄果渣中的木质素和苯酚的降解率分别为 77.3%和 76.5%。并且在连续 11 次降解橄榄渣后，固定化漆酶依旧保持 70%的降解能力。另外，将制备的固定化漆酶室温放置 21 天后，其催化活性依旧保持在 70%以上。

1.4.4 生物传感器

由于许多行业都会释放酚类化合物，因此有必要对环境中的酚类化合物进行检测和定量。由于这些化合物在环境中具有毒性和持久性，因此在评估环境样本的总毒性时，对它们进行定量非常重要。大多数用于定性和定量测定多酚的分析方法昂贵、耗时，需要多个操作步骤、昂贵的试剂和分离步骤，并产生大量不环保的废水。利用漆酶修饰的生物传感器已被开发出来，用于检测漆酶电子供体（酚类化合物）以及监测氧气和漆酶抑制剂。Rawal 等^[114]在银纳米粒子（AgNPs）/羧基多壁碳纳米管（cMWCNT）/聚苯胺（PANI）层修饰的金（Au）电极上共价固定了漆酶，并将其用作检测茶叶、酒精饮料和药物制剂中酚类物质含量的生物传感器。该生物传感器的线性范围、响应时间和检测限分别为 0.1-500 μM 、6 s 和 0.1 μM ，并且在重复使用 200 次、超过 4 个月后仍能保持 80% 的活性。

1.4.5 生物燃料电池

漆酶具有在高电极电位下将氧直接还原成水的四电子还原特性，这促进了漆酶在生物燃料电池阴极区的应用。Barrière 等^[115]制造了一种生物燃料电池，

其由葡萄糖氧化酶为基础的阳极和漆酶为基础的阴极组成的。以钼基氧化还原聚合物为介质将酶固定在石墨电极上，在 0.25V 电池电压下，生物燃料电池的最大功率密度为 $16 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 。

1.5 选题指导思想与研究意义

漆酶是一种使用广泛的多酚氧化酶，对多种底物都具有良好的催化降解能力，且催化降解的最终产物无毒。然而，漆酶是一种生物催化剂，其对所处的环境十分敏感，存在着反应过程中容易失活、不易长期储存以及无法重复使用的缺点。将漆酶连接到载体材料表面属于酶的固定化修饰，这种修饰虽然能提高漆酶稳定性和可重复性，但固定化过程导致漆酶催化活性降低。因此，发展一种高酶活回收率的固定化漆酶具有重要的意义。此外，漆酶的催化活性在最适温度时最高，且反应温度低，漆酶的催化活性也低；反应温度过高时，漆酶易失活。

光热转换材料是一类可将光辐射转换为热能的功能材料，在太阳能光热利用和光热治疗等领域具有广泛的应用。能否将漆酶固定在光热转换材料表面，制备固定化漆酶；利用载体将吸收的光辐射转换为热量，使漆酶在低温条件下具有较高的催化活性，同时能最大限度地延长漆酶的使用寿命。这既能降低催化反应的能耗和生产成本，又能提高催化效率，符合当前国家“双碳”政策目标，具有重要意义。

本学位论文通过共价结合、 Cu^{2+} 螯合法制备出磁性固定化漆酶；再将磁性固定化漆酶应用于三苯甲烷类、偶氮类染料（染料废水）的光热降解。文中使用磁性光热材料作为游离漆酶固定化的载体，磁性光热载体同时具备磁性能和光热转换性能；磁性能可以赋予固定化漆酶可回收、重复使用的能力，并且操作简便，只需外加磁场就可以将固定酶从反应溶液中分离出来，这增加了漆酶的应用场景，降低了漆酶的使用成本；光热转换性能使得固定酶在光照环境中应用时，载体能够吸收太阳光并转化为热能，提高漆酶体系的温度，使体系温度接近漆酶的最适反应温度，提升漆酶的催化活性，提高反应速率。

第 2 章 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶的制备及其催化活性研究

三苯基甲烷 (TPM) 染料包括孔雀石绿 (MG)、甲基紫 (MV)、结晶紫 (CV) 和棉蓝 (CB) 等, 是近年来使用最广泛的合成染料之一。它们占纺织、制药、造纸、皮革、化妆品和食品行业所用染料的 30-40%^[116]。TPM 染料由一个中心碳原子连接的三个苯基组成的发色剂定义^[117]。不幸的是, TPM 染料是一种异生物外源性的, 具有至突变和致癌特性, 对人类健康构成重大风险。纺织业排放的污水中染料的典型浓度在 10-200 mg/L 之间。这些染料造成了近 20% 的水污染, 并且通常未经处理就排放到环境中。未经有效处理的 TPM 染料的广泛使用对环境, 特别是对水生生物和人类健康造成了不利影响^[118]。接触有毒染料会导致皮肤刺激、呼吸衰竭和哮喘等。因此, 必须将有毒染料从环境中去除。有几种物理化学方法, 如絮凝、过滤和光催化氧化, 可用于去除染料污染物。然而, 这些方法在实际应用中具有显着的缺点, 例如去除效率低、通用性低、运营成本相对较高和不可避免的污泥堆积。因此, 生物学方法被探索为一种可能的方法, 因为它们具有成本效益、可行、可持续和环保等优点。漆酶作为一种能够高效降解三苯甲烷类染料的生物酶, 引起了人们的关注。

本章首先通过共沉淀方法制备出磁性 Fe_3O_4 纳米粒子, 将 Fe_3O_4 纳米粒子和海藻酸钠溶液混合, 静置一段时间后, 由于海藻酸钠和 Fe_3O_4 中的 Fe^{3+} 发生络合作用, 使得海藻酸钠与 Fe_3O_4 发生交联, 经不完全碳化后, 制备表面具有丰富羧基的磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子。然后使用 EDC/NHS 活化碳层表面的羧基, 加入漆酶后成功制备出 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶。利用 SEM、TEM、XRD、XPS、FT-IR 测试手段对固定化漆酶进行了表征分析, 同时进行了固定化漆酶和游离漆酶的基础性能对比测试, 发现 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶的各项性能都不同程度优于游离漆酶, 并将 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶用于光热降解三苯甲烷染料及其废水。

2.1 实验试剂及仪器

2.1.1 主要实验试剂

阿拉丁生化科技股份有限公司：六水合三氯化铁(AR)、四水合氯化亚铁(AR)、PEG-2000(化学纯)、柠檬酸(AR)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(98.0%)、N-羟基琥珀酰亚胺(97.0%)、吗啉乙磺酸一水合物(99%)、考马斯亮蓝 G-250(AR)、氯化钙(AR)、乙腈(AR)、磷酸二氢钠(AR)、过硫酸铵(AR)、硫脲(AR)、L-半胱氨酸(99%)、孔雀石绿(AR)、灿烂绿(高级纯)、结晶紫(ACS)、淀粉(粉末)、乙酸(AR)、蔗糖(AR)、碳酸钠(AR)、十二烷基硫酸钠(超级纯)、酵母蛋白胨(用于微生物)；

国药集团化学试剂有限公司：氨水(AR)、PEG-200(化学纯)、氢氧化钠(AR)、无水乙醇(AR)、柠檬酸三钠(AR)、三氯化铬(AR)、六水合氯化钴(AR)、六水合硝酸锌(AR)、氯化钠(AR)、三水合硝酸铜(AR)、四水合硝酸镉(AR)、六水合硝酸镁(AR)、四氯化碳(AR)、磷酸氢二钠(AR)、脲(AR)、乙二胺四乙酸二钠(AR)、硫酸(AR)；

麦克林生化科技股份有限公司：海藻酸钠(AR)；

北京百灵威科技有限公司：愈创木酚(99%)、2,2-联氨双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(98%)；

阿达玛斯试剂有限公司：甲苯(AR)、氯苯(AR)、苯甲醛(AR)、吡啶(AR)、异丙醇(AR)、正己烷(AR)。

2.1.2 主要实验仪器

L6S 型紫外-可见分光光度计、扫描电子显微镜 (SEM、S-4800)、X 射线粉末衍射仪 (XRD、Smartlab 9kw)、透射电子显微镜 (TEM、JEM2100F)、傅立叶红外光谱(FT-IR、Thermo Scientific Nicolet iS20)、超导量子干涉磁测量系统(Quantum Design MPMS3)、X 射线光电子能谱仪(XPS、ESCALAB Xi+)。

2.2 实验方案

2.2.1 磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶的制备

2.2.1.1 Fe_3O_4 纳米粒子的制备

称取 0.36 g 四水合氯化亚铁，0.88 g 六水合三氯化铁以及 2.2 g PEG-2000 置于三颈烧瓶中，加入 50 mL 蒸馏水，超声分散后通入约 5 min 保护气；然后

在 65°C 水浴通保护气下加入 3 mL 氨水, 氨水添加完毕后, 先将三颈烧瓶在 65°C 水浴条件下反应加热 1.5 h, 然后将水浴锅温度升高至 93°C, 继续反应 1 h, 反应结束后令其自然冷却至室温, 蒸馏水洗涤 2 次。

2.2.1.2 Fe₃O₄@C 纳米粒子的制备

将 2.2.1.1 制备的 Fe₃O₄ 纳米粒子置于烧杯中加入 2 mL PEG-200 和 10 mL 蒸馏水, 超声分散均匀; 称取 0.8 g 海藻酸钠置于另一烧杯中, 加入 40 mL 蒸馏水, 磁力搅拌使其分散均匀; 然后将分散均匀的海藻酸钠溶液加入到 Fe₃O₄ 溶液中, 超声分散均匀; 静置 6 h 后, 转移至反应釜中, 于 180 °C 条件下加热 12 h, 反应结束后令其自然冷却至室温, 用蒸馏水洗涤 2 次后备用。

2.2.1.3 EDC-NHS 活化羧基

将 2.2.1.2 制备的 Fe₃O₄@C 纳米粒子置于三颈烧瓶中, 加入 91.68 mg EDC, 130.4 mg NHS 和 40 mL 20 Mm MES 缓冲溶液, 三颈烧瓶内的 pH 用 1 mol/L NaOH 调节至 5.2-5.5 之间; 于 30°C 水浴条件下反应 1 h, 反应结束后用蒸馏水洗涤 2 次。

2.2.1.4 Fe₃O₄@C-Laccase 纳米粒子的制备

将 2.2.1.3 制备的 Fe₃O₄@C 活化羧基后的纳米粒子分散至加入 48 mL 蒸馏水和 2 mL 漆酶溶液的三颈烧瓶中, 于 30°C 条件下水浴避光搅拌反应 12 h, 反应结束后用蒸馏水洗涤 1 次, 然后将储存于 100 mL 蒸馏水中备用。

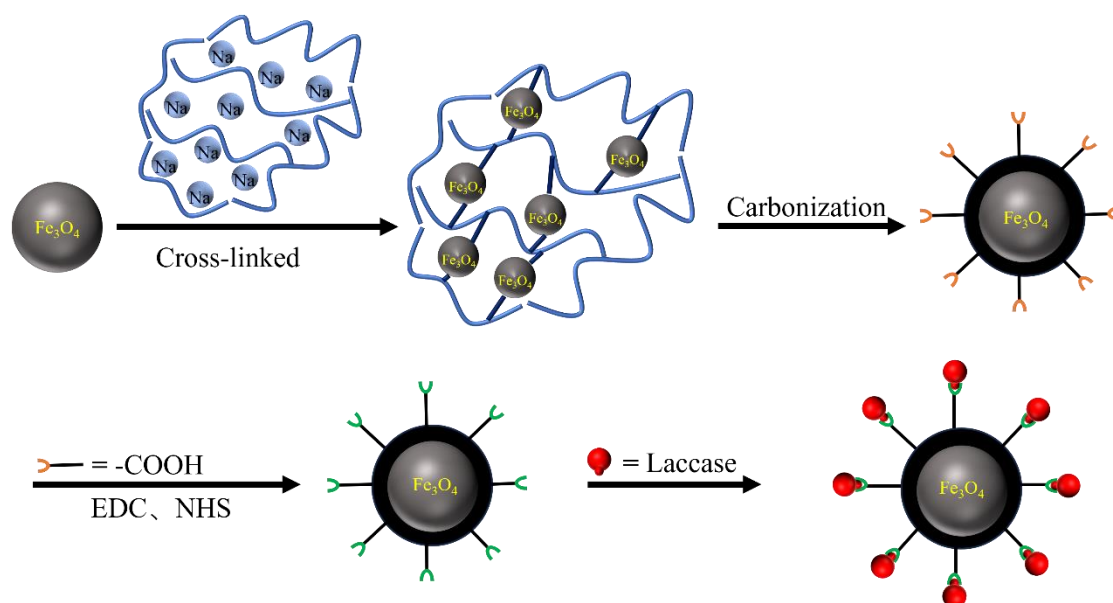


图 2-1 Fe₃O₄@C-Laccase 的制备过程示意图

Figure 2-1 Schematic illustration of the fabrication of Fe₃O₄@C-Laccase

2.2.2 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶性能研究

2.2.2.1 牛血清蛋白 (BSA) 标准曲线测试

称取 50 mg 考马斯亮蓝 G250 加入 500 mL 容量瓶中, 加入 25 mL 95%乙醇和 50 mL 85%W/V 磷酸, 用蒸馏水定容至 500 mL。用蒸馏水将牛血清蛋白配制成不同浓度的标准蛋白质溶液。采用考马斯亮蓝法测定溶液中 BSA 含量。

2.2.2.2 固定化漆酶固载量测试

称取 10 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 载体, 加入 2.292 mg EDC, 3.26 mg NHS 和 4 mL MES 缓冲溶液, 用 1 mol/L NaOH 将溶液 pH 调节至 5.2-5.5 之间, 然后将所有溶液加入离心管中并放入恒温混匀仪中, 在 30°C 条件下振荡反应 1 h 后, 用蒸馏水将 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子清洗 1 次后备用。

向装有 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子的离心管中加入 2 mL 稀释 10 倍的漆酶溶液, 放入恒温混匀仪中, 在 30°C 条件下避光振荡反应 12 h, 磁分离然后收集上清液待测。

取 0.1 mL 上清液加入离心管中, 加入蒸馏水 1 mL 和考马斯亮蓝溶液 5 mL, 分散均匀后反应 5 min, 测试反应后溶液在 595 nm 处的吸光度, 进行三组平行实验并记录数据。

2.2.2.3 游离漆酶和固定化漆酶最适 pH 测试

取 0.2 mL 游离漆酶 (粗酶溶液稀释 10 倍) 加入不同的离心管中, 向其中依次加入 2.8 mL pH=3.0、3.6、4.0、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、6.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液, 分散均匀后放入恒温混匀仪中, 先在 50°C 条件预热 5 min, 然后向离心管中加入 1 mL 1 mmol/L 同样在 50°C 条件预热 5 min 的愈创木酚溶液, 在 50°C 下的恒温混匀仪中震荡反应 20 s, 用紫外分光光度计测试 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。探究不同 pH 值下的游离漆酶催化活性变化。

取 4 mg 固定化漆酶加入不同的离心管中, 向其中依次加入 3.0 mL pH=3.0、3.6、4.0、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、6.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液, 分散均匀后放入恒温混匀仪中, 先在 50°C 条件预热 5 min, 然后向离心管中加入 1 mL 1 mmol/L 同样在 50°C 条件预热 5 min 的愈创木酚溶液, 在 50°C 下的恒温混匀仪中震荡反应 30 s 后进行磁分离处理, 取出上清液, 用紫外分光光度计测试上清液在 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。探究不同 pH 值

下的固定化漆酶催化活性变化。

2.2.2.4 游离漆酶和固定化漆酶最适温度测试

取 0.1 mL 游离漆酶（粗酶溶液稀释 10 倍）加入不同的离心管中，向其中加入 2.9 mL pH=4.8 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液，分散均匀后将其放入温度（30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃）不同的恒温混匀仪中先预热 5 min，然后向离心管中加入 1 mL 与之对应温度下同样预热 5 min 的 1 mmol/L 愈创木酚溶液，最后立即在恒温混匀仪中震荡反应 20 s，用紫外分光光度计测试 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。探究不同温度下的游离漆酶催化活性变化。

取 2 mg 固定化漆酶加入不同的离心管中，向其中加入 3.0 mL pH=4.8 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液，分散均匀后将其放入温度（30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃）不同的恒温混匀仪中先预热 5 min，然后向离心管中加入 1 mL 与之对应温度下同样预热 5 min 的 1 mmol/L 愈创木酚溶液，最后立即在恒温混匀仪中震荡反应 30 s 后进行磁分离处理，取出上清液，用紫外分光光度计测试上清液在 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。探究不同温度下的固定化漆酶催化活性变化。

2.2.2.5 游离漆酶和固定化漆酶酶活性测试

取 0.02 mL 游离漆酶（粗酶溶液稀释 10 倍）加入离心管中，向其中加入 2.98 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，分散均匀后放入恒温混匀仪中，先在 50℃条件预热 5 min，然后向离心管中加入 1 mL 1 mmol/L 同样在 50℃条件预热 5 min 的愈创木酚溶液，在 50℃下的恒温混匀仪中震荡反应 20 s，用紫外分光光度计测试 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

取 1.4 mg 固定酶加入离心管中，向其中加入 3.0 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，分散均匀后放入恒温混匀仪中，先在 55℃条件预热 5 min，然后向离心管中加入 1 mL 1 mmol/L 同样在 55℃条件预热 5 min 的愈创木酚溶液，在 55℃下的恒温混匀仪中震荡反应 40 s 后进行磁分离处理，取出上清液，用紫外分光光度计测试上清液在 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

2.2.2.6 游离漆酶和固定化漆酶热稳定性测试

取 2 mL 游离漆酶（粗酶溶液稀释 10 倍）加入离心管中，置于 60℃下的恒温混匀仪中加热 0-10 h，每隔 1 h 取 0.02 mL 游离漆酶，加入 2.98 mL pH=4.6 的

柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液和 1 mL 在 50°C 恒温混匀仪中预热 5 min 的 1 mmol/L 愈创木酚，然后将两者混合，在恒温混匀仪中反应 20 s，测试 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

取 1.4 mg 固定化漆酶分别置于不同的离心管中，在 60°C 下的恒温混匀仪中加热 0-10 h，每隔 1 h 取出一个固定化漆酶，加入 3 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，将其和 1 mL 1 mmol/L 的愈创木酚一起在 55°C 恒温混匀仪中预热 5 min，然后将两者混合，在恒温混匀仪中反应 30 s 后进行磁分离处理，取出上清液，测试上清液在 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

2.2.2.7 游离漆酶和固定化漆酶耐酸性测试

取 0.02 mL 游离漆酶（粗酶溶液稀释 10 倍）加入不同的离心管中，向其中依次加入 0.2 mL pH=3.0、3.6、4.0、4.6、5.0、5.4、6.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，然后于 30°C 恒温混匀仪中静置 5 h。静置结束后加入 2.78 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，将其和 1 mL 1 mmol/L 的愈创木酚一起在 50°C 恒温混匀仪中预热 5 min，然后将两者混合，在恒温混匀仪中反应 20 s，测试 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

取 1.4 mg 固定化漆酶加入不同的离心管中，向其中依次加入 0.02 mL 蒸馏水和 0.2 mL pH=3.0、3.6、4.0、4.6、5.0、5.4、6.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，然后于 30°C 恒温混匀仪中静置 5 h。静置结束后磁分离去除上清液，加入 3 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，将其和 1 mL 1 mmol/L 的愈创木酚一起在 55°C 恒温混匀仪中预热 5 min，然后将两者混合，在恒温混匀仪中反应 30 s 后进行磁分离处理，取出上清液，测试上清液在 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

2.2.2.8 游离漆酶和固定化漆酶有机物耐受性测试

取 0.02 mL 游离漆酶（粗酶溶液稀释 10 倍）加入不同的离心管中，向其中依次加入 0.2 mL 10 mM 不同有机溶剂（甲苯、氯苯、乙腈、苯甲醛、吡啶、异丙醇、正己烷、四氯化碳），然后于 30°C 恒温混匀仪中静置 2 h。静置结束后加入 2.78 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，将其和 1 mL 1 mmol/L 的愈创木酚一起在 50°C 恒温混匀仪中预热 5 min，然后将两者混合，在恒温混匀仪中反应 20 s，用紫外分光光度计测试 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录

数据。

取 1.4 mg 固定化漆酶加入不同的离心管中，向其中依次加入 0.02 mL 蒸馏水和 0.2 mL 10 mM 不同有机溶剂（甲苯、氯苯、乙腈、苯甲醛、吡啶、异丙醇、正己烷、四氯化碳），然后于 30℃恒温混匀仪中静置 2 h。静置结束后磁分离去除上清液，加入 3.0 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，将其和 1 mL 1 mmol/L 的愈创木酚一起在 55℃恒温混匀仪中预热 5 min，然后将两者混合，在恒温混匀仪中反应 30 s 后进行磁分离处理，取出上清液，测试上清液在 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

2.2.2.9 游离漆酶和固定化漆酶金属离子耐受性测试

取 0.02 mL 游离漆酶（粗酶溶液稀释 10 倍）加入不同的离心管中，向其中依次加入 0.2 mL 10 mM 不同金属离子溶液（ Cr^{3+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Na^{+} 、 Ca^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Mg^{2+} ），然后于 30℃恒温混匀仪中静置 2 h。静置结束后加入 2.78 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，将其和 1 mL 1 mmol/L 的愈创木酚一起在 50℃恒温混匀仪中预热 5 min，然后将两者混合，在恒温混匀仪中反应 20 s，用紫外分光光度计测试 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

取 1.4 mg 固定化漆酶加入不同的离心管中，向其中依次加入 0.02 mL 蒸馏水和 0.2 mL 10 mM 不同金属离子溶液（ Cr^{3+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Na^{+} 、 Ca^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Mg^{2+} ），然后于 30℃恒温混匀仪中静置 2 h。静置结束后磁分离去除上清液，加入 3.0 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，将其和 1 mL 1 mmol/L 的愈创木酚一起在 55℃恒温混匀仪中预热 5 min，然后将两者混合，在恒温混匀仪中反应 30 s 后进行磁分离处理，取出上清液，测试上清液在 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

2.2.2.10 游离漆酶和固定化漆酶抑制剂耐受性测试

取 0.02 mL 游离漆酶（粗酶溶液稀释 10 倍）加入不同的离心管中，向其中依次加入 0.2 mL 10 mM 不同抑制剂（磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、柠檬酸三钠、过硫酸铵、硫脲、脲、L-半胱氨酸、EDTA-2Na），然后于 30℃恒温混匀仪中静置 2 h。静置结束后加入 2.78 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，将其和 1 mL 1 mmol/L 的愈创木酚一起在 50℃恒温混匀仪中预热 5 min，然后将两者混合，在恒温混匀仪中反应 20 s，用紫外分光光度计测试 465 nm 处的吸光度。进行三

组平行实验并记录数据。

取 1.4 mg 固定化漆酶加入不同的离心管中，向其中依次加入 0.02 mL 蒸馏水和 0.2 mL 10 mM 不同抑制剂（磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、柠檬酸三钠、过硫酸铵、硫脲、脲、L-半胱氨酸、EDTA-2Na），然后于 30°C 恒温混匀仪中静置 2 h。静置结束后磁分离去除上清液，加入 3.0 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，将其和 1 mL 1 mmol/L 的愈创木酚一起在 55°C 恒温混匀仪中预热 5 min，然后将两者混合，在恒温混匀仪中反应 30 s 后进行磁分离处理，取出上清液，测试上清液在 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

2.2.2.11 游离漆酶和固定化漆酶米氏常数测试

取 0.02 mL 游离漆酶（粗酶溶液稀释 10 倍）加入不同的离心管中，向其中加入 2.98 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，将其和 1 mL（0.4~4.0 mM）的愈创木酚一起在 50°C 恒温混匀仪中预热 5 min，然后依次将两者混合，在恒温混匀仪中反应 20 s，测试 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

取 1.4 mg 固定化漆酶加入不同的离心管中，向其中加入 3.0 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，将其和 1 mL（0.4~4.0 mM）的愈创木酚一起在 55°C 恒温混匀仪中预热 5 min，然后依次将两者混合，在恒温混匀仪中反应 30 s 后进行磁分离处理，取出上清液，测试上清液在 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

2.2.2.12 愈创木酚标准曲线

取 0.2 mL 游离漆酶（粗酶溶液稀释 10 倍）加入不同的离心管中，向其中加入 2.8 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，将其和不同浓度（0.1~0.8 mM）的愈创木酚一起在 50°C 恒温混匀仪中预热 5 min，然后依次将两者混合，在恒温混匀仪中反应 20 s，测试 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

2.2.3 Fe₃O₄@C 固定化漆酶降解染料及其废水

2.2.3.1 孔雀石绿染料降解

标准曲线绘制：称取相应重量的孔雀石绿染料，分别配制 0.5 ~ 5.5 mg/L 的孔雀石绿溶液，然后取相应浓度的孔雀石绿溶液，用紫外分光光度计测试孔雀石绿溶液在 623 nm 处的吸光度。然后将孔雀石绿染料浓度于吸光度一一对应，制作标准曲线。

动力学研究：取 70 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以

pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的 400 mg/L 孔雀石绿溶液 49.4 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 2.6 mL, 然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下搅拌, 光照反应 0 ~ 90 min, 其间每间隔 10 min 从玻璃瓶中取出 2 mL 溶液, 磁分离, 测试上清液在 623 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

重复性研究: 取 35 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中, 向其中加入以 pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的 400 mg/L 孔雀石绿溶液 24.7 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 1.3 mL, 然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下光照搅拌 60 min, 最后将玻璃瓶中的溶液进行磁分离处理并取出上清液, 测试上清液在 623 nm 处的吸光度。将固定化漆酶重新利用并重复上述实验步骤 10 次。进行三组平行实验并记录数据。

2.2.3.2 灿烂绿染料降解

标准曲线绘制: 称取相应重量的灿烂绿染料, 分别配制 0.5 ~ 5.5 mg/L 的灿烂绿溶液, 然后取相应浓度的灿烂绿溶液, 用紫外分光光度计测试灿烂绿溶液在 624 nm 处的吸光度。然后将灿烂绿染料浓度于吸光度一一对应, 制作标准曲线。

动力学研究: 取 70 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中, 向其中加入以 pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的 400 mg/L 灿烂绿溶液 49.4 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 2.6 mL, 然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下搅拌, 光照反应 0 ~ 90 min, 其间每间隔 10 min 从玻璃瓶中取出 2 mL 溶液, 磁分离, 测试上清液在 624 nm 处的吸光度。进行三组平行实验。

重复性研究: 取 35 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中, 向其中加入以 pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的 400 mg/L 灿烂绿溶液 24.7 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 1.3 mL, 然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下光照搅拌 60 min, 最后将玻璃瓶中的溶液进行磁分离处理并取出上清液, 测试上清液在 624 nm 处的吸光度。将固定化漆酶重新利用并重复上述实验步骤 10 次。进行三组平行实验并记录数据。

2.2.3.3 结晶紫染料降解

标准曲线绘制: 称取相应重量的结晶紫染料, 分别配制 0.5 ~ 5.5 mg/L 的结晶紫溶液, 然后取相应浓度的结晶紫溶液, 用紫外分光光度计测试结晶紫溶液

在 589 nm 处的吸光度。然后将结晶紫染料浓度于吸光度一一对应，制作标准曲线。

动力学研究：取 70 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以 pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的 100 mg/L 结晶紫溶液 49.4 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 2.6 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下搅拌，光照反应 0 ~ 90 min，其间每间隔 10 min 从玻璃瓶中取出 2 mL 溶液，磁分离，测试上清液在 589 nm 处的吸光度。进行三组平行实验。

重复性研究：取 35 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以 pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的 100 mg/L 结晶紫溶液 24.7 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 1.3 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下光照搅拌 60 min，最后将玻璃瓶中的溶液进行磁分离处理并取出上清液，测试上清液在 589 nm 处的吸光度。将固定化漆酶重新利用并重复上述实验步骤 10 次。进行三组平行实验并记录数据。

2.2.3.4 混合染料降解

标准曲线绘制：称取相应重量的混合染料，分别配制 0.5 ~ 5.5 mg/L 的混合染料溶液，然后取相应浓度的混合染料溶液，用紫外分光光度计测试混合染料溶液在 609 nm 处的吸光度。然后将混合染料浓度于吸光度一一对应，制作标准曲线。

动力学研究：取 70 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以 pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的 150 mg/L 混合染料溶液（孔雀石绿：灿烂绿：结晶紫=1: 1: 1）49.4 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 2.6 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下搅拌，光照反应 0 ~ 90 min，其间每间隔 10 min 从玻璃瓶中取出 2 mL 溶液，磁分离，测试上清液在 609 nm 处的吸光度。进行三组平行实验。

重复性研究：取 35 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以 pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的 150 mg/L 混合染料溶液（孔雀石绿：灿烂绿：结晶紫=1: 1: 1）24.7 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 1.3 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下光照搅拌 60 min，最后将玻璃瓶中的溶液进行磁分离处理并取出上清液，测试上清液在 609 nm 处的吸光度。然后将固定化漆酶重新利用并重复上述实验步骤 10 次。进行三组平行实

验并记录数据。

2.2.3.5 孔雀石绿染料废水降解

动力学研究：取 70 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以模拟废水溶液配制的 400 mg/L 孔雀石绿染料废水 49.4 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 2.6 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下搅拌，光照反应 0 ~ 90 min，其间每间隔 10 min 从玻璃瓶中取出 2 mL 溶液，磁分离，测试上清液在 623 nm 处的吸光度。进行三组平行实验。

重复性研究：取 35 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以模拟废水溶液配制的 400 mg/L 孔雀石绿染料废水 24.7 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 1.3 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下光照搅拌 60 min，最后将玻璃瓶中的溶液进行磁分离得到上清液，测试上清液在 623 nm 处的吸光度。然后将固定化漆酶重新利用并重复上述实验步骤 10 次。进行三组平行实验并记录数据。

2.2.3.6 灿烂绿染料废水降解

动力学研究：取 70 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以模拟废水溶液配制的 400 mg/L 灿烂绿染料废水 49.4 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 2.6 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下搅拌，光照反应 0 ~ 90 min，其间每间隔 10 min 从玻璃瓶中取出 2 mL 溶液，磁分离，测试上清液在 624 nm 处的吸光度。进行三组平行实验。

重复性研究：取 35 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以模拟废水溶液配制的 400 mg/L 灿烂绿染料废水 24.7 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 1.3 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下光照搅拌 60 min，最后将玻璃瓶中的溶液进行磁分离得到上清液，测试上清液在 624 nm 处的吸光度。然后将固定化漆酶重新利用并重复上述实验步骤 10 次。进行三组平行实验并记录数据。

2.2.3.7 结晶紫染料废水降解

动力学研究：取 70 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以模拟废水溶液配制的 100 mg/L 结晶紫染料废水 49.4 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 2.6 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下搅拌，光照反应 0 ~ 90 min，其间每间隔 10 min 从玻璃瓶中取出 2 mL 溶液，磁分离，

测试上清液在 589 nm 处的吸光度。进行三组平行实验。

重复性研究：取 35 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以模拟废水溶液配制的 100 mg/L 结晶紫染料废水 24.7 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 1.3 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下光照搅拌 60 min，最后将玻璃瓶中的溶液进行磁分离得到上清液，测试上清液在 589 nm 处的吸光度。然后将固定化漆酶重新利用并重复上述实验步骤 10 次。进行三组平行实验并记录数据。

2.2.3.8 混合染料废水降解

动力学研究：取 70 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以模拟废水溶液配制的 150 mg/L 混合染料废水（孔雀石绿：灿烂绿：结晶紫=1: 1: 1）49.4 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 2.6 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下搅拌，光照反应 0 ~ 90 min，其间每间隔 10 min 从玻璃瓶中取出 2 mL 溶液，磁分离，测试上清液在 609 nm 处的吸光度。进行三组平行实验。

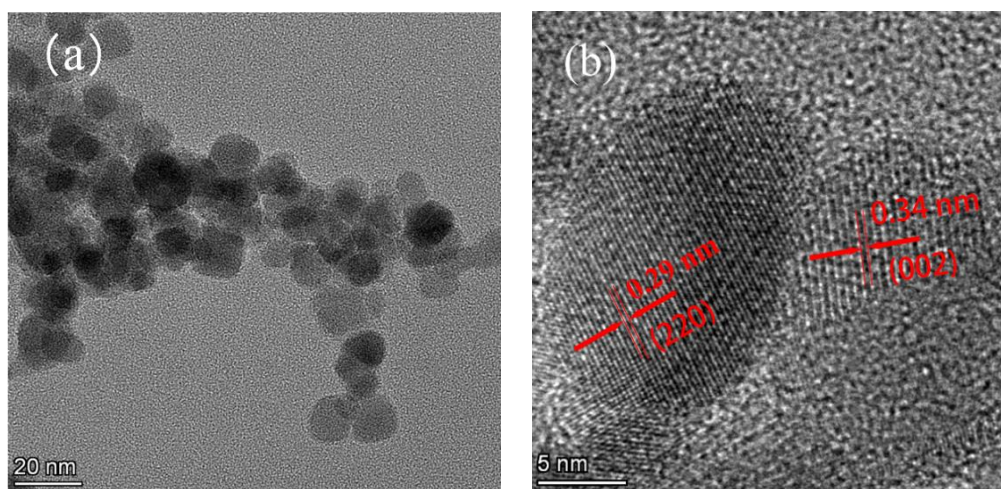
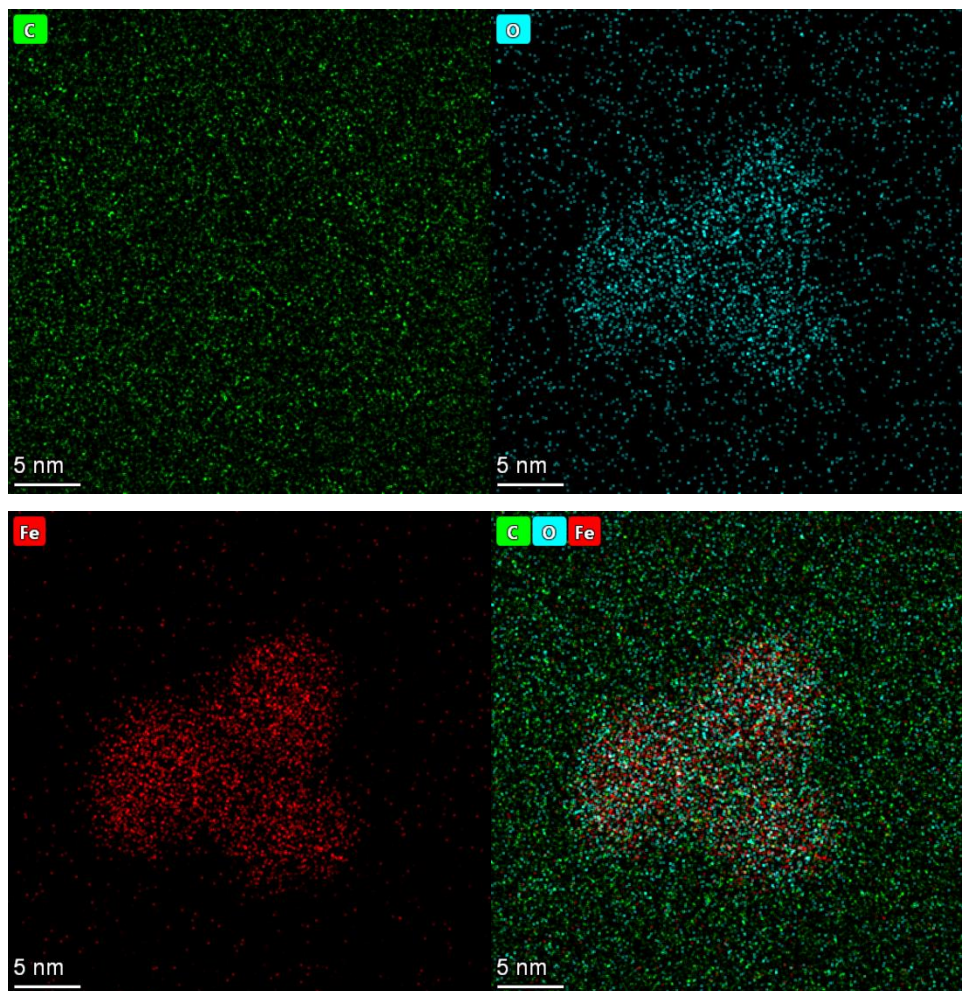
重复性研究：取 35 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以模拟废水溶液配制的 150 mg/L 混合染料废水（孔雀石绿：灿烂绿：结晶紫=1: 1: 1）24.7 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 1.3 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下光照搅拌 60 min，最后将玻璃瓶中的溶液进行磁分离得到上清液，测试上清液在 609 nm 处的吸光度。然后将固定化漆酶重新利用并重复上述实验步骤 10 次。进行三组平行实验并记录数据。

2.3 结果与讨论

2.3.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子的表征与分析

2.3.1.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子 TEM 表征与分析

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子的 TEM 和 Mapping 谱图分别如图 2-2、2-3 所示，从图 2-2（a）可以看出 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子是明显的核壳结构，平均粒径在 10 nm 左右。从图 2-2（b）可以观测到两种物质的晶格间距为 0.29 nm 和 0.34 nm，分别对应于 Fe_3O_4 与碳层的（220）和（002）晶面参数对应，结合 Mapping 图中所检测出的元素证明成功制备出 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子。

图 2-2 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子的 TEM(a)和 HRTEM(b)图Figure 2-2 TEM (a) and HRTEM (b) images of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ nanoparticles图 2-3 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子 EDS Mapping 图Figure 2-3 EDS mapping spectra of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ nanoparticles

2.3.1.2 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子 XRD 表征与分析

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子的 X 射线单晶衍射图谱如图 2-4 所示，衍射峰位置在

$2\theta=30.1^\circ, 35.4^\circ, 43.1^\circ, 53.4^\circ, 57.0^\circ, 62.5^\circ, 71.4^\circ, 74.5^\circ, 79.3^\circ$ 处对应的晶面分别是：(220)、(311)、(400)、(422)、(511)、(440)、(620)、(533)、(444)，衍射峰位置和强度与标准 PDF 卡片 JCPDS NO.19-0629 (Fe_3O_4) 相对应，表明 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 产品中包含 Fe_3O_4 纳米粒子。

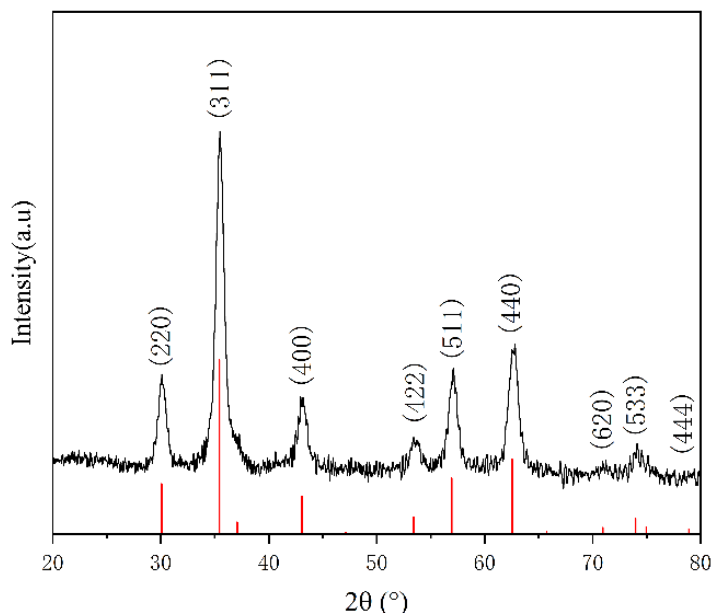


图 2-4 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子的 XRD 图

Figure 2-4 XRD pattern of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ nanoparticles

2.3.1.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子 FTIR 表征与分析

Fe_3O_4 纳米粒子、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 羧基化纳米粒子和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ -Laccase 纳米粒子在 $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ 范围内的傅里叶红外光谱谱图(a)-(d)如图 2-5 所示。 560 cm^{-1} 附近的吸收峰归因于 Fe-O 不对称振动^[128]， 3410 cm^{-1} 附近的吸收峰归因于 -OH 的振动^[129]，并且在所有光谱中都存在这两个特征峰，表明每一步中都存在 Fe_3O_4 纳米粒子。海藻酸钠水热碳化的过程中发生了脱水反应，碳层表面富含羧基、羟基等基团， 1000 cm^{-1} 附近的吸收峰归因于 -OH 的伸缩振动^[130]； 1400 cm^{-1} 附近的吸收峰归因于 C=O 的伸缩振动； 1620 cm^{-1} 附近的吸收峰归因于 C=C 键的振动^[131]。 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子经过 EDC-NHS 活化后形成酰胺键， 3100 cm^{-1} 附近的特征峰对应于酰胺基(-CONH-)^[132]。 2920 cm^{-1} 附近的吸收峰归因于 -CH₃ 的伸缩振动^[133]。这些表明， $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 成功将表面羧基活化用于漆酶固定。

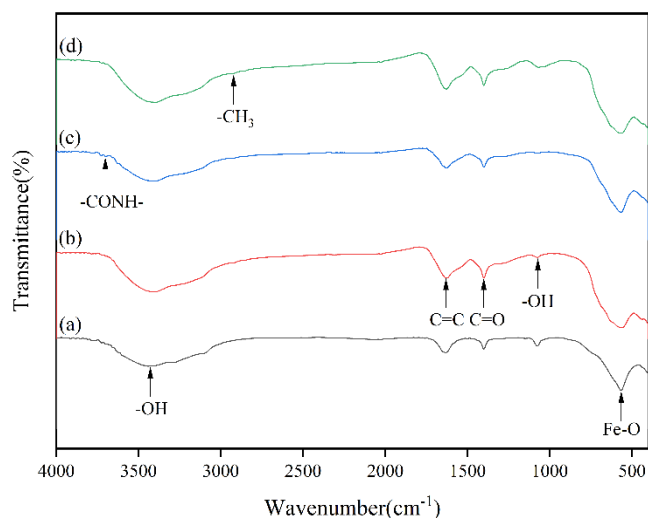
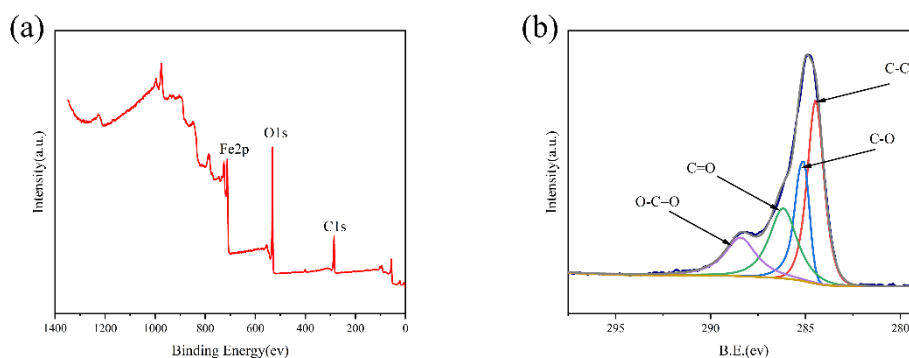


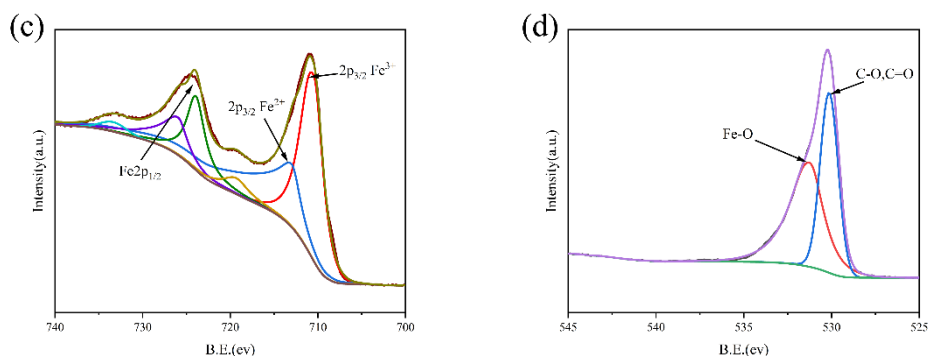
图 2-5 (a)Fe₃O₄、(b)Fe₃O₄@C、(c) Fe₃O₄@C 羧基化和(d)Fe₃O₄@C-Laccase 纳米粒子红外谱图

Figure 2-5 FT-IR spectra of (a) Fe₃O₄, (b) Fe₃O₄@C, (c) carboxyl-functionalized Fe₃O₄@C nanoparticles and (d) Fe₃O₄@C-Laccase nanoparticles

2.3.1.4 Fe₃O₄@C 纳米粒子 XPS 表征与分析

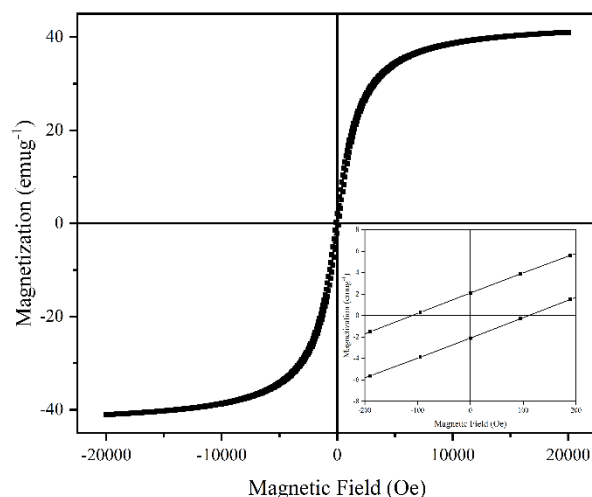
Fe₃O₄@C 纳米粒子的 XPS 表征及分析如图 2-6 所示。图 2-6(a)证明所测 Fe₃O₄@C 纳米粒子中含有 Fe、O 和 C 三种元素。图 2-6(b)是 C1s 的高分辨率谱图，其中可以分出 4 个峰 284.8、285.7、286.8 和 288.9 eV，分别归属于 C-C、C-O、C=O 和 O-C=O 基团^[134]。图 2-6(c)是 Fe 2p 的高分辨率谱图，Fe 2p 的峰值分别为 711.7 和 713.5 eV，对应 Fe²⁺和 Fe³⁺离子的 Fe 2p_{3/2}的结合能。峰值在 725.0 和 727.1 eV 附近，总是属于 Fe²⁺或 Fe³⁺的 Fe 2p_{1/2}^[119, 120]。结果证实了纳米 Fe₃O₄ 中存在 Fe²⁺和 Fe³⁺离子。图 2-6(d)是 O1s 的高分辨率谱图，可以分解为 531.6 eV 和 529.9 eV 的 2 个峰，分别对应为 C-O、C=O，Fe-O^[135]。通过 XPS 的测试可以证明制备出了 Fe₃O₄@C 纳米粒子。



图 2-6 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子的 XPS 表征图Figure 2-6 XPS spectra of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ nanoparticles

2.3.1.5 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子磁滞回线表征与分析

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子磁滞回线如图 2-7 所示，由图可知 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子的饱和磁化强度为 41 emug^{-1} ，矫顽力为 110 Oe，表明该磁性材料为铁磁性材料。

图 2-7 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子磁滞回线图Figure 2-7 Magnetic hysteresis loop of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ nanoparticle

2.3.2 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶催化性能研究

2.3.2.1 游离漆酶和固定化漆酶最适温度的探究

游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶的最适温度测试结果如图 2-8 所示。游离漆酶的最适温度为 50°C ， $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶的最适温度为 55°C ，但是当温度变化时，固定酶的活性变化相对平缓，表明固定酶具有更好的温度适应性，同时说明固定酶载体可以在一定程度上降低环境对漆酶的影响。

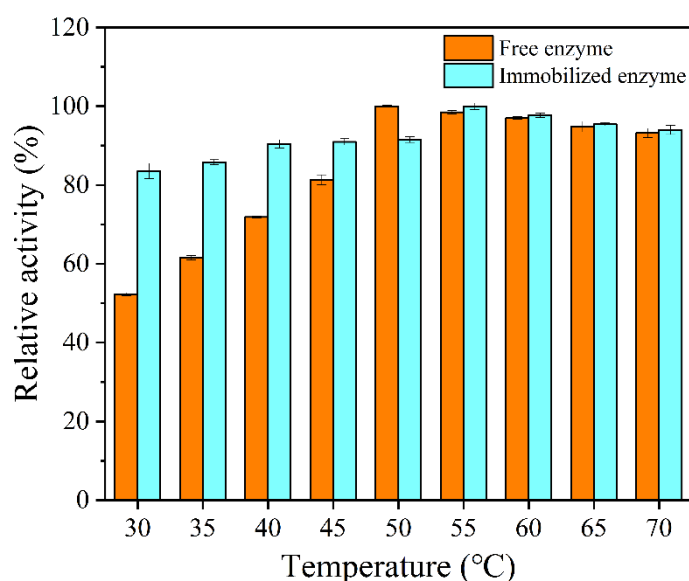


图 2-8 游离漆酶、固定化漆酶最适温度

Figure 2-8 Optimal temperature of free laccase and immobilized laccase

2.3.2.2 游离漆酶和固定化漆酶最适 pH 的探究

游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶的最适 pH 测试结果相同，从图 2-9 可以看出，游离漆酶的最适 pH 为 4.6， $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶的最适 pH 也为 4.6。但是 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶在不同酸性环境中其催化活性变化相对平缓，可能的原因是漆酶分子经过固定化过程后，载体减少了漆酶与外部环境的接触，固定酶的环境催化稳定性得到提高，对酸性条件的耐受性也随之提高。

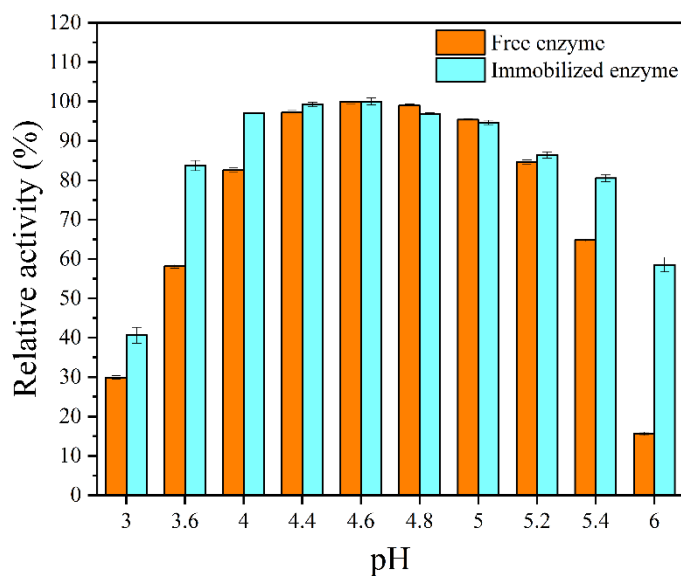


图 2-9 游离漆酶、固定化漆酶最适 pH

Figure 2-9 Optimal pH of free laccase and immobilized laccase

2.3.2.3 游离漆酶和固定化漆酶热稳定性探究

游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶的热稳定性测试结果如图 2-10 所示, 在 60°C 环境下加热 10 h 后磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶依然有 56.01% 的相对活性保留, 而游离漆酶仅有 49.41% 的相对活性保留。在 10 h 耐热性测试过程中, 固定酶的催化活性一直高于游离酶, 说明制备的磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 载体有效的保护了漆酶, 提高了漆酶的热稳定性。

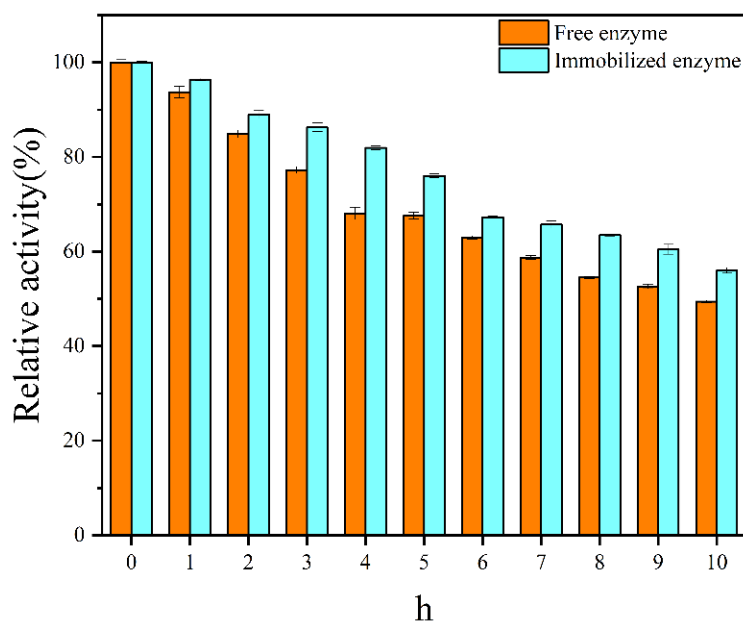


图 2-10 游离漆酶、固定化漆酶热稳定性

Figure 2-10 Thermostabilities of free laccase and immobilized laccase

2.3.2.4 游离漆酶和固定化漆酶耐酸性探究

将游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶放入恒温混匀仪中, 分别加入不同 pH (pH=3.0~6.0) 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液中恒温保存 5 h 以测试游离酶和固定酶的耐酸性变化, 结果如图 2-11 所示。从图中可以看出, 即使在 pH=3.0 的酸性环境中固定酶依然有 71.71% 的相对活性保留, 相比于游离漆酶的 60.65% 提升了 11.06%。从整体来看, 固定酶和游离酶相比具有更高的酸稳定性, 且在 pH 变化时催化活性变化较为温和, 这是由于游离漆酶经过磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 载体固定后得到了保护, 从而提升了耐酸性。

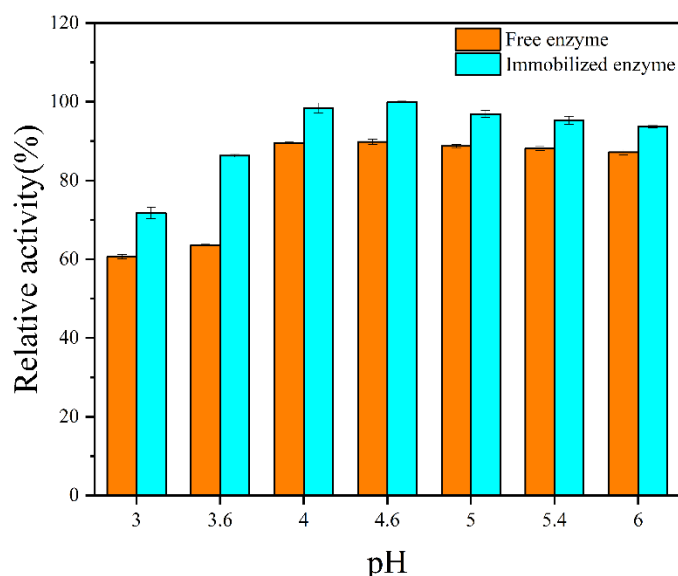


图 2-11 游离漆酶、固定化漆酶耐酸性

Figure 2-11 pH stabilities of free laccase and immobilized laccase

2.3.2.5 游离漆酶和固定化漆酶金属离子抗性探究

在工业水体污染中，重金属离子、有机物以及蛋白抑制剂对污水的治理有重大影响，酶催化剂在治理蕴含这些物质的污水时，既要维持自身催化活性又要考虑这些污染物对酶的影响。因此，将游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶放入相同浓度不同金属离子的溶液中，并在 30°C 条件下放置 2 h，结果如图 2-12 所示。 Cr^{3+} 、 Cd^{2+} 和 Mg^{2+} 对游离漆酶的影响最大，而固定酶可以减弱这种影响。即使经过不同金属离子的干扰，固定酶整体相对活性依然保持在 70% 以上，而游离漆酶活性最低时只有 58.44%，这表明磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶可以明显减弱重金属离子对漆酶活性的抑制。

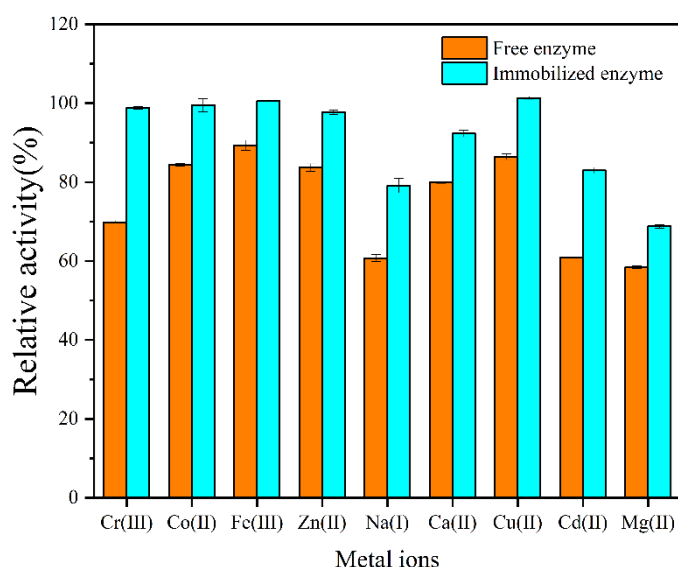


图 2-12 游离漆酶、固定化漆酶金属离子抗性

Figure 2-12 Metal ions tolerances of free laccase and immobilized laccase

2.3.2.6 游离漆酶和固定化漆酶有机物耐受性探究

游离漆酶和磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶在八种不同有机试剂溶液中放置 2 h, 其相对活性的变化如图 2-13 所示。可以看出, 固定酶在这八种有机试剂溶液中都维持了较高的催化活性, 特别是在苯甲醛、正己烷和四氯化碳中, 游离漆酶的相对活性已经降低到 56.98%~63.08%, 而固定化漆酶的相对活性依然保持在 80%左右, 表明磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 载体增强了漆酶对有机物的耐受性。

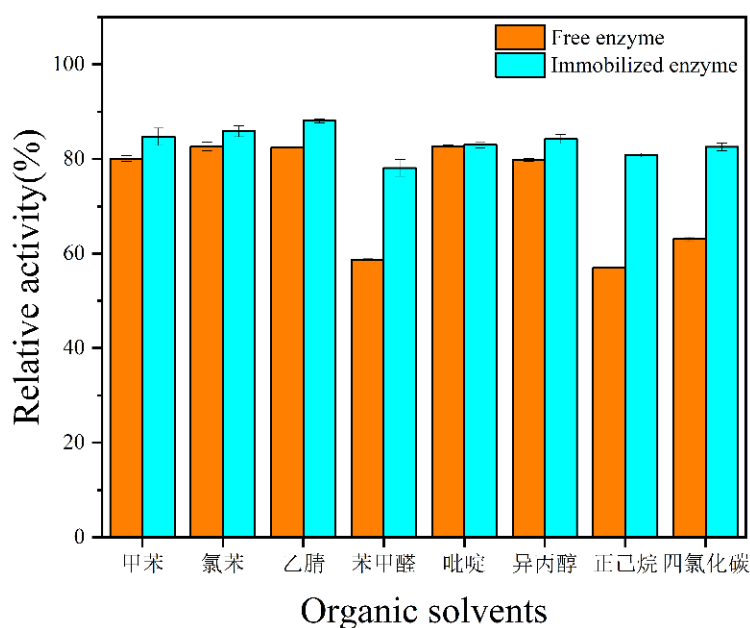


图 2-13 游离漆酶、固定化漆酶有机物抗性

Figure 2-13 Organic solvents tolerances of free laccase and immobilized laccase

2.3.2.7 游离漆酶和固定化漆酶抑制剂耐受性探究

漆酶的本质是蛋白质, 因此易受蛋白抑制剂的影响而损失催化活性, 将游离漆酶和磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶分别放入八种抑制剂溶液中静置 2 h, 测试相对活性结果如图 2-14 所示。从图中可以看出, 固定酶对于抑制剂的抗性明显高于游离酶。在 L-半胱氨酸溶液中, 游离酶相对活性仅仅只剩下 20.41%, 而固定酶的相对活性损失很少, 依旧还有 92.51% 的相对活性。结果表明磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶能够在抑制剂环境中依旧保持催化活性。

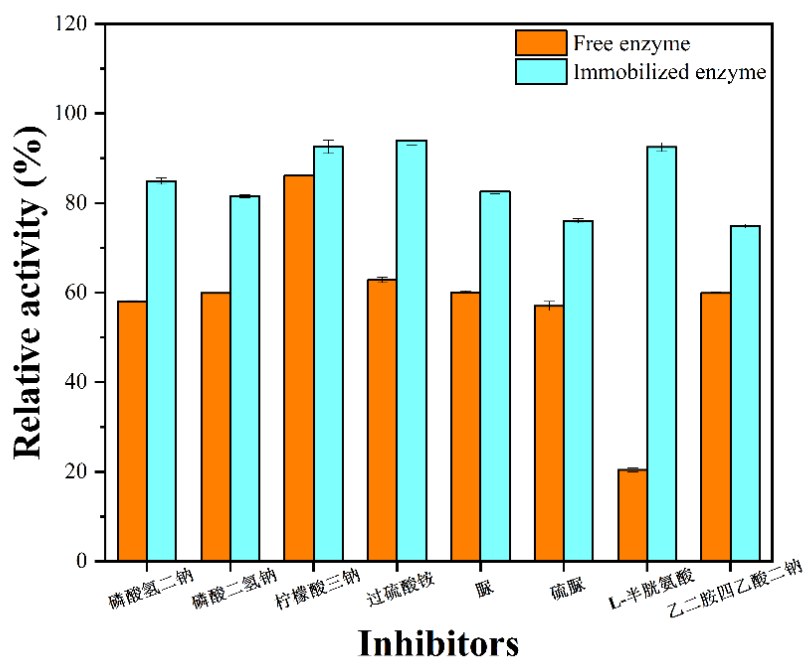


图 2-14 游离漆酶、固定化漆酶抑制剂抗性

Figure 2-14 Inhibitors tolerances of free laccase and immobilized laccase

2.3.2.8 游离漆酶和固定化漆酶米氏常数探究

米氏常数(K_m)是酶的一个特性常数, K_m 的大小只与酶的性质有关, 而与酶浓度无关。 K_m 可以判断酶的专一性和天然底物。 $1/K_m$ 可近似地表示酶对底物亲和力的大小, 越大亲和力越大, 最适底物时酶的亲和力最大, K_m 最小。

利用双倒数法测试游离漆酶和磁性 $Fe_3O_4@C$ 固定化漆酶的米氏常数, 结果如表 2-2 所示。游离酶和固定酶的米氏常数 K_m 值分别为 0.348 和 0.921, 最大反应速率 V_{max} 分别为 0.686 和 0.524。

表 2-1 游离漆酶和 $Fe_3O_4@C$ -Laccase 米氏常数Table2-1 Michaelis constant of free laccase and $Fe_3O_4@C$ -Laccase

项目	拟合曲线	V_{max}	K_m
游离漆酶	$y=0.6861x + 1.9727$	0.686	0.348
$Fe_3O_4@C$ -Laccase	$y= 0.5236x + 0.5687$	0.524	0.921

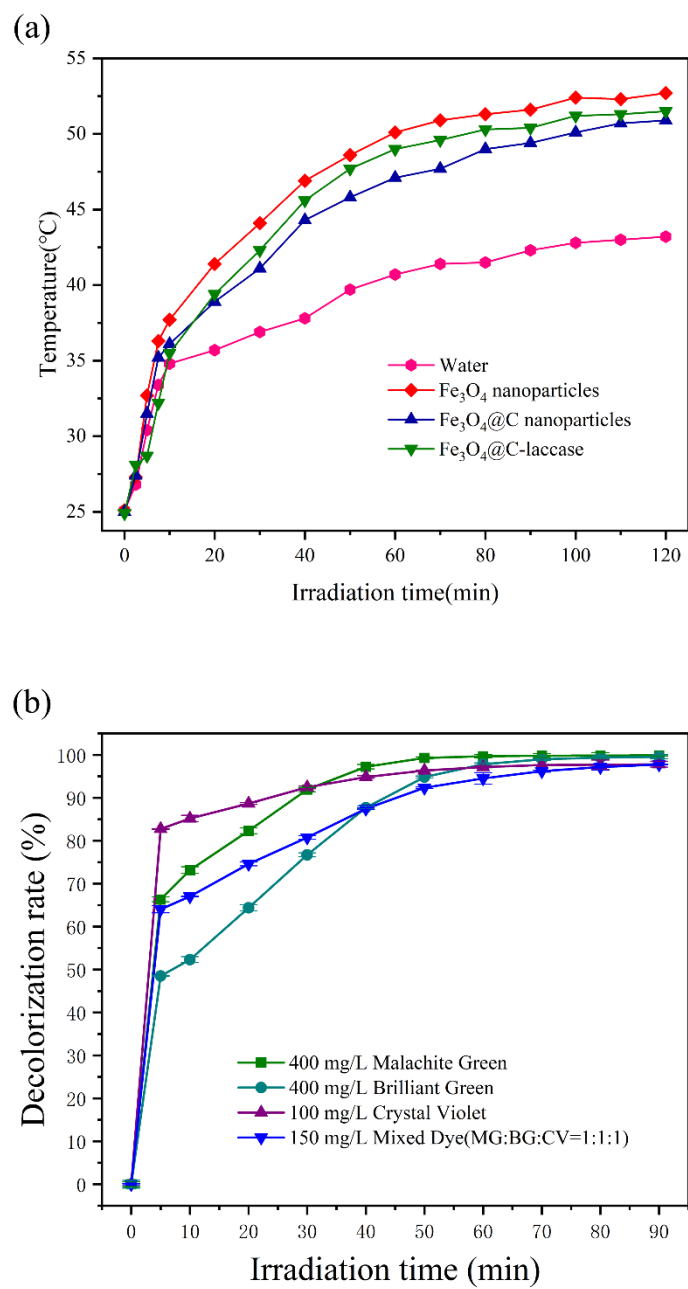
2.3.3 $Fe_3O_4@C$ 固定化漆酶降解染料及其废水研究

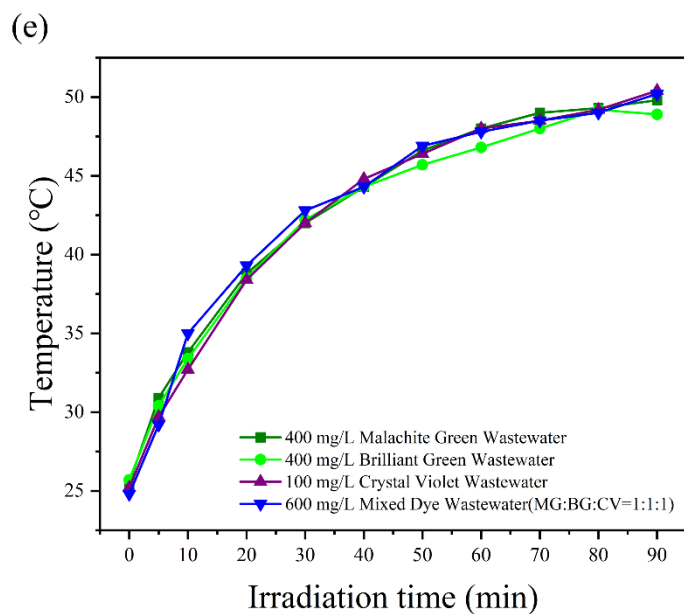
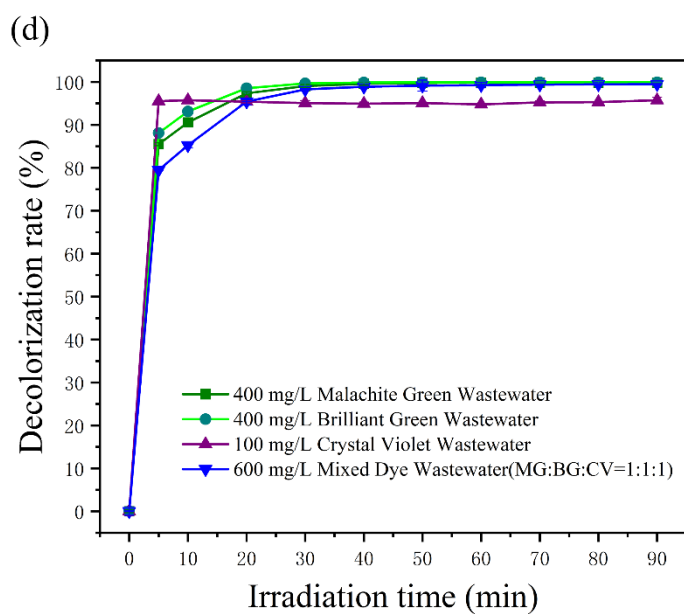
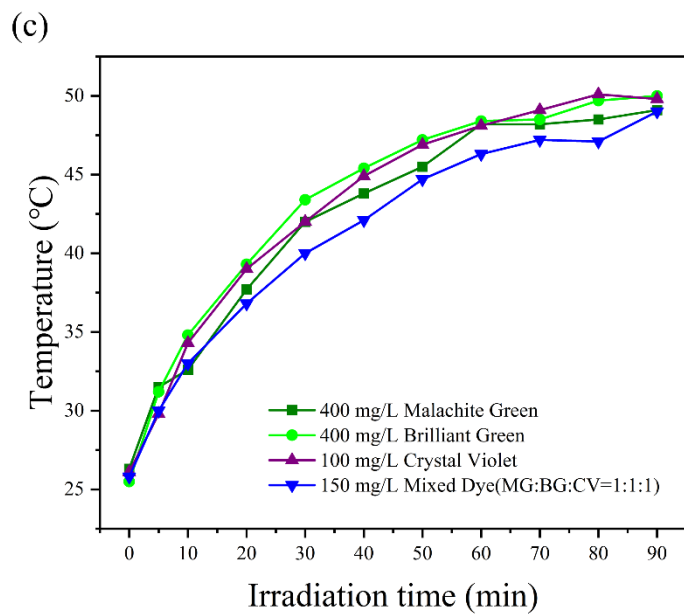
2.3.3.1 染料、染料废水光照降解动力学和光照升温动力学探究

三苯甲烷类染料是近年来使用最广泛的合成染料之一, 漆酶能够高效降解

这些合成染料，为工业染料废水治理提供了生物降解途径。本章选取了三种染料（孔雀石绿 400 mg/L、灿烂绿 400 mg/L、结晶紫 100 mg/L 和混合染料 150/600 mg/L（孔雀石绿：灿烂绿：结晶紫=1：1：1））作为磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶降解染料和染料废水的实例。

本章降解三苯甲烷类染料及其废水，我们用相同重量的固定化漆酶加入到体积和初始温度不同的染料及其废水中，光照 120 min，间隔相同时间测试溶液中的染料浓度，计算出固定酶对不同染料及其废水的降解率，以此来测试 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶的应用前景。取相同重量的 Fe_3O_4 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ -Laccase 分别加入到体积和初始温度相同的蒸馏水中，将其置于具有磁力搅拌的氙灯光源下光照 0-120 min，分别测量蒸馏水、 Fe_3O_4 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ -Laccase 体系的温度曲线，如图 2-15(a)所示。由图中可以看出，纯蒸馏水体系经过 120 min 光照后体系温度变为 43.2℃，加入 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ -Laccase 光照 120 min 后的体系温度显著上升，达到 51.5℃，温度相对提升了 8.3℃，表明制备的磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 载体具有高效的光热转换性能，既能降低催化反应的能耗和生产成本，又能够有效提升固定酶的染料降解效率。如图 2-15(b-d)所示，随着光照时间的增加，反应体系的温度逐渐升高，而所降解的染料和染料废水中的染料浓度越来越低，仅仅 90 min 不到，孔雀石绿、灿烂绿、结晶紫和混合染料的降解率就都达到 97%以上，孔雀石绿、灿烂绿、结晶紫和混合染料废水的降解率则全部达到 95%以上，表明制备出的磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶能够光热高效降解三苯甲烷类染料。如图 2-15(f)所示，将相同浓度的染料加入相同浓度的固定化漆酶，在黑暗条件下搅拌反应 0-90 min，发现三苯甲烷类染料的降解率最高为 80%，说明固定化漆酶在光热条件下具有较高的催化活性。这种光热降解三苯甲烷类染料废水的方式，拓展了磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶的应用范围。





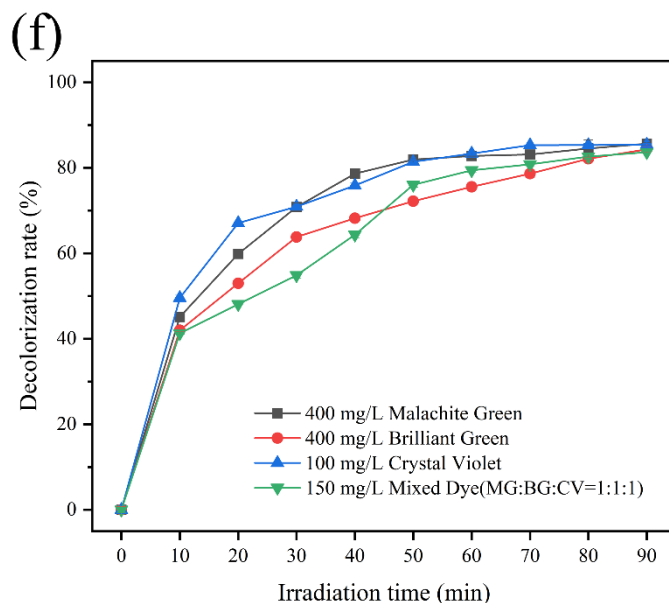


图 2-15 光热转换性能(a)、三苯甲烷类染料降解光热动力学(b)、三苯甲烷类染料光热降解升温动力学(c)、三苯甲烷类染料废水光热降解动力学(d)、三苯甲烷类染料废水光热降解升温动力学(e)、三苯甲烷类染料热催化降解(f)

Figure 2-15 Photothermal behavior (a), kinetics (b) and temperature changes (c) photothermal catalytic degradation of triphenylmethane dyes, and kinetics (d) and temperature changes (e) photothermal catalytic degradation of triphenylmethane dyes wastewater, and thermocatalytic degradation of triphenylmethane dyes (f)

2.3.3.2 染料、染料废水光照降解重复性探究

磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶对染料及其废水的重复性降解能力在污水处理中很重要，因此为了测试磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶的重复降解能力，令其对四种染料进行循环降解 10 次的测试测试，结果如图 2-16 所示。每个循环降解的时间都一样，都为 60 min，第 1 次循环结束时，孔雀石绿、灿烂绿、结晶紫和混合染料的降解率分别为 99.8%、99.6%、97.24%、97.33%；孔雀石绿、灿烂绿、结晶紫和混合染料废水的降解率分别为 99.7%、99.8%、96.4%、99.1%；第 10 次循环结束时，孔雀石绿、灿烂绿、结晶紫和混合染料的降解率分别为 89.3%、92.22%、89.72%、89.31%；孔雀石绿、灿烂绿、结晶紫和混合染料废水的降解率分别为 99.2%、97.4%、93.9%、95.0%。重复降解 10 次后，磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶对染料和染料废水的降解率依旧保持在 90% 以上，表明了磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶的优良性能。

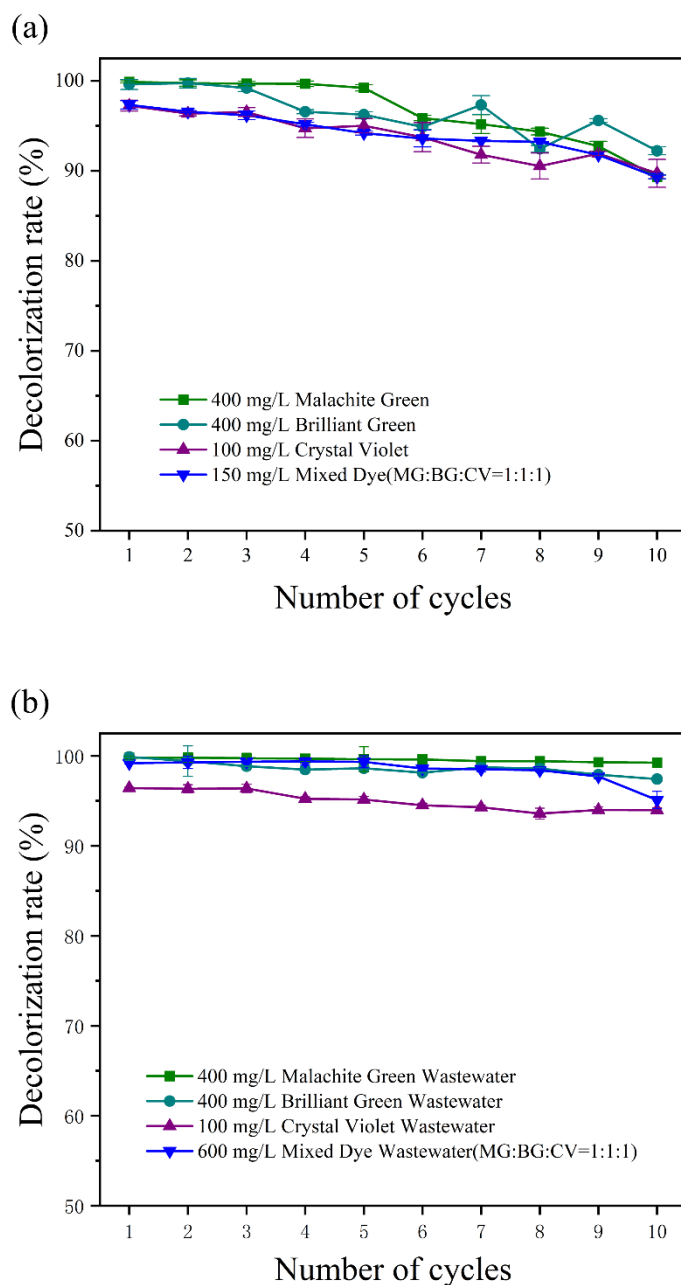


图 2-16 三苯甲烷类染料光热降解重复性(a)、三苯甲烷类染料废水光热降解重复性(b)
Figure 2-16 Reusabilities of photothermal catalytic degradation of triphenylmethane dyes (a)
and triphenylmethane dyes wastewater (b)

2.4 小结

本章利用磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米材料共价固定游离漆酶得到固定酶，制备的固定酶有着优于游离漆酶的环境耐受性和重复使用性，因此可以将其应用于工业生产中三苯甲烷类染料及其废水的光热降解。具体的：

(1) 通过共沉淀法成功制备出磁性 Fe_3O_4 纳米粒子，将 Fe_3O_4 纳米粒子和海藻酸钠溶液混合，静置一段时间后，由于海藻酸钠和 Fe_3O_4 中的 Fe^{3+} 发生络合作用，使得海藻酸钠与 Fe_3O_4 发生交联，经不完全碳化后，制备出表面具有丰富羧基的磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子；利用 EDC/NHS 活化羧基后可以将漆酶固定在磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子表面。

(2) 用 SEM、TEM、XRD、M-H、XPS、FT-IR 等表征手段研究了 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子的形貌、结构、磁性性质和表面性质。

(3) 测试了磁性固定化漆酶的催化性能以及环境耐受性。测试结果表明，与游离漆酶比较，固定化漆酶的催化性能以及环境耐受性能均有明显提升。

(4) 通过氙灯模拟光照对三种三苯甲烷类染料和染料废水的降解动力学、光照升温动力学和降解重复性进行了系统研究，氙灯光源照射到染料和染料废水中，模拟阳光会被反应体系中的磁性固定化漆酶吸收、转化为热量释放到废水中，使染料废水被不断加热、升温，进一步提高了磁性固定漆酶的催化活性，提升了磁性固定化漆酶的实际应用效果。

第 3 章 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶的制备及其催化活性研究

漆酶在生物催化、环保治理、纺织印染、食品加工和生物医学等领域具有重要的工业价值，但在实际应用中往往会被重金属离子失活。研究表明以磁性 Fe_3O_4 作为载体，在弱酸性条件下必须考虑 Fe_3O_4 不稳定析出 Fe^{3+} 对漆酶的催化活性的抑制影响。研究表明，微量的 Cu^{2+} 会提高漆酶的催化活性。此外， CuS 作为一种典型的 p 型半导体材料，因其窄带隙（ $\sim 2.1 \text{ eV}$ ）而表现出优异的光热催化活性和化学特性^[121]。 CuS 还是一种类似过氧化物酶的催化剂，可刺激 H_2O_2 分解生成 $\cdot\text{OH}$ ^[122]。为了提高催化活性， CuS 纳米颗粒被负载在 Fe_3O_4 支撑材料表面，形成一种具有优异物理、化学性质以及光热转化性能的新型复合结构材料。

本章采用共沉淀法制备出磁性 Fe_3O_4 纳米粒子，然后在乙醇溶液中使用 MPTES（3-巯丙基三乙氧基硅烷）对磁性 Fe_3O_4 纳米粒子进行巯基化改性，利用 Cu^{2+} 螯合对漆酶进行共价固定，成功制备出磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶。利用 SEM、TEM、XRD、FT-IR、M-H、XPS 等表征手段对磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子进行表征分析。考察了磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶的催化性能，并探究了磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶的光热转换性能，利用氙灯作为模拟光源探索磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶对偶氮类染料及其废水降解能力。

3.1 实验试剂及仪器

3.1.1 主要实验试剂

阿拉丁生化科技股份有限公司：六水合三氯化铁(AR)、四水合氯化亚铁(AR)、3-巯丙基三乙氧基硅烷(99%)、乙二醇(GC)、硫脲(AR)、醋酸铜(99%)、柠檬酸(AR)、考马斯亮蓝 G-250(AR)、氯化钾(AR)、乙腈(AR)、过硫酸铵(AR)、L-半胱氨酸(99%)、偶氮荧光桃红(90%)、刚果红(AR)、淀粉(粉末)、乙酸(AR)、蔗糖(AR)、氯化钙(AR)、碳酸钠(AR)、磷酸二氢钠(AR)、十二烷基硫酸钠(超级纯)、酵母蛋白胨(用于微生物)；

国药集团化学试剂有限公司：氢氧化钠(AR)、无水乙醇(AR)、柠檬酸三钠(AR)、氯化钠(AR)、四水合氯化锰(AR)、三水合硝酸铜(AR)、九水合硝酸铝(AR)、六水合硝酸镍(AR)、丙酮(AR)、N,N-二甲基甲酰胺(AR)、脲(AR)、乙二醇四乙酸二钠(AR)、硫酸(AR)、磷酸氢二钠(AR)；

北京百灵威科技有限公司：愈创木酚(99%)、谷氨酸(98%)、DL-天冬氨酸(99%)、2,2-联氨双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(98%)；

西陇科学股份有限公司：甲醛(AR)；

阿达玛斯试剂有限公司：甲醇(AR)、三氯甲烷(AR)、异丙醇(AR)；

西格玛-奥德里奇公司：活性红 MX-5B (40%)。

3.1.2 主要实验仪器

L6S 型紫外-可见分光光度计、扫描电子显微镜 (SEM、S-4800)、X 射线粉末衍射仪 (XRD、Smartlab 9kw)、透射电子显微镜 (TEM、JEM2100F)、傅立叶红外光谱(FT-IR、Thermo Scientific Nicolet iS20)、超导量子干涉磁测量系统 (Quantum Design MPMS3)、X 射线光电子能谱仪(XPS、ESCALAB Xi+)。

3.2 实验方案

3.2.1 Fe₃O₄@CuS 固定化漆酶的制备

3.2.1.1 Fe₃O₄ 纳米粒子的制备

称取 0.2 g 四水合氯化亚铁、0.55 g 六水合三氯化铁以及 35 mL 蒸馏水加入三颈烧瓶中，超声分散后通入约 5 min 保护气；然后在 65℃ 水浴通保护气条件下，称取 1.0 g NaOH 溶解于 15 mL 蒸馏水中并将其加入到三颈烧瓶中；将三颈烧瓶在 65℃ 水浴条件下搅拌加热 1.5 h，然后将水浴锅温度升温至 93℃，继续

反应 1 h，冷却至室温，用蒸馏水洗涤 2 次。

3.2.1.2 Fe_3O_4 纳米粒子巯基化改性

将 3.2.1.1 制备的 Fe_3O_4 纳米粒子置于三颈烧瓶分散于 25 mL 乙醇中，用蒸馏水稀释至 50 mL，超声分散 15 min，加入 0.4 mL MPTES（3-巯丙基三乙氧基硅烷），在 25°C 通保护气条件下，搅拌 6 h，然后磁分离出巯基改性的 Fe_3O_4 纳米粒子，蒸馏水洗涤 2 次。

3.2.1.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子的制备

用乙二醇作溶剂分别配置 50 mL 0.4M 硫脲溶液和 50 mL 0.02M 醋酸铜溶液，将 3.2.1.2 制备的产品置于三颈烧瓶中，加入醋酸铜溶液，在 25°C 水浴条件下，搅拌 2 h，然后缓慢加入硫脲溶液，并进行升温，升温至 80°C 后，搅拌 3 h，反应结束后用蒸馏水洗涤 2 次。

3.2.1.4 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ -Laccase 纳米粒子的制备

将 3.2.1.3 制备的产品分散于 48 mL 蒸馏水和 2 mL 漆酶中，于 30°C 条件下水浴搅拌反应 1 h，反应结束后用蒸馏水洗涤 1 次，然后将储存于 100 mL 蒸馏水中备用。

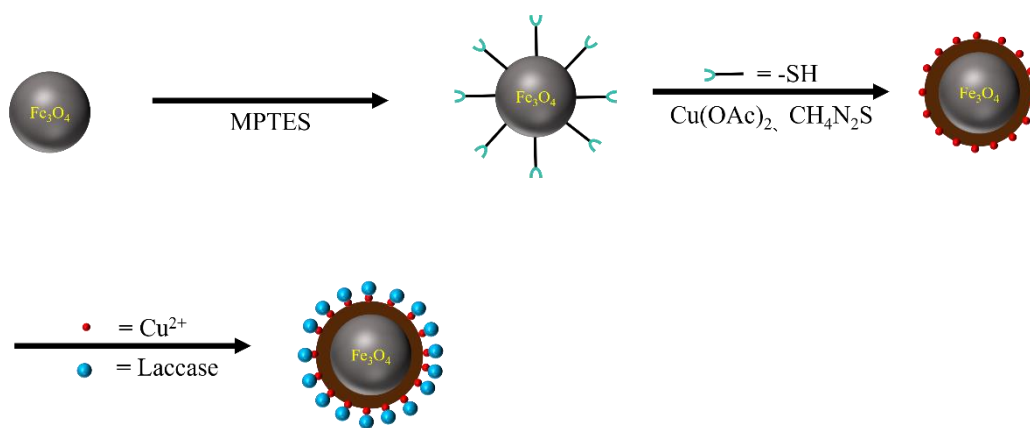


图 3-1 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ -Laccase 的制备过程示意图

Figure 3-1 Schematic illustration of the fabrication of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ -Laccase

3.2.2 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶催化性能研究

3.2.2.1 固定化漆酶固载量测试

称取 10 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 载体加入离心管中，向其中加入 2 mL 稀释 10 倍漆酶溶液，放入 30°C 条件下的恒温混匀仪中振荡反应 1 h，然后磁分离，取出上清液待测。

取 0.5 mL 上清液加入离心管中，再向其中加入蒸馏水 0.6 mL 和考马斯亮

蓝溶液 5 mL，分散均匀后反应 5 min，测试溶液在 595 nm 处的吸光度。进行三组平行实验。

3.2.2.2 游离漆酶和固定化漆酶最适 pH 测试

取 0.1 mL 游离漆酶（粗酶溶液稀释 10 倍）加入不同的离心管中，向其中依次加入 2.9 mL pH=3.0、3.6、4.0、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、6.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液，分散均匀后放入恒温混匀仪中，先在 50°C 条件预热 5 min，然后向离心管中加入 1 mL 1 mmol/L 同样在 50°C 条件预热 5 min 的愈创木酚溶液，在 50°C 下的恒温混匀仪中震荡反应 20 s，用紫外分光光度计测试 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。探究不同 pH 值下的游离漆酶催化活性变化。

取 1.8 mg 固定化漆酶加入不同的离心管中，向其中依次加入 3.0 mL pH=3.0、3.6、4.0、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、6.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液，分散均匀后放入恒温混匀仪中，先在 50°C 条件预热 5 min，然后向离心管中加入 1 mL 1 mmol/L 同样在 50°C 条件预热 5 min 的愈创木酚溶液，在 50°C 下的恒温混匀仪中震荡反应 30 s 后进行磁分离处理，取出上清液，用紫外分光光度计测试其在 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。探究固定化漆酶在不同酸性环境中的催化活性变化。

3.2.2.3 游离漆酶和固定化漆酶最适温度测试

取 0.1 mL 游离漆酶（粗酶溶液稀释 10 倍）加入不同的离心管中，向其中加入 2.9 mL pH=4.8 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液，分散均匀后将其放入温度（30°C、35°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C、65°C、70°C）不同的恒温混匀仪中先预热 5 min，然后向离心管中加入 1 mL 与之对应温度下同样预热 5 min 的 1 mmol/L 愈创木酚溶液，最后立即在恒温混匀仪中震荡反应 20 s，用紫外分光光度计测试 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。探究不同温度下的游离漆酶催化活性变化。

取 1.8 mg 固定化漆酶加入不同的离心管中，向其中 3.0 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液，分散均匀后将其放入温度（30°C、35°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C、65°C、70°C）不同的恒温混匀仪中先预热 5 min，然后向离心管中加入 1 mL 与之对应温度下同样预热 5 min 的 1 mmol/L 愈创木酚溶液，

最后立即在恒温混匀仪中震荡反应 30 s 后进行磁分离处理，取出上清液，用紫外分光光度计测试其在 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。探究当环境温度变化时，固定化漆酶的催化活性变化情况。

3.2.2.4 游离漆酶和固定化漆酶酶活性测试

取 0.1 mL 游离漆酶（粗酶溶液稀释 10 倍）加入离心管中，向其中加入 2.9 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，分散均匀后放入恒温混匀仪中，先在 50°C 条件预热 5 min，然后向离心管中加入 1 mL 1 mmol/L 同样在 50°C 条件预热 5 min 的愈创木酚溶液，在 50°C 下的恒温混匀仪中震荡反应 20 s，用紫外分光光度计测试 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

取 1.8 mg 固定酶加入离心管中，向其中加入 3.0 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，分散均匀后放入恒温混匀仪中，先在 55°C 条件预热 5 min，然后向离心管中加入 1 mL 1 mmol/L 同样在 55°C 条件预热 5 min 的愈创木酚溶液，在 55°C 下的恒温混匀仪中震荡反应 20 s 后进行磁分离处理，取出上清液，用紫外分光光度计测试上清液在 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

3.2.2.5 游离漆酶和固定化漆酶热稳定性测试

取 2 mL 游离漆酶（粗酶溶液稀释 10 倍）加入离心管中，置于 60°C 下的恒温混匀仪中加热 0-10 h，每隔 1 h 取 0.1 mL 游离漆酶，加入 2.9 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液和 1 mL 在 50°C 恒温混匀仪中预热 5 min 的 1 mmol/L 愈创木酚，然后将两者混合，在恒温混匀仪中反应 20 s，测试 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

取 1.8 mg 固定化漆酶分别置于不同的离心管中，在 60°C 下的恒温混匀仪中加热 0-10 h，每隔 1 h 取出一个固定化漆酶，加入 3 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，将其和 1 mL 1 mmol/L 的愈创木酚一起在 55°C 恒温混匀仪中预热 5 min，然后将两者混合，在恒温混匀仪中反应 30 s 后进行磁分离处理，取出上清液，测试上清液在 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

3.2.2.6 游离漆酶和固定化漆酶耐酸性测试

取 0.1 mL 游离漆酶（粗酶溶液稀释 10 倍）加入不同的离心管中，向其中依次加入 0.2 mL pH=3.0、3.6、4.0、4.6、5.0、5.4、6.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，然后于 30°C 恒温混匀仪中静置 5 h。静置结束后加入 2.7 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，将其和 1 mL 1 mmol/L 的愈创木酚一起在 50°C 恒温混匀仪

中预热 5 min, 然后将两者混合, 在恒温混匀仪中反应 20 s, 测试 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

取 1.8 mg 固定化漆酶加入不同的离心管中, 向其中依次加入 0.1 mL 蒸馏水和 0.2 mL pH=3.0、3.6、4.0、4.6、5.0、5.4、6.0 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 然后于 30°C 恒温混匀仪中静置 5 h。静置结束后磁分离去除上清液, 加入 3 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 将其和 1 mL 1 mmol/L 的愈创木酚一起在 55°C 恒温混匀仪中预热 5 min, 然后将两者混合, 在恒温混匀仪中反应 30 s 后进行磁分离处理, 取出上清液, 测试上清液在 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

3.2.2.7 游离漆酶和固定化漆酶有机物耐受性测试

取 0.1 mL 游离漆酶 (粗酶溶液稀释 10 倍) 加入不同的离心管中, 向其中依次加入 10 mM 不同有机溶剂 (甲醇、乙醇、乙腈、丙酮、异丙醇、三氯甲烷、甲醛、N, N-二甲基甲酰胺) 0.2 mL, 然后于 30°C 恒温混匀仪中静置 2 h。静置结束后加入 2.7 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 将其和 1 mL 1 mmol/L 的愈创木酚一起在 50°C 恒温混匀仪中预热 5 min, 然后将两者混合, 在恒温混匀仪中反应 20 s, 用紫外分光光度计测试 465 nm 处的吸光度。三组平行实验。

取 1.8 mg 固定化漆酶加入不同的离心管中, 向其中依次加入蒸馏水 0.1 mL 和 10 mM 不同有机溶剂 (甲醇、乙醇、乙腈、丙酮、异丙醇、三氯甲烷、甲醛、N, N-二甲基甲酰胺) 0.2 mL, 然后于 30°C 恒温混匀仪中静置 2 h。静置结束后磁分离去除上清液, 加入 3.0 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 将其和 1 mL 1 mmol/L 的愈创木酚一起在 55°C 恒温混匀仪中预热 5 min, 然后将两者混合, 在恒温混匀仪中反应 30 s 后进行磁分离处理, 取出上清液, 测试上清液在 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

3.2.2.8 游离漆酶和固定化漆酶金属离子耐受性测试

取 0.1 mL 游离漆酶 (粗酶溶液稀释 10 倍) 加入不同的离心管中, 向其中依次加入, 加入 0.2 mL 10 mM 不同金属离子溶液 (Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Na^{+} 、 K^{+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Al^{3+} 、 Ni^{2+}), 然后于 30°C 恒温混匀仪中静置 2 h。静置结束后加入 2.7 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 将其和 1 mL 1 mmol/L 的愈创木酚一起在 50°C 恒温混匀仪中预热 5 min, 然后将两者混合, 在恒温混匀仪中反

应 20 s，用紫外分光光度计测试 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

取 1.8 mg 固定化漆酶加入不同的离心管中，向其中依次加入蒸馏水 0.1 mL 和 10 mM 不同金属离子溶液（ Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Na^+ 、 K^+ 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Al^{3+} 、 Ni^{2+} ）0.2 mL，然后于 30℃恒温混匀仪中静置 2 h。静置结束后磁分离去除上清液，加入 3.0 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，将其和 1 mL 1 mmol/L 的愈创木酚一起在 55℃恒温混匀仪中预热 5 min，然后将两者混合，在恒温混匀仪中反应 30 s 后进行磁分离处理，取出上清液，测试上清液在 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

3.2.2.9 游离漆酶和固定化漆酶抑制剂耐受性测试

取 0.1 mL 游离漆酶（粗酶溶液稀释 10 倍）加入不同的离心管中，向其中依次加入，加入 0.2 mL 10 mM 不同抑制剂（EDTA-2Na、十二烷基硫酸钠、过硫酸铵、L-半胱氨酸、脲、硫脲、谷氨酸、DL-天冬氨酸），然后于 30℃恒温混匀仪中静置 2 h。静置结束后加入 2.7 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，将其和 1 mL 1 mmol/L 的愈创木酚一起在 50℃恒温混匀仪中预热 5 min，然后将两者混合，在恒温混匀仪中反应 20 s，用紫外分光光度计测试 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

取 1.8 mg 固定化漆酶加入不同的离心管中，向其中依次加入蒸馏水 0.1 mL 和 10 mM 不同抑制剂（EDTA-2Na、十二烷基硫酸钠、过硫酸铵、L-半胱氨酸、脲、硫脲、谷氨酸、DL-天冬氨酸）0.2 mL，然后于 30℃恒温混匀仪中静置 2 h。静置结束后磁分离去除上清液，加入 3.0 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，将其和 1 mL 1 mmol/L 的愈创木酚一起在 55℃恒温混匀仪中预热 5 min，然后将两者混合，在恒温混匀仪中反应 30 s 后进行磁分离处理，取出上清液，测试上清液在 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

3.2.2.10 游离漆酶和固定化漆酶米氏常数测试

取 0.1 mL 游离漆酶（粗酶溶液稀释 10 倍）加入不同的离心管中，向其中加入 2.9 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，将其和 1 mL（0.4~4.0 mM）的愈创木酚一起在 50℃恒温混匀仪中预热 5 min，然后依次将两者混合，在恒温混匀仪中反应 20 s，测试 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

取 1.8 mg 固定化漆酶加入不同的离心管中，向其中加入 3.0 mL pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，将其和 1 mL (0.4~4.0 mM) 的愈创木酚一起在 55°C 恒温混匀仪中预热 5 min，然后依次将两者混合，在恒温混匀仪中反应 30 s 后进行磁分离处理，取出上清液，测试上清液在 465 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

3.2.2.11 固定化漆酶重复性测试测试

取 1.8 mg 固定化漆酶加入到离心管中，向其中加入 3.0 mL pH=4.6 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液，将其和 1 mL 1 mmol/L 的愈创木酚一起在 55°C 恒温混匀仪中预热 5 min，然后将两者混合，在恒温混匀仪中反应 30 s，磁分离，测试上清液在 465 nm 处的吸光度。重复相同操作步骤 10 次。进行三组平行实验并记录数据。

3.2.3 Fe₃O₄@CuS 固定化漆酶降解染料和染料废水

3.2.3.1 活性红 MX-5B 染料降解

标准曲线绘制：称取相应重量的活性红 MX-5B 染料，分别配制 0.5 ~ 5.5 mg/L 的活性红 MX-5B 溶液，然后取相应浓度的活性红 MX-5B 溶液，用紫外分光光度计测试活性红 MX-5B 溶液在 530 nm 处的吸光度。然后将活性红 MX-5B 染料浓度于吸光度一一对应，制作标准曲线。

动力学研究：取 70 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以 pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的 400 mg/L 活性红 MX-5B 溶液 49.4 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 2.6 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下搅拌，光照反应 0 ~ 150 min，其间每间隔 10 min 从玻璃瓶中取出 2 mL 溶液，磁分离，测试上清液在 530 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

重复性研究：取 35 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以 pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的 400 mg/L 活性红 MX-5B 溶液 24.7 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 1.3 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下光照搅拌 60 min，最后将玻璃瓶中的溶液进行磁分离，测试上清液在 530 nm 处的吸光度。然后将固定化漆酶重新利用并重复上述实验步骤 10 次。进行三组平行实验并记录数据。

3.2.3.2 偶氮荧光桃红染料降解

标准曲线绘制：称取相应重量的偶氮荧光桃红染料，分别配制 0.5 ~ 5.5 mg/L 的偶氮荧光桃红溶液，然后取相应浓度的偶氮荧光桃红溶液，用紫外分光光度计测试偶氮荧光桃红溶液在 505 nm 处的吸光度。然后将偶氮荧光桃红染料浓度于吸光度一一对应，制作标准曲线。

动力学研究：取 70 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以 pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的 300 mg/L 偶氮荧光桃红溶液 49.4 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 2.6 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下搅拌，光照反应 0 ~ 150 min，其间每间隔 10 min 从玻璃瓶中取出 2 mL 溶液，磁分离，测试上清液在 505 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

重复性研究：取 35 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以 pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的 300 mg/L 偶氮荧光桃红溶液 24.7 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 1.3 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下光照搅拌 60 min，最后将玻璃瓶中的溶液进行磁分离，测试上清液在 505 nm 处的吸光度。然后将固定化漆酶重新利用并重复上述实验步骤 10 次。进行三组平行实验并记录数据。

2.2.3.3 刚果红染料降解

标准曲线绘制：称取相应重量的刚果红染料，分别配制 0.5 ~ 5.5 mg/L 的刚果红溶液，然后取相应浓度的刚果红溶液，用紫外分光光度计测试刚果红溶液在 495 nm 处的吸光度。然后将偶刚果红染料浓度于吸光度一一对应，制作标准曲线。

动力学研究：取 70 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以 pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的 300 mg/L 刚果红溶液 49.4 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 2.6 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下搅拌，光照反应 0 ~ 150 min，其间每间隔 10 min 从玻璃瓶中取出 2 mL 溶液，磁分离，测试上清液在 495 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

重复性研究：取 35 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以 pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的 300 mg/L 刚果红溶液 24.7 mL 和蒸馏

水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 1.3 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下光照搅拌 60 min，最后将玻璃瓶中的溶液进行磁分离，测试上清液在 495 nm 处的吸光度。然后将固定化漆酶重新利用并重复上述实验步骤 10 次。进行三组平行实验并记录数据。

2.2.3.4 混合染料降解

标准曲线绘制：称取相应重量的混合染料，分别配制 0.5 ~ 5.5 mg/L 的混合染料溶液，然后取相应浓度的混合染料溶液，用紫外分光光度计测试混合染料溶液在 565 nm 处的吸光度。然后将混合染料浓度于吸光度一一对应，制作标准曲线。

动力学研究：取 70 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以 pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的 300 mg/L 混合染料溶液（活性红：偶氮荧光桃红：刚果红=1: 1: 1）49.4 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 2.6 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下搅拌，光照反应 0 ~ 150 min，其间每间隔 10 min 从玻璃瓶中取出 2 mL 溶液，磁分离，测试上清液在 565 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

重复性研究：取 35 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以 pH=4.6 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制的 300 mg/L 混合染料溶液（活性红：偶氮荧光桃红：刚果红=1: 1: 1）24.7 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 1.3 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下光照搅拌 60 min，最后将玻璃瓶中的溶液进行磁分离，测试上清液在 565 nm 处的吸光度。然后将固定化漆酶重新利用并重复上述实验步骤 10 次。进行三组平行实验并记录数据。

2.2.3.5 活性红 MX-5B 染料废水降解

动力学研究：取 70 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以模拟废水溶液配制的 400 mg/L 活性红 MX-5B 染料废水 49.4 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 2.6 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下搅拌，光照反应 0 ~ 150 min，其间每间隔 10 min 从玻璃瓶中取出 2 mL 溶液，磁分离，测试上清液在 530 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

重复性研究：取 35 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以模拟废水溶液配制的 400 mg/L 活性红 MX-5B 染料废水 24.7 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 1.3 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下

光照搅拌 60 min，最后将玻璃瓶中的溶液进行磁分离，测试上清液在 530 nm 处的吸光度。然后将固定化漆酶重新利用并重复上述实验步骤 10 次。进行三组平行实验并记录数据。

2.2.3.6 偶氮荧光桃红染料废水降解

动力学研究：取 70 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以模拟废水溶液配制的 300 mg/L 偶氮荧光桃红染料废水 49.4 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 2.6 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下搅拌，光照反应 0 ~ 150 min，其间每间隔 10 min 从玻璃瓶中取出 2 mL 溶液，磁分离，测试上清液在 505 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

重复性研究：取 35 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以模拟废水溶液配制的 300 mg/L 偶氮荧光桃红染料废水 24.7 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 1.3 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下光照搅拌 60 min，最后将玻璃瓶中的溶液进行磁分离，测试上清液在 505 nm 处的吸光度。然后将固定化漆酶重新利用并重复上述实验步骤 10 次。进行三组平行实验并记录数据。

2.2.3.7 刚果红染料废水降解

动力学研究：取 70 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以模拟废水溶液配制的 300 mg/L 刚果红染料废水 49.4 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 2.6 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下搅拌，光照反应 0 ~ 150 min，其间每间隔 10 min 从玻璃瓶中取出 2 mL 溶液，磁分离，测试上清液在 495 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

重复性研究：取 35 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以模拟废水溶液配制的 300 mg/L 刚果红染料废水 24.7 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 1.3 mL，然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下光照搅拌 60 min，最后将玻璃瓶中的溶液进行磁分离，测试上清液在 495 nm 处的吸光度。然后将固定化漆酶重新利用并重复上述实验步骤 10 次。进行三组平行实验并记录数据。

2.2.3.8 混合染料废水降解

动力学研究：取 70 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中，向其中加入以模拟废水溶液配制的 300 mg/L 混合染料废水（活性红：偶氮荧光桃红：刚果红=1：

1: 1) 49.4 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 2.6 mL, 然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下搅拌, 光照反应 0 ~ 150 min, 其间每间隔 10 min 从玻璃瓶中取出 2 mL 溶液, 磁分离, 测试上清液在 565 nm 处的吸光度。进行三组平行实验并记录数据。

重复性研究: 取 35 mg 固定化漆酶加入透明玻璃瓶中, 向其中加入以模拟废水溶液配制的 300 mg/L 混合染料废水 (活性红: 偶氮荧光桃红: 刚果红=1: 1: 1) 24.7 mL 和蒸馏水配制的 1 mmol/L ABTS 溶液 1.3 mL, 然后将透明玻璃瓶置于带有磁力搅拌的氙灯光源下光照搅拌 60 min, 最后将玻璃瓶中的溶液进行磁分离, 测试上清液在 565 nm 处的吸光度。然后将固定化漆酶重新利用并重复上述实验步骤 10 次。进行三组平行实验并记录数据。

3.3 结果与讨论

3.3.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子的表征与分析

3.3.1.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子 TEM 表征与分析

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子的 TEM 和 Mapping 谱图如图 3-2、3-3 所示, 从图 3-2 (a) 可以看出 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子以 Fe_3O_4 为中心和表面附着 CuS 组成, 平均粒径在 20 nm 左右。从图 3-1 (b) 可以观测到物质的晶格间距分别为 0.29 nm 和 0.19 nm, 可以和 Fe_3O_4 晶体的 (220) 晶面以及 CuS 晶体的 (107) 晶面参数对应, 结合 Mapping 图中所检测出的元素证明成功制备出 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子。

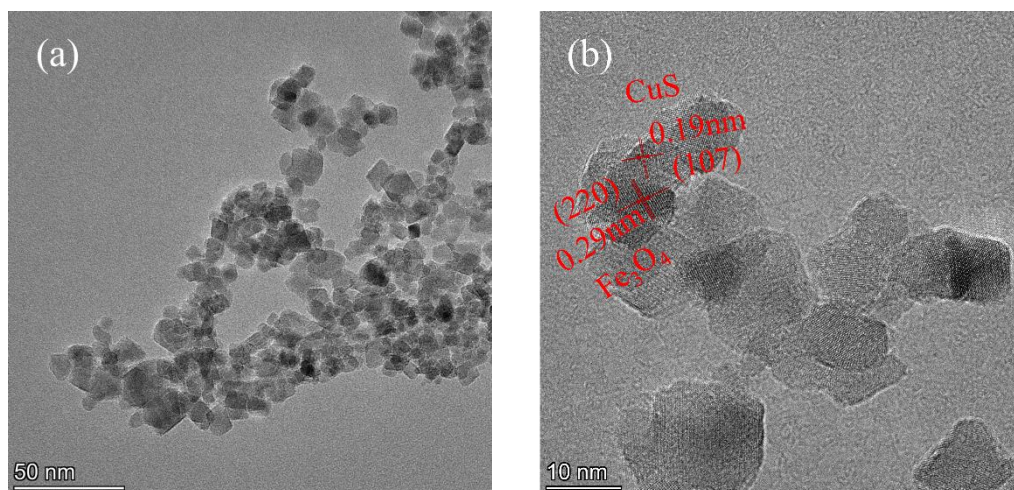
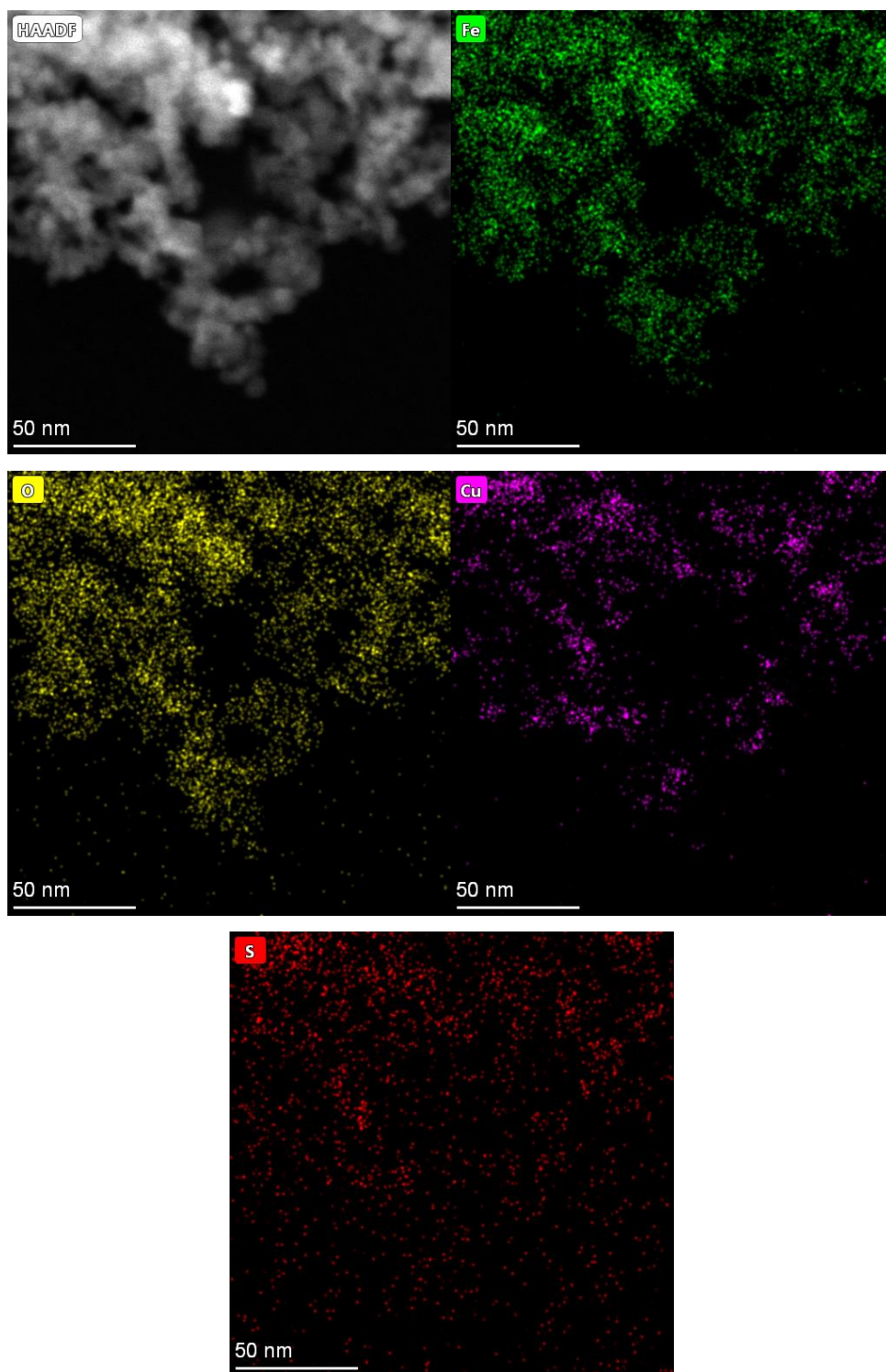


图 3-2 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子的 TEM(a)和 HRTEM(b)图

Figure 3-2 TEM (a) and HRTEM (b) images of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ nanoparticles

图 3-3 Fe₃O₄@CuS 纳米粒子 Mapping 图Figure 3-3 Mapping of Fe₃O₄@CuS nanoparticles

3.3.1.2 Fe₃O₄@CuS 纳米粒子 XRD 表征与分析

Fe₃O₄ 和 Fe₃O₄@CuS 纳米粒子的 X 射线单晶衍射图谱如图 3-4 所示，衍射峰位置在 $2\theta=30.1^\circ$, 35.4° , 43.1° , 53.4° , 57.0° , 62.5° , 71.4° , 74.5° 处对应的晶面分别是: (220)、(311)、(400)、(422)、(511)、(440)、(620)、(533),

衍射峰位置和强度与标准 PDF 卡片 JCPDS NO.19-0629 (Fe_3O_4) 相对应； $2\theta=31.8^\circ$ ， 47.9° 处对应的晶面分别是： (103) 、 (110) ，衍射峰位置和强度与标准 PDF 卡片 JCPDS NO. 06-0464 (CuS) 相对应，表明成功制备出 Fe_3O_4 纳米粒子和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子。

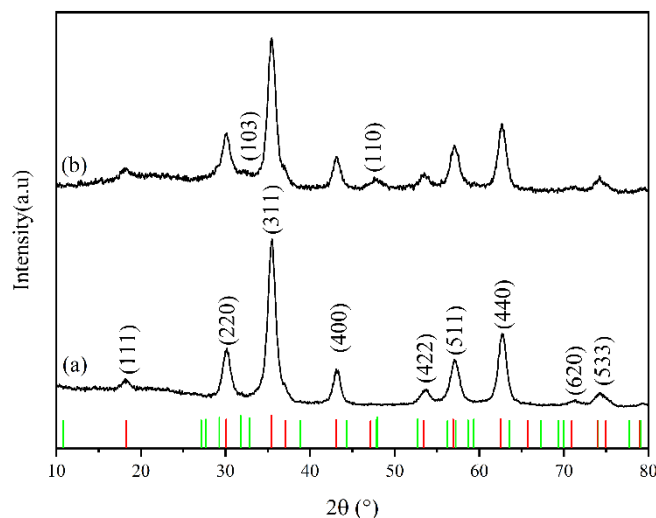


图 3-4 (a) Fe_3O_4 和(b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子的 XRD 图

Figure 3-4 XRD image of (a) Fe_3O_4 and (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ nanoparticles

3.3.1.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子 FTIR 表征与分析

Fe_3O_4 纳米粒子、 Fe_3O_4 巯基化纳米粒子、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ -Laccase 纳米粒子在 $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ 范围内的傅里叶红外光谱谱图(a)-(d)如图 3-5 所示。 567 cm^{-1} 附近的吸收峰与 Fe_3O_4 的 Fe-O 键特征一致^[128]； 1250 cm^{-1} 出现 C-S 键的特征峰^[136]； 1635 cm^{-1} 和 3413 cm^{-1} 附近的吸收峰归因于-OH 的伸缩振动^[130]； 1395 cm^{-1} 附近的吸收峰归因于 C-O 键的特征峰^[131]； 1000 cm^{-1} 附近的吸收峰归因于 Si-O-Si 键反对称伸缩振动； 460 cm^{-1} 附近的吸收峰归因于 Si-O 键的弯曲振动^[137]； 2924 cm^{-1} 附近的吸收峰归因于- CH_2 -的振动； 1390 cm^{-1} 附近的吸收峰归因于- CH_3 的弯曲振动^[133]。通过 FTIR 的测试可以证明制备出了 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子。

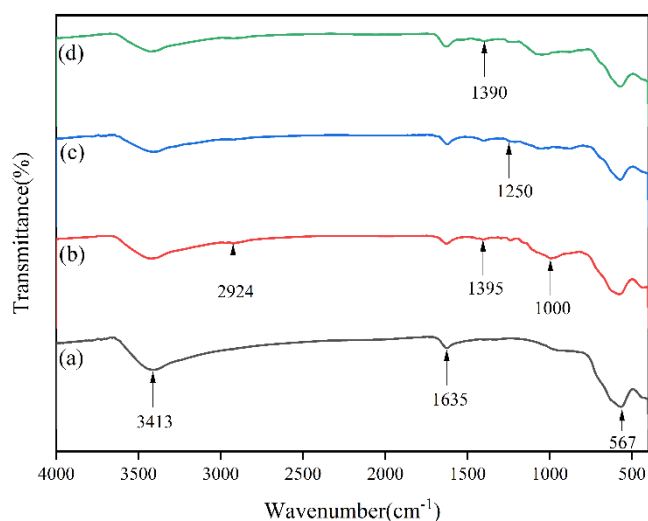
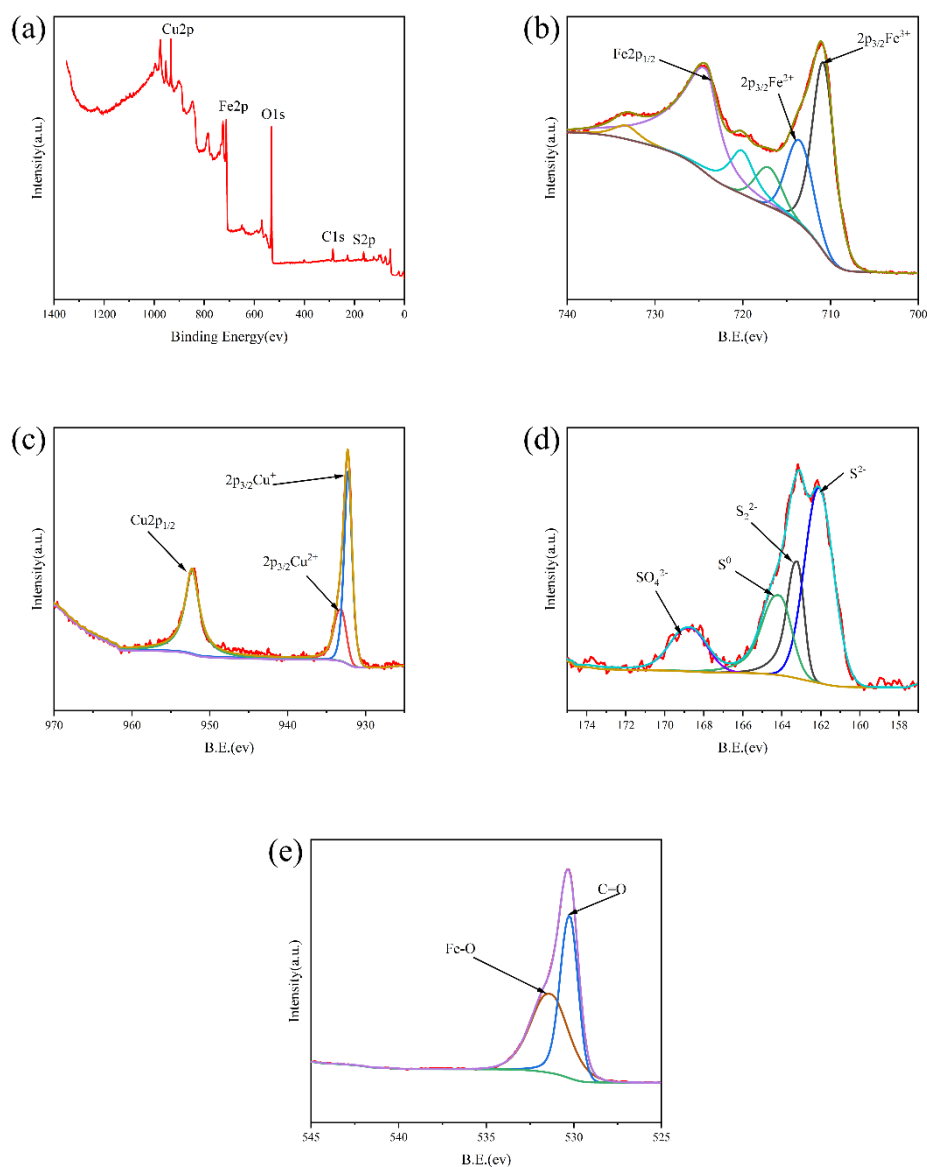


图 3-5 (a)Fe₃O₄、(b)Fe₃O₄ 巯基化、(c) Fe₃O₄@CuS 和(d)Fe₃O₄@CuS-Laccase 纳米粒子红外谱图

Figure 3-5 FT-IR spectra of (a) Fe₃O₄, (b) sulfhydryl-functionalized Fe₃O₄, (c) Fe₃O₄@CuS nanoparticles and (d) Fe₃O₄@CuS-Laccase nanoparticles

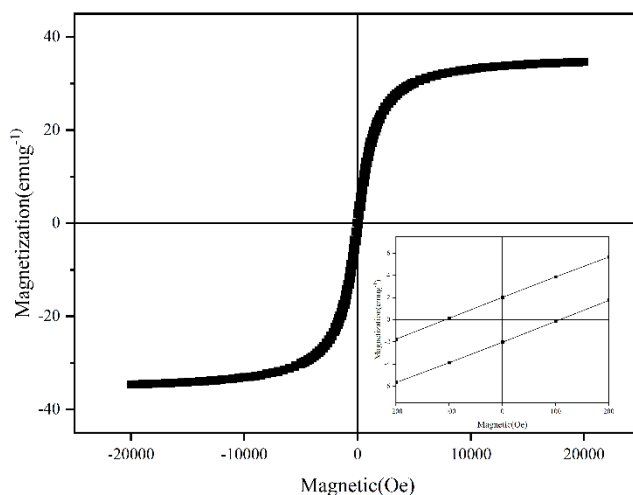
3.3.1.4 Fe₃O₄@CuS 纳米粒子 XPS 表征与分析

Fe₃O₄@CuS 纳米粒子的 XPS 的分析谱图如图 3-6 所示。图 3-6(a)证明所测 Fe₃O₄@CuS 纳米粒子中含有 Cu、Fe、O、C 和 S 三种元素。图 3-6(b)是 Fe2p 的高分辨率谱图，宽双峰可拟合为五个单独的峰，即 724.0 eV 处的 Fe 2p_{1/2} 主峰、714.7 eV 和 718.4 eV 处的两个 Fe 2p_{3/2} 峰，以及 712.5 eV 处的 Fe(III) 和 710.4 eV 处的 Fe(II) 的两个 Fe 2p_{3/2} 分辨率峰^[119]。图 3-6(c)是 Cu2p 的高分辨率谱图，以 933.6 和 953.4 eV 为中心的两个主峰分别归属于 Cu 2p_{3/2} 和 Cu 2p_{1/2} 自旋轨道^[138]。图 3-6(d)是 S2p 的高分辨率谱图，可以将其分解成 161.5、162.8、164.8 和 168.7 eV 的四个峰，分别对应于 S²⁻、S₂²⁻、S⁰ 和 SO₄²⁻ 的特征峰^[123, 124]。图 3-6(e)是 O1s 的高分辨率谱图，可以分解为 531.6 eV 和 529.9 eV 的 2 个峰，分别对应为 C-O、C=O，Fe-O^[135]。通过 XPS 的测试可以证明制备出了 Fe₃O₄@CuS 纳米粒子。

图 3-6 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子的 XPS 表征图Figure 3-6 XPS spectra of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ nanoparticles

3.3.1.5 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子磁滞回线表征与分析

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子磁滞回线如图 3-7 所示, 由图可知 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子的饱和磁化强度为 34.7 emug^{-1} , 矫顽力为 108.5 Oe , 表明该磁性复合材料是铁磁性材料。

图 3-7 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子磁滞回线Figure 3-7 Magnetic hysteresis loop of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ nanoparticles

3.3.2 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶性能研究

3.3.2.1 游离漆酶和固定化漆酶最适温度的探究

游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶的最适温度测试结果如图 3-8 所示。游离漆酶的最适温度为 50°C ， $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶的最适温度为 55°C ，但是当温度变化时，固定酶的活性变化相对平缓，表明固定酶具有更好的温度适应性，同时说明所制备的光热材料 CuS 中的 Cu^{2+} 可以提升漆酶的催化活性并降低环境对漆酶的影响。

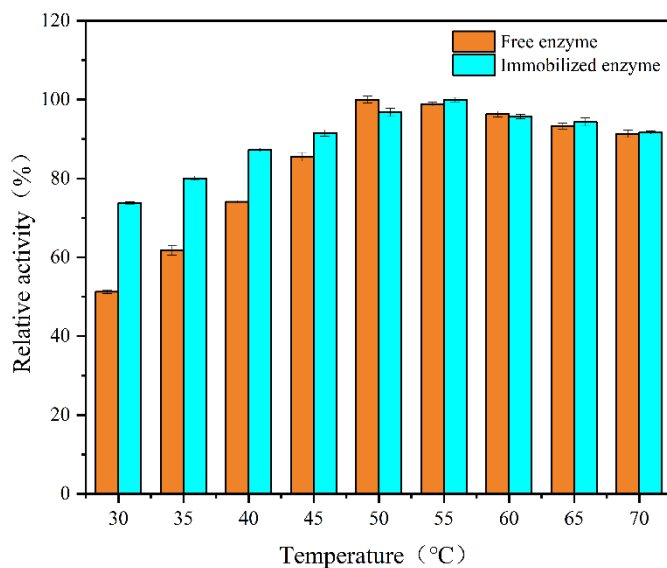


图 3-8 游离漆酶、固定化漆酶最适温度

Figure 3-8 Optimal temperature of free laccase and immobilized laccase

3.3.2.2 游离漆酶和固定化漆酶最适 pH 的探究

游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶的最适 pH 测试结果相同，从图 3-9 可以看出，游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶的最适 pH 都为 4.6。当 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶处于 $\text{pH}=3.0 \sim 4.4$ 反应体系中，其相对活性低于游离酶；当固定化漆酶处于 $\text{pH}=4.4 \sim 6.0$ 反应体系中，其相对活性高于游离酶。

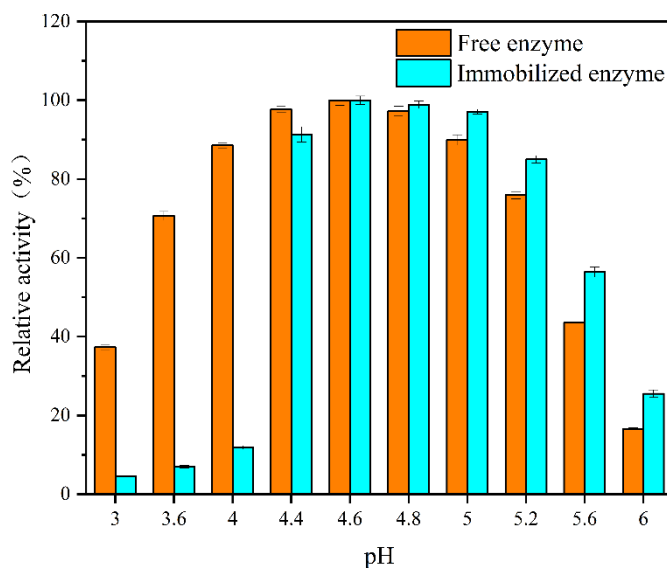


图 3-9 游离漆酶、固定化漆酶最适 pH

Figure 3-9 Optimal pH of free laccase and immobilized laccase

3.3.2.3 游离漆酶和固定化漆酶热稳定性探究

由于游离酶的最适温度为 50°C ，固定酶的最适温度为 55°C ，漆酶催化剂在应用中会长时间处于高温环境中，因此研究漆酶的热稳定性是非常必要的。将游离酶和固定酶放入 60°C 环境下加热 10 h 后测定其相对保留活性。游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶的热稳定性测试结果如图 3-10 所示，固定酶加热 10 h 后依旧保留 52.04% 的相对活性，而游离漆酶仅有 48.41% 的相对活性保留，说明制备的磁性固定化漆酶能够在高温条件下有效保持催化活性，增加漆酶的实用性。

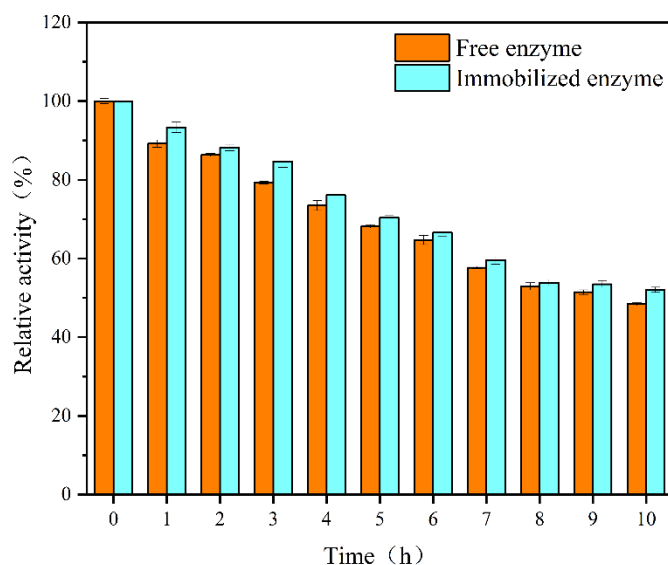


图 3-10 游离漆酶、固定化漆酶热稳定性

Figure 3-10 Thermostabilities of free laccase and immobilized laccase

3.3.2.4 游离漆酶和固定化漆酶耐酸性探究

将游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶放入不同 pH(pH=3.0~6.0)的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液中保存 5 h 以测试其耐酸性, 结果如图 3-11 所示。从图中可以看出, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶在不同 pH 酸性溶液中放置 5 h 后, 相对活性始终保持在 90%以上, 漆酶的酶活性损失很少。同时从整体来看, 固定酶在酸性环境中具有更高的酸稳定性, 说明磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 载体将漆酶固定后能够增加其刚性, 提升对酸碱的耐受性。

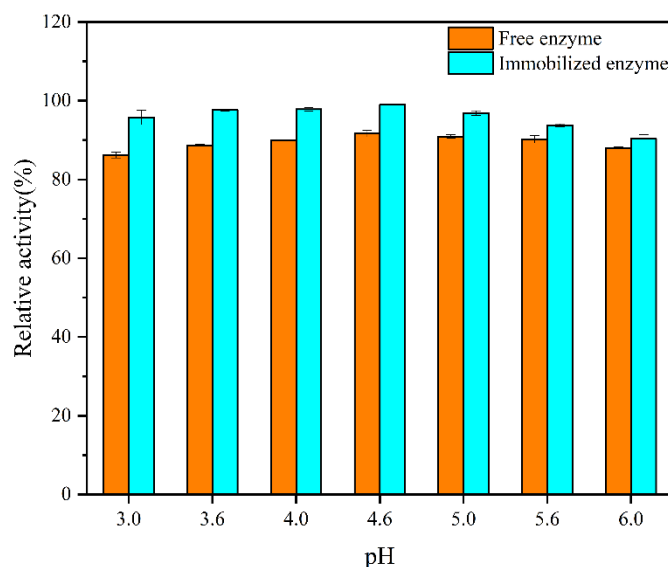


图 3-11 游离漆酶、固定化漆酶耐酸性

Figure 3-11 pH stabilities of free laccase and immobilized laccase

3.3.2.5 游离漆酶和固定化漆酶金属离子耐受性探究

在生物修复这一领域中，重金属离子对漆酶具有重要影响，漆酶常常被重金属离子灭活，导致漆酶的实际应用受到限制。因此，将游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶放入等体积的金属离子溶液中以考察金属离子耐受性，结果如图 3-12 所示。经过不同种金属离子污染后，游离酶和固定酶的相对活性都有所降低，但是固定酶的相对催化活性整体保持在 90% 以上，酶活损失很少，而游离漆酶的相对活性变化剧烈。这表明磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶可以显著提升漆酶对金属离子耐受性。

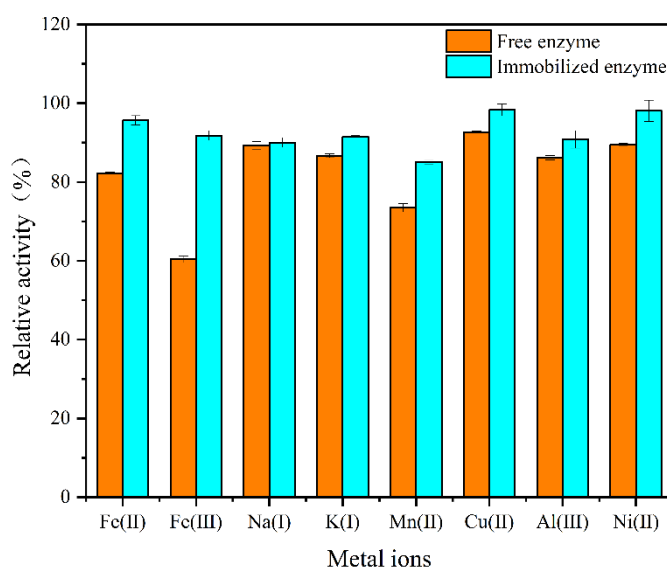


图 3-12 游离漆酶、固定化漆酶金属离子抗性

Figure 3-12 Metal ions tolerances of free laccase and immobilized laccase

3.3.2.6 游离漆酶和固定化漆酶有机物耐受性探究

游离漆酶和磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶在不同有机试剂溶液中放的相对活性变化如图 3-13 所示。可以看出，经过八种有机试剂溶液污染 2 h 后，固定酶的相对活性将游离酶来说，相对提升了 20% 以上，特别是在丙酮和 N,N -二甲基甲酰胺溶液中，固定酶活性相对提升了 60%。这个结果表明磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 作为载体不仅能够固定漆酶，还能降低有机溶剂对漆酶的毒害，提升漆酶的环境稳定性。

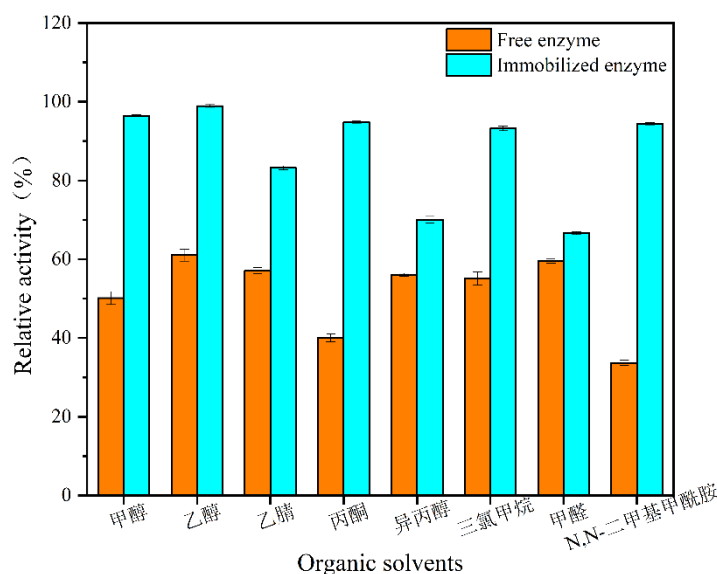


图 3-13 游离漆酶、固定化漆酶有机物抗性

Figure 3-13 Organic solvents tolerances of free laccase and immobilized laccase

3.3.2.7 游离漆酶和固定化漆酶抑制剂耐受性探究

将游离漆酶和磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶分别经过乙二胺四乙酸、十二烷基硫酸钠、过硫酸铵、L-半胱氨酸、脲、硫脲、谷氨酸、DL-天冬氨酸处理 2 h, 测试相对活性结果如图 3-14 所示。从图中可以看出, 游离酶在抑制剂溶液中酶催化活性损失明显, 固定酶催化活性整体变化不大基本维持在 80%以上。十二烷基硫酸钠溶液对游离酶和固定酶的活性抑制影响最大, 游离酶相对活性仅仅只剩下 38.89%, 固定酶则保留有 52.67%的相对活性, 活性相对提升 36%。结果表明磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 载体能够降低抑制剂对漆酶的影响。

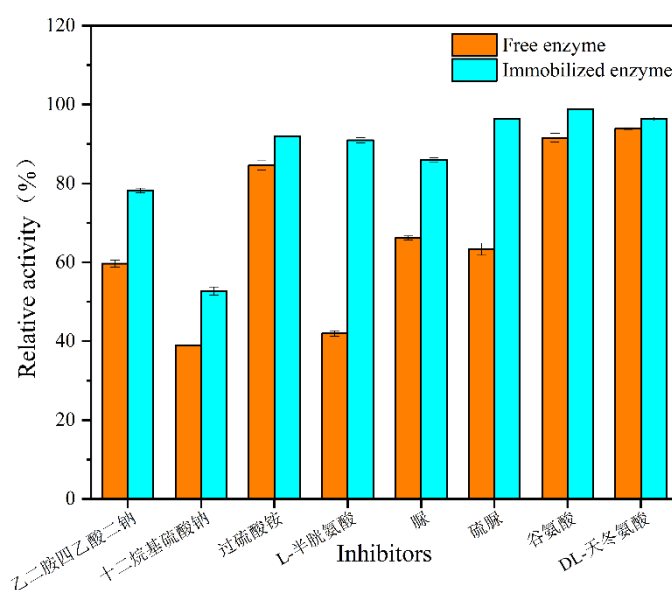


图 3-14 游离漆酶、固定化漆酶抑制剂抗性

Figure 3-14 Inhibitors tolerances of free laccase and immobilized laccase

3.3.2.8 游离漆酶和固定化漆酶米氏常数探究

在酶促反应中，米氏常数可以判断酶对底物亲和力的大小。利用双倒数法测试游离漆酶和磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶的米氏常数，结果如表 3-2 所示。游离酶和固定酶的米氏常数 K_m 值分别为 1.257 和 1.397，最大反应速率 $V_{\max}$ 分别为 1.257 和 1.397。固定酶的酶活回收率高达 128.84%，这是由于载体 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 具有超顺磁性，同时其尺寸较小水分散性良好 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 上的 Cu^{2+} 能够和漆酶发生协同作用，提高漆酶的催化活性。

表 3-1 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ -Laccase 米氏常数

Table3-1 Michaelis constant of free laccase and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ -Laccase

项目	拟合曲线	$V_{\max}$	K_m
游离漆酶	$y=0.2807x + 0.2233$	4.478	1.257
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ -Laccase	$y= 0.2801x + 0.2005$	4.988	1.397

3.3.2.9 固定化漆酶重复性探究

游离漆酶具有价格昂贵，反应进度无法控制，不能回收利用等缺点。固定化漆酶克服了游离酶不能回收利用的缺点，降低了漆酶的使用成本。如图 3-15 所示，固定化漆酶重复氧化愈创木酚溶液 10 次后，其依然保留有 59.47% 的相对活性。

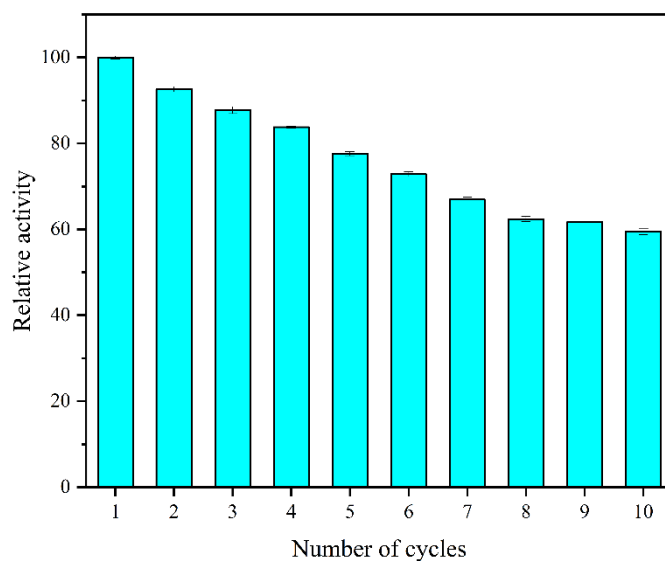


图 3-15 固定化漆酶重复性

Figure 3-15 Reusabilities of immobilized laccase

3.3.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶降解染料及其废水研究

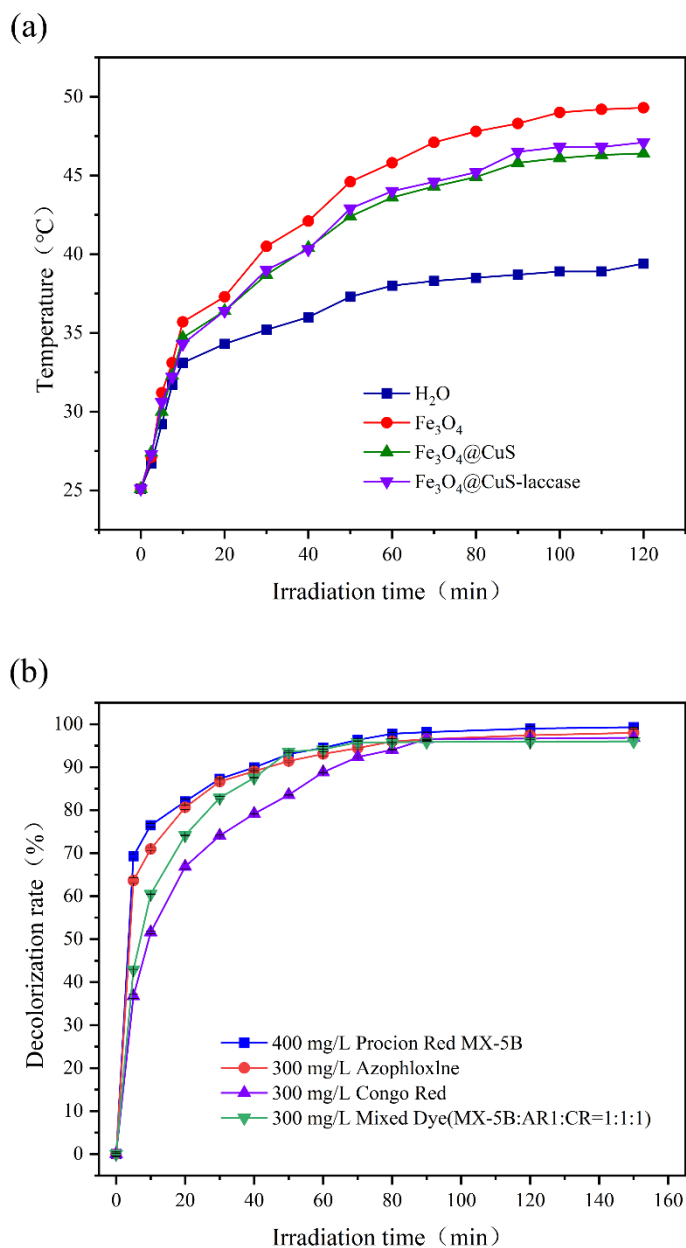
3.3.3.1 染料、染料废水光照降解动力学和光照升温动力学探究

偶氮染料是偶氮基两端连接芳基的一类有机化合物。酶裂解偶氮染料的最大问题是形成有毒产物，主要是胺^[125]。漆酶对偶氮染料的降解首先是偶氮键的不对称裂解，然后是氧化裂解、脱硫、脱胺、去甲基化和二羟基化，最终形成无毒降解产物^[126, 127]。本章选取了三种偶氮染料（活性红 MX-5B 400 mg/L、偶氮荧光桃红 300 mg/L、刚果红 300 mg/L 和混合染料 300 mg/L（活性红 MX-5B：偶氮荧光桃红：刚果红=1：1：1））作为磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶降解偶氮染料和染料废水的实例。

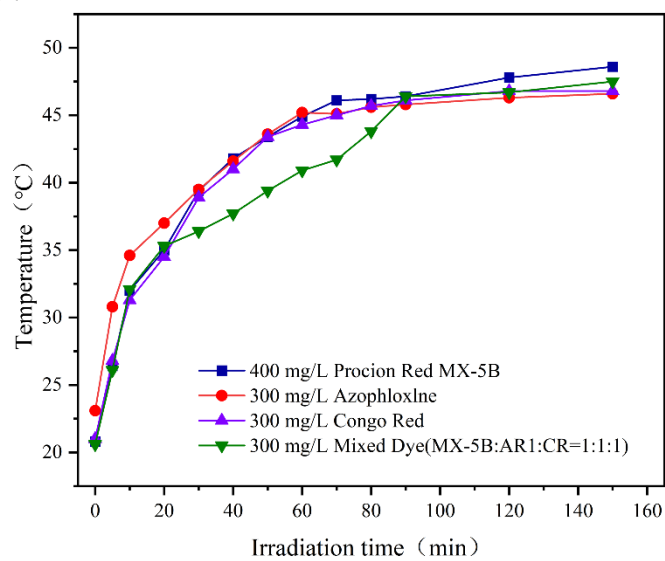
本章降解偶氮类染料及其废水，我们用相同重量的固定化漆酶加入到体积和初始温度不同的染料及其废水中，光照 150 min，间隔相同时间测试溶液中的染料浓度，计算出固定酶对不同染料及其废水的降解率，以此来测试 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶的应用前景。如图 3-16(a)所示，取相同重量的 Fe_3O_4 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ -Laccase 分别加入到体积和初始温度相同的蒸馏水中，经过氙灯光照 120 min，蒸馏水、 Fe_3O_4 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 和 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ -Laccase 体系的温度分别达到 39.4℃、49.3℃、46.4℃和 47.1℃。其中 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ -Laccase 光照 120 min 后温度为 47.1℃，比较接近固定化漆酶的最适催化温度，同时 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ -Laccase 和蒸馏水体系的最终温度相差 7.7℃，证明 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 载体可以将光辐射转换成热量。

由图 3-16(c)和(e)可知，磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ -Laccase 加入到不同偶氮染料和染料废水中后，随着光照时间的增加，各个体系的温度都在逐渐提高，最终都达到 47℃左右，说明载体的光热转换性能受环境的影响较小。另外由图 3-15(b)和(d)可知，活性红 MX-5B、偶氮荧光桃红、刚果红和混合染料的降解效率最快的之间为 0-20 min，活性红 MX-5B、偶氮荧光桃红、刚果红和混合染料废水的降解效率最快的之间为 0-10 min。对于活性红 MX-5B、偶氮荧光桃红、刚果红和混合染料，在光热催化降解 90 min 后就基本达到最大降解率，分别为 99.7%、98.1%、96.9%和 96.1%；对于活性红 MX-5B、偶氮荧光桃红、刚果红和混合染料废水，在光热催化降解 60 min 后就基本达到最大降解率，分别为 97.5%、97.2%、96.7%和 96.9%。表明制备出的磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶能够高效降解偶氮类染料，并且当磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶处于偶氮染料废水环境中时，

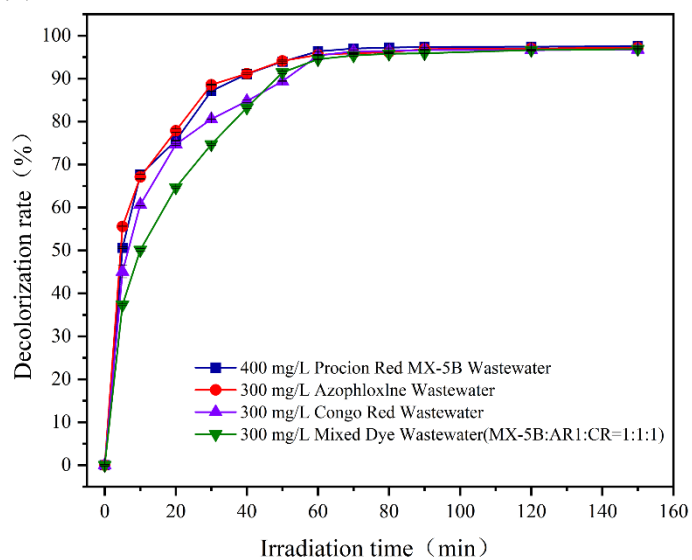
磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 载体能够降低环境对酶催化活性的影响, 保持固定化漆酶对偶氮染料的降解效率, 这拓展了漆酶的工业应用前景。如图 3-15(f)所示, 将相同浓度的染料加入相同浓度的固定化漆酶, 在黑暗条件下反应 0-150 min, 发现偶氮染料的降解率最高为 85%, 远低于在光热条件下的降解率, 说明固定化漆酶在光热条件下具有较高的催化活性。



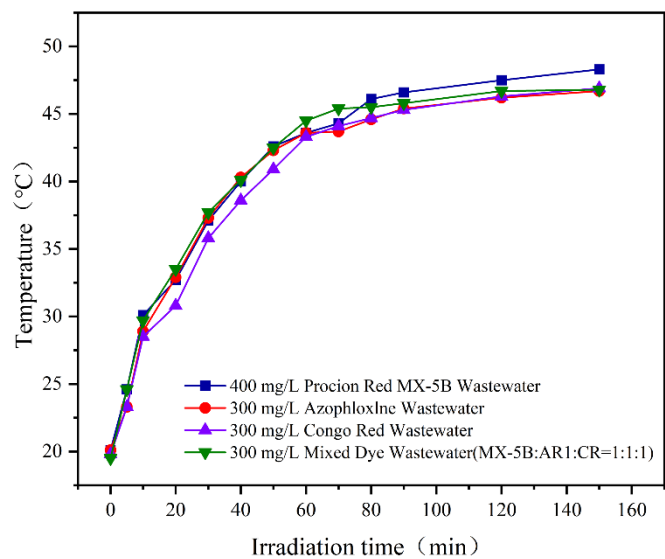
(c)



(d)



(e)



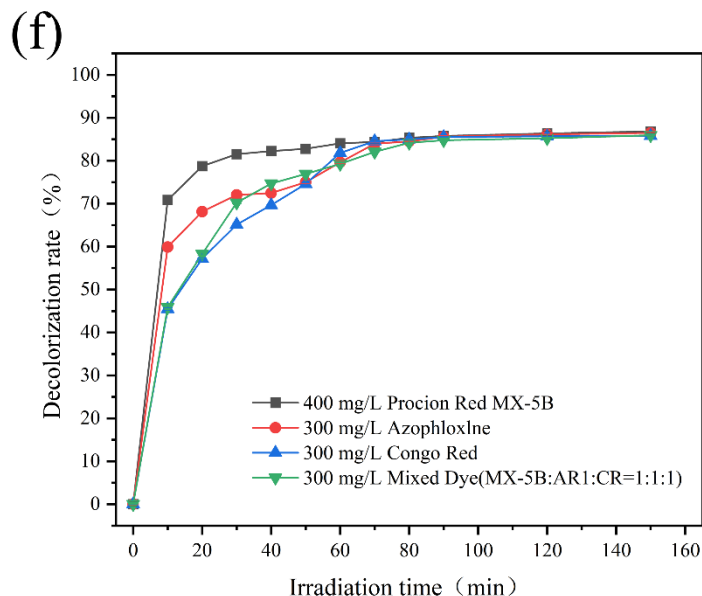


图 3-16 光热转换性能(a)、偶氮类染料降解光热动力学(b)、偶氮类染料光热降解升温动力学(c)、偶氮类染料废水光热降解动力学(d)、偶氮类染料废水光热降解升温动力学(e)、偶氮类染料的热催化降解(f)

Figure 3-16 Photothermal behavior (a), kinetics (b) and temperature changes (c) photothermal catalytic degradation of azo dyes, and kinetics (d) and temperature changes (e) photothermal catalytic degradation of azo dyes wastewater, and thermocatalytic degradation of azo dyes (f)

3.3.3.2 染料、染料废水光照降解重复性探究

通过对活性红 MX-5B、偶氮荧光桃红、刚果红和混合染料进行重复降解，可以检测出磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶的重复降解能力。将测试染料放入氙灯光源下光照 60 min，并重复降解 10 次，结果如图 3-17(a)所示。活性红 MX-5B、偶氮荧光桃红、刚果红和混合染料第 1 次的降解率分别为 94.2%、95.5%、94.9% 和 97.9%；重复 10 次后的降解率分别为 82.7%、82.3%、83.8% 和 89.3%，表明磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶具有降解偶氮染料的能力。

偶氮类染料在工业生产中，通常会混合着各种物质以废水的形式排放。因此，磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶对偶氮染料的降解能力的考察，需要在废水环境中检测。如图 3-17(b)所示，将含有活性红 MX-5B、偶氮荧光桃红、刚果红和混合染料的染料废水于氙灯光源下光照 60 min，并重复 10 次，测试其降解率。第 1 次降解结束时，废水中活性红 MX-5B、偶氮荧光桃红、刚果红和混合染料的降解率分别为 96.4%、96.5%、96.2%、96.9%；第 10 次降解结束后，废水中

活性红 MX-5B、偶氮荧光桃红、刚果红和混合染料的降解率分别为 87.1%、87.1%、88.2%、87.8%，降幅不超过 15%。这表明磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶能够降低废水中各种污染物对漆酶酶活的影响，证明磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶在环境修复方面的光明前景。

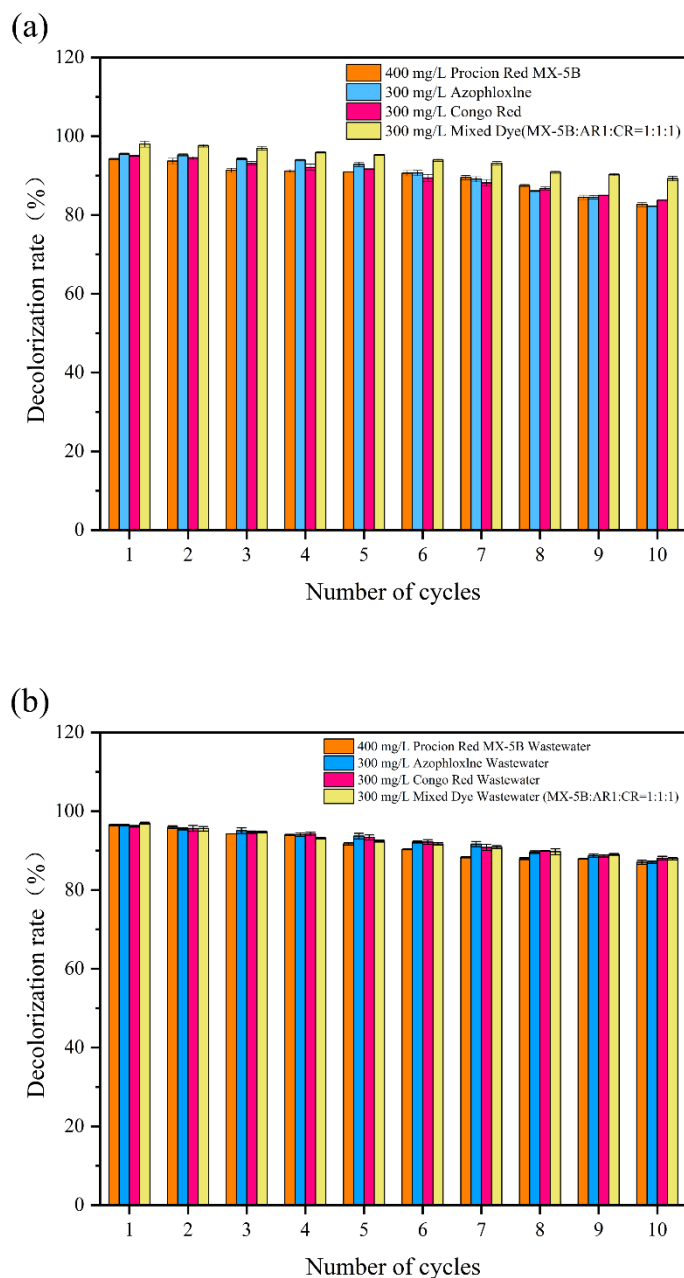


图 3-17 偶氮类染料光热降解重复性(a)、偶氮类染料废水光热降解重复性(b)

Figure 3-17 Reusabilities of photothermal catalytic degradation of azo dyes (a) and azo dyes wastewater (b)

3.4 小结

将游离漆酶固定在磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 载体上用于降解偶氮染料及染料废水。制备出具有磁性和光热转换性能的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米材料，将漆酶共价固定在载体上得到固定化漆酶，考察了固定化漆酶的性能和在废水中的实际降解效果。具体的：

（1）通过共沉淀法成功制备出磁性 Fe_3O_4 纳米粒子，将 Fe_3O_4 纳米粒子进行巯基化改性，再利用巯基和铜离子的配位作用制备出 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子；最后利用铜离子螯合的方法进行漆酶的固定，得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ -Laccase。

（2）用 SEM、TEM、XRD、M-H、XPS、FT-IR 等表征手段研究了 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子的形貌、结构、磁性性质和表面性质。

（3）测试了磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶的催化性能和环境耐受性。与游离漆酶比较，固定化漆酶的催化性能和环境耐受性均有显著提升。

（4）通过氙灯模拟光照对三种偶氮类染料和染料废水的降解动力学、光照升温动力学和降解重复性进行了系统研究。 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 的光热转换性能能够保证固定酶在环境应用时体系温度尽可能接近漆酶最大催化活性的最适温度。固定酶的重复性降解测试表明，固定酶能够克服环境中各种不利物质的影响，并快速稳定的降解偶氮类染料废水。

总结与展望

游离漆酶存在难回收利用、生产成本低、易受环境影响致使活性减弱等缺陷。本文研究了两种同时具有磁性和光热转换性能的载体，通过将漆酶固定在载体上制备磁性光热固定化漆酶，所得的固定酶具有高光热转换效率、高酶活、高催化效率和高重复利用率，能降低催化反应的能耗和生产成本，并能高效处理工业染料废水。具体的：

(1) 采用共沉淀法制备磁性 Fe_3O_4 纳米粒子，将 Fe_3O_4 与海藻酸钠发生交联，经不完全碳化后，制备出表面具有丰富羧基的磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子；经活化羧基后加入漆酶，制得 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶。用 TEM、XRD、XPS、M-H、XPS、RT-IR 等测试手段对 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子进行表征分析。载体的光热转换测试结果表明，制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 纳米粒子能够明显的将光能转化为热能。三苯甲烷类染料和三苯甲烷类染料废水的降解及重复性降解测试结果表明，制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ 固定化漆酶能够降低环境污染物对漆酶的影响，高效降解三苯甲烷类染料废水。

(2) 采用共沉淀法制备磁性 Fe_3O_4 纳米粒子，将 Fe_3O_4 巯基化改性后在其表面沉积 CuS 纳米粒子，利用铜离子的螯合作用制得磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶。用 TEM、XRD、XPS、M-H、XPS、RT-IR 等测试手段对 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子进行表征分析。载体的光热升温动力学测试结果表明，制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 纳米粒子具有高效的光热转换能力，能够显著提升体系温度，使得催化反应体系温度接近漆酶的最适温度。偶氮类染料和偶氮类染料废水的降解及重复性降解测试结果表明，制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CuS}$ 固定化漆酶能够提升环境耐受性，高效降解偶氮类染料废水。

本文将磁性材料与光热转换材料结合，使得制备的固定化漆酶同时具备超顺磁性和光热转换性能，固定化漆酶在染料废水实际处理中不需要额外加热，降低了催化反应过程中的能源消耗，符合当前“双碳”政策。

参考文献

- [1] Ali M M, Hossain D, Al-Imran A, et al. Environmental pollution with heavy metals: A public health concern[J]. Heavy metals-their environmental impacts and mitigation, 2021: 771-783.
- [2] Chen K, Liu S, Zhang Q. Degradation and Detection of Endocrine Disruptors by Laccase-Mimetic Polyoxometalates [J]. Frontiers in Chemistry, 2022, 10: 854045.
- [3] Verlicchi P, Zambello E. How efficient are constructed wetlands in removing pharmaceuticals from untreated and treated urban wastewaters? A review [J]. Science of The Total Environment, 2014, 470-471: 1281-306.
- [4] Patra C, Suganya E, Sivaprakasam S, et al. A detailed insight on fabricated porous chitosan in eliminating synthetic anionic dyes from single and multi-adsorptive systems with related studies [J]. Chemosphere, 2021, 281: 130706.
- [5] Afrin S, Shuvo H R, Sultana B, et al. The degradation of textile industry dyes using the effective bacterial consortium [J]. Heliyon, 2021, 7(10):1-10.
- [6] Mousavi S M, Hashemi S A, Iman Moezzi S M, et al. Recent advances in enzymes for the bioremediation of pollutants [J]. Biochemistry research international, 2021, 2021(12):1-12.
- [7] Bhandari S, Poudel D K, Marahatha R, et al. Microbial enzymes used in bioremediation [J]. Journal of Chemistry, 2021, 2021: 1-17.
- [8] Guan Z B, Song C M, Zhang N, et al. Overexpression, characterization, and dye-decolorizing ability of a thermostable, pH-stable, and organic solvent-tolerant laccase from *Bacillus pumilus* W3 [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2014, 101: 1-6.
- [9] Shekher R, Sehgal S, Kamthania M, et al. Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications [J]. Enzyme research, 2011, 2011(11):1-11.
- [10] Su J, Fu J, Wang Q, et al. Laccase: a green catalyst for the biosynthesis of poly-phenols [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2018, 38(2): 294-307.
- [11] Liu Y, Huang L, Guo W, et al. Cloning, expression, and characterization of a thermostable and pH-stable laccase from *Klebsiella pneumoniae* and its application to dye decolorization [J]. Process Biochemistry, 2017, 53: 125-134.
- [12] Santo M, Weitsman R, Sivan A. The role of the copper-binding enzyme—laccase—in the biodegradation of polyethylene by the actinomycete *Rhodococcus ruber* [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013, 84: 204-210.
- [13] Becker D, Della Giustina S V, Rodriguez-Mozaz S, et al. Removal of antibiotics in wastewater by enzymatic treatment with fungal laccase—degradation of compounds does not always eliminate toxicity [J]. Bioresource technology, 2016, 219: 500-509.
- [14] Mayer A M, Staples R C. Laccase: new functions for an old enzyme[J].

- Phytochemistry, 2002, 60(6): 551-565.
- [15] Patra C, Gupta R, Bedadeep D, et al. Surface treated acid-activated carbon for adsorption of anionic azo dyes from single and binary adsorptive systems: A detail insight [J]. Environmental Pollution, 2020, 266: 115102.
 - [16] Varadharaj V P, Ramesh G, Kumar A, et al. Synthesis, characterization, and application of oxidant-modified biochar prepared from sawdust for sequestration of basic fuchsin: isotherm, kinetics, and toxicity studies[J]. Biomass Conversion and Biorefinery, 2023, 13(11): 9525-9536.
 - [17] Chu S, Majumdar A. Opportunities and challenges for a sustainable energy future[J]. nature, 2012, 488(7411): 294-303.
 - [18] Ha M N, Lu G, Liu Z, et al. 3DOM-LaSrCoFeO_{6-δ} as a highly active catalyst for the thermal and photothermal reduction of CO₂ with H₂O to CH₄ [J]. Journal of Materials Chemistry A, 2016, 4(34): 13155-13165.
 - [19] Xu J, Li X, Wu X, et al. Hierarchical CuO colloidosomes and their structure enhanced photothermal catalytic activity [J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2016, 120(23): 12666-12672.
 - [20] John S K, John D, Bijoy N, et al. Magnesium diboride: An effective light-to-heat conversion material in solid-state [J]. Applied Physics Letters, 2017, 111(3) : 033901.
 - [21] Wang X Q, Tan C F, Chan K H, et al. Nanophotonic-engineered photothermal harnessing for waste heat management and pyroelectric generation [J]. ACS nano, 2017, 11(10): 10568-10574.
 - [22] Lv Y, Zhang C, He A, et al. Photocatalytic nanofiltration membranes with self - cleaning property for wastewater treatment [J]. Advanced Functional Materials, 2017, 27(27): 1700251.
 - [23] Gao M, Connor P K N, Ho G W. Plasmonic photothermic directed broadband sunlight harnessing for seawater catalysis and desalination [J]. Energy & Environmental Science, 2016, 9(10): 3151-3160.
 - [24] Wang P. Emerging investigator series: the rise of nano-enabled photothermal materials for water evaporation and clean water production by sunlight [J]. Environmental Science: Nano, 2018, 5(5): 1078-1089.
 - [25] Jain P K, Lee K S, El-Sayed I H, et al. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine [J]. The journal of physical chemistry B, 2006, 110(14): 7238-7248.
 - [26] Mayer K M, Hafner J H. Localized surface plasmon resonance sensors [J]. Chemical reviews, 2011, 111(6): 3828-3857.
 - [27] Wang Y, Meng H M, Li Z. Near-infrared inorganic nanomaterial-based nanosystems for photothermal therapy [J]. Nanoscale, 2021, 13(19): 8751-8772.
 - [28] Csáki A, Stranik O, Fritzsche W. Localized surface plasmon resonance based biosensing[J]. Expert Review of Molecular Diagnostics, 2018, 18(3): 279-296.
 - [29] Xu J W, Yao K, Xu Z K. Nanomaterials with a photothermal effect for antibacterial activities: an overview [J]. Nanoscale, 2019, 11(18): 8680-8691.

- [30] Jia M, Liu J, Zhang J, et al. An immunofiltration strip method based on the photothermal effect of gold nanoparticles for the detection of Escherichia coli O157: H7 [J]. *Analyst*, 2019, 144(2): 573-578.
- [31] Zhang D, Du S, Su S, et al. Rapid detection method and portable device based on the photothermal effect of gold nanoparticles [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2019, 123: 19-24.
- [32] Huang X, Zhang W, Guan G, et al. Design and Functionalization of the NIR-Responsive Photothermal Semiconductor Nanomaterials for Cancer Theranostics [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2017, 50(10): 2529-2538.
- [33] Zhu L, Gao M, Pen C K N, et al. Solar-driven photothermal nanostructured materials designs and prerequisites for evaporation and catalysis applications [J]. *Materials Horizons*, 2018, 5(3): 323-343.
- [34] Asahi R, Morikawa T, Ohwaki T, et al. Visible-Light Photocatalysis in Nitrogen-Doped Titanium Oxides [J]. *Science*, 2001, 293(5528): 269-271.
- [35] Li J, Wu N. Semiconductor-based photocatalysts and photoelectrochemical cells for solar fuel generation: a review [J]. *Catalysis Science & Technology*, 2015, 5(3): 1360-1384.
- [36] Huang H, Shi R, Zhang X, et al. Photothermal-Assisted Triphase Photocatalysis Over a Multifunctional Bilayer Paper [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(42): 22963-22969.
- [37] Zhang X, Xu C, Zhang L, et al. Photothermal Catalytic Water Splitting at Diverse Two-Phase Interfaces Based on Cu-TiO₂ [J]. *ACS Applied Energy Materials*, 2022, 5(4): 4564-4576.
- [38] Ying P, Li M, Yu F, et al. Band Gap Engineering in an Efficient Solar-Driven Interfacial Evaporation System [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(29): 32880-32887.
- [39] Xue Y, Zhang L, Liu F, et al. Surface Bandgap Engineering of Nanostructured Implants for Rapid Photothermal Ion Therapy of Bone Defects [J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2022, 11(22): 2200998.
- [40] Chen X, Liu L, Yu P Y, et al. Increasing Solar Absorption for Photocatalysis with Black Hydrogenated Titanium Dioxide Nanocrystals [J]. *Science*, 2011, 331(6018): 746-750.
- [41] Wang J, Li Y, Deng L, et al. High-Performance Photothermal Conversion of Narrow-Bandgap Ti₂O₃ Nanoparticles [J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(3): 1603730.
- [42] Ding D, Huang W, Song C, et al. Non-stoichiometric MoO_{3-x} quantum dots as a light-harvesting material for interfacial water evaporation [J]. *Chemical Communications*, 2017, 53(50): 6744-6747.
- [43] Nicolas - Boluda A, Yang Z, Guilbert T, et al. Self-Assemblies of Fe₃O₄ Nanocrystals: Toward Nanoscale Precision of Photothermal Effects in the Tumor Microenvironment [J]. *Advanced Functional Materials*, 2021, 31(4): 2006824.
- [44] Shen S, Wang S, Zheng R, et al. Magnetic nanoparticle clusters for

- photothermal therapy with near-infrared irradiation [J]. *Biomaterials*, 2015, 39: 67-74.
- [45] Pan P, Lin Y, Gan Z, et al. Magnetic field enhanced photothermal effect of Fe_3O_4 nanoparticles [J]. *Journal of Applied Physics*, 2018, 123(11): 115115.
- [46] Zhao Y, Sadat M E, Dunn A, et al. Photothermal effect on Fe_3O_4 nanoparticles irradiated by white-light for energy-efficient window applications [J]. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 2017, 161: 247-254.
- [47] Chu M, Shao Y, Peng J, et al. Near-infrared laser light mediated cancer therapy by photothermal effect of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(16): 4078-4088.
- [48] Lyu J, Li Z, Men J, et al. Covalent immobilization of *Bacillus subtilis* lipase A on Fe_3O_4 nanoparticles by aldehyde tag: An ideal immobilization with minimal chemical modification [J]. *Process Biochemistry*, 2019, 81: 63-69.
- [49] Gao M, Zhu L, Pen C K, et al. Solar absorber material and system designs for photothermal water vaporization towards clean water and energy production [J]. *Energy & Environmental Science*, 2019, 12(3): 841-864.
- [50] Gusain R, Kumar N, Ray S S. Recent advances in carbon nanomaterial-based adsorbents for water purification [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2020, 405: 213111.
- [51] Ghasemi H, Ni G, Marconnet A M, et al. Solar steam generation by heat localization [J]. *Nature Communications*, 2014, 5(1): 4449.
- [52] Wang Y, Meng H M, Song G, et al. Conjugated-Polymer-Based Nanomaterials for Photothermal Therapy [J]. *ACS Applied Polymer Materials*, 2020, 2(10): 4258-4272.
- [53] Yang Z, Chen X. Semiconducting Perylene Diimide Nanostructure: Multifunctional Phototheranostic Nanoplatfrom [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2019, 52(5): 1245-1254.
- [54] Rajora M A, Lou J W H, Zheng G. Advancing porphyrin's biomedical utility via supramolecular chemistry [J]. *Chemical Society Reviews*, 2017, 46(21): 6433-6469.
- [55] Li X, Lee S, Yoon J. Supramolecular photosensitizers rejuvenate photodynamic therapy [J]. *Chemical Society Reviews*, 2018, 47(4): 1174-1188.
- [56] Zhao L, Liu Y, Xing R, et al. Supramolecular Photothermal Effects: A Promising Mechanism for Efficient Thermal Conversion [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(10): 3793-3801.
- [57] Tan C, Cao X, Wu X J, et al. Recent Advances in Ultrathin Two-Dimensional Nanomaterials [J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(9): 6225-6331.
- [58] Jeyabalan J, Veluchamy A, Kumar A, et al. A review on the laccase assisted decolourization of dyes: Recent trends and research progress [J]. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2023, 151: 105081.
- [59] Zhu J, Zhang H, Huang K, et al. Comprehensive analysis of the laccase gene family in tea plant highlights its roles in development and stress responses [J]. *BMC Plant Biology*, 2023, 23(1): 129.
- [60] Guan Z B, Luo Q, Wang H R, et al. Bacterial laccases: promising biological

- p>green tools for industrial applications [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2018, 75(19): 3569-3592.
- [61] Singh D, Gupta N. Microbial Laccase: a robust enzyme and its industrial applications [J]. Biologia, 2020, 75(8): 1183-1193.
- [62] Sousa A C, Martins L O, Robalo M P. Laccases: Versatile biocatalysts for the synthesis of heterocyclic cores[J]. Molecules, 2021, 26(12): 3719.
- [63] Piscitelli A, Del Vecchio C, Faraco V, et al. Fungal laccases: Versatile tools for lignocellulose transformation [J]. Comptes Rendus Biologies, 2011, 334(11): 789-794.
- [64] Wang J, Feng J, Jia W, et al. Lignin engineering through laccase modification: a promising field for energy plant improvement [J]. Biotechnology for Biofuels, 2015, 8(1): 145.
- [65] Asano T, Taoka M, Yamauchi Y, et al. Re-examination of a α -chymotrypsin-solubilized laccase in the pupal cuticle of the silkworm, *Bombyx mori*: Insights into the regulation system for laccase activation during the ecdysis process [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2014, 55: 61-69.
- [66] Gutiérrez-Antón M, Santiago-Hernández A, Rodríguez-Mendoza J, et al. Improvement of Laccase Production by *Thielavia terrestris* Co3Bag1. Enhancing the Bio-Catalytic Performance of the Native Thermophilic Tt LacA via Immobilization in Copper Alginate Gel Beads[J]. Journal of Fungi, 2023, 9(3): 308.
- [67] Bayramoğlu G, Arıca M Y. Immobilization of laccase onto poly (glycidylmethacrylate) brush grafted poly (hydroxyethylmethacrylate) films: Enzymatic oxidation of phenolic compounds[J]. Materials Science and Engineering: C, 2009, 29(6): 1990-1997.
- [68] Brady D, Jordaan J. Advances in enzyme immobilisation[J]. Biotechnology letters, 2009, 31: 1639-1650.
- [69] Agrawal K, Chaturvedi V, Verma P. Fungal laccase discovered but yet undiscovered [J]. Bioresources and Bioprocessing, 2018, 5(1): 1-12.
- [70] Needhidasan S, Ramalingam C. Stratagems employed for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid removal from polluted water sources [J]. Clean Technologies and Environmental Policy, 2017, 19(6): 1607-1620.
- [71] Sheldon R A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance [J]. Advanced Synthesis & Catalysis, 2007, 349(8-9): 1289-1307.
- [72] Fang H, Huang J, Ding L, et al. Preparation of magnetic chitosan nanoparticles and immobilization of laccase [J]. Journal of Wuhan University of Technology-Mater Sci Ed, 2009, 24(1): 42-47.
- [73] Nguyen L N, Hai F I, Dosseto A, et al. Continuous adsorption and biotransformation of micropollutants by granular activated carbon-bound laccase in a packed-bed enzyme reactor [J]. Bioresource Technology, 2016, 210: 108-116.
- [74] Won K, Kim S, Kim K J, et al. Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads [J]. Process Biochemistry, 2005, 40(6): 2149-2154.
- [75] Prakash O, Khare S. Applicability of Nanomatrices Immobilized α -amylase in

- Biotechnology [J]. HCTL Open Int J Technol Innovations Res, 2015, 14: 1-9.
- [76] Lu L, Zhao M, Zhang B B, et al. Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(6): 1232-1239.
- [77] Costa S A, Azevedo H S, Reis R L. Enzyme immobilization in biodegradable polymers for biomedical applications [J]. 2005:301-324.
- [78] Liang J F, Li Y T, Yang V C. Biomedical application of immobilized enzymes [J]. Journal of pharmaceutical sciences, 2000, 89(8): 979-990.
- [79] Mohamad N R, Marzuki N H C, Buang N A, et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes [J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2015, 29(2): 205-220.
- [80] Nguyen H H, Kim M. An overview of techniques in enzyme immobilization [J]. Applied Science and Convergence Technology, 2017, 26(6): 157-163.
- [81] Ma H F, Meng G, Cui B K, et al. Chitosan crosslinked with genipin as supporting matrix for biodegradation of synthetic dyes: Laccase immobilization and characterization [J]. Chemical Engineering Research and Design, 2018, 132: 664-676.
- [82] Lassouane F, Aït-Amar H, Amrani S, et al. A promising laccase immobilization approach for Bisphenol A removal from aqueous solutions [J]. Bioresource Technology, 2019, 271: 360-367.
- [83] Fernández-Fernández M, Sanromán M Á, Moldes D. Recent developments and applications of immobilized laccase [J]. Biotechnology Advances, 2013, 31(8): 1808-1825.
- [84] Beatriz B, Paula G, Batista-Viera F. Immobilization of enzymes: A literature survey [J]. Immobil Enzym Cells, 2013, 1051: 15-31.
- [85] Kurzbaum E, Raizner Y, Kuc M E, et al. Phenol biodegradation by bacterial cultures encapsulated in 3D microfiltration-membrane capsules [J]. Environmental Technology, 2019: 2875-2883.
- [86] Gill J, Orsat V, Kermasha S. Optimization of encapsulation of a microbial laccase enzymatic extract using selected matrices [J]. Process Biochemistry, 2018, 65: 55-61.
- [87] Rother C, Nidetzky B. Enzyme immobilization by microencapsulation: methods, materials, and technological applications [J]. Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology, 2009: 1-21.
- [88] Arroyo D M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones [J]. Ars Pharmaceutica (Internet), 1998, 39(2): 23-39.
- [89] Brady D, Jordaan J. Advances in enzyme immobilisation [J]. Biotechnology letters, 2009, 31: 1639-1650.
- [90] Russo M E, Giardina P, Marzocchella A, et al. Assessment of anthraquinone-dye conversion by free and immobilized crude laccase mixtures [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2008, 42(6): 521-530.

- [91] Liu Y, Guo C, Wang F, et al. Preparation of magnetic silica nanoparticles and their application in laccase immobilization [J]. *Chin J Process Eng*, 2008, 8: 583-588.
- [92] Zhang Y, Zeng G M, Tang L, et al. A hydroquinone biosensor using modified core-shell magnetic nanoparticles supported on carbon paste electrode [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, 22(9-10): 2121-2126.
- [93] Zhao M, Wang W, Li X, et al. Preparation of surface modified alginate nanoparticles with acyl chloride groups and its use in immobilization of laccase [J]. *Zhongguo Zaozhi Xuebao/Trans China Pulp Pap*, 2008, 23: 94-99.
- [94] Huang J, Xiao H, Li B, et al. Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on copper tetra-aminophthalocyanine-Fe₃O₄ nanoparticle composite [J]. *Biotechnology and applied biochemistry*, 2006, 44(2): 93-100.
- [95] Gao S, Wang Y, Diao X, et al. Effect of pore diameter and cross-linking method on the immobilization efficiency of *Candida rugosa* lipase in SBA-15 [J]. *Bioresource technology*, 2010, 101(11): 3830-3837.
- [96] Duan S, Wang W, Li S, et al. Moderate laccase-crosslinking improves the mechanical and thermal properties of acid-swollen collagen-based films modified by gallotannins [J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 106: 105917.
- [97] Ji C, Nguyen L N, Hou J, et al. Direct immobilization of laccase on titania nanoparticles from crude enzyme extracts of *P. ostreatus* culture for micro-pollutant degradation [J]. *Separation and Purification Technology*, 2017, 178: 215-223.
- [98] Cardinal-Watkins C, Nicell J A. Enzyme-catalyzed oxidation of 17 β -estradiol using immobilized laccase from *Trametes versicolor*[J]. *Enzyme research*, 2011, 2011:1-11.
- [99] Niladevi K N, Prema P. Immobilization of laccase from *Streptomyces psammoticus* and its application in phenol removal using packed bed reactor [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 24: 1215-1222.
- [100] Timur S, Pazarlıoğlu N, Pilloton R, et al. Thick film sensors based on laccases from different sources immobilized in polyaniline matrix [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2004, 97(1): 132-136.
- [101] Tastan E, Önder S, Kok F N. Immobilization of laccase on polymer grafted polytetrafluoroethylene membranes for biosensor construction [J]. *Talanta*, 2011, 84(2): 524-530.
- [102] Liu Y, Zeng Z, Zeng G, et al. Immobilization of laccase on magnetic bimodal mesoporous carbon and the application in the removal of phenolic compounds [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 115: 21-26.
- [103] García-Morales R, García-García A, Orona-Navar C, et al. Biotransformation of emerging pollutants in groundwater by laccase from *P. sanguineus* CS43 immobilized onto titania nanoparticles [J]. *Journal of environmental chemical engineering*, 2018, 6(1): 710-717.
- [104] Romero-Arcos M, Garnica-Romo M G, Martínez-Flores H E. Electrochemical study and characterization of an amperometric biosensor based on the immobilization of laccase in a nanostructure of TiO₂ synthesized by the sol-

- gel method [J]. *Materials*, 2016, 9(7): 543.
- [105] Addorisio V, Sannino F, Mateo C, et al. Oxidation of phenyl compounds using strongly stable immobilized-stabilized laccase from *Trametes versicolor* [J]. *Process Biochemistry*, 2013, 48(8): 1174-1180.
- [106] Hou J, Dong G, Ye Y, et al. Enzymatic degradation of bisphenol-A with immobilized laccase on TiO₂ sol-gel coated PVDF membrane [J]. *Journal of Membrane Science*, 2014, 469: 19-30.
- [107] Patel S K S, Kalia V C, Lee J K. Laccase Immobilization on Copper-Magnetic Nanoparticles for Efficient Bisphenol Degradation [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2023, 33(1): 127-134.
- [108] Alsaiari N S, Amari A, Katubi K M, et al. The biocatalytic degradation of organic dyes using laccase immobilized magnetic nanoparticles[J]. *Applied Sciences*, 2021, 11(17): 8216.
- [109] Virk A P, Sharma P, Capalash N. Use of laccase in pulp and paper industry [J]. *Biotechnology progress*, 2012, 28(1): 21-32.
- [110] Sadhasivam S, Savitha S, Swaminathan K. Deployment of *Trichoderma harzianum* WL1 laccase in pulp bleaching and paper industry effluent treatment [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2010, 18(8): 799-806.
- [111] Singh G, Kaur K, Puri S, et al. Critical factors affecting laccase-mediated biobleaching of pulp in paper industry [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2015, 99: 155-164.
- [112] Sharma D, Chaudhary R, Kaur J, et al. Greener approach for pulp and paper industry by Xylanase and Laccase [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, 25: 101604.
- [113] Amin R, Khorshidi A, Shojaei A F, et al. Immobilization of laccase on modified Fe₃O₄@SiO₂@Kit-6 magnetite nanoparticles for enhanced delignification of olive pomace bio-waste [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 114: 106-113.
- [114] Rawal R, Chawla S, Pundir C S. Polyphenol biosensor based on laccase immobilized onto silver nanoparticles/multiwalled carbon nanotube/polyaniline gold electrode [J]. *Analytical biochemistry*, 2011, 419(2): 196-204.
- [115] Barrière F, Kavanagh P, Leech D. A laccase glucose oxidase biofuel cell prototype operating in a physiological buffer [J]. *Electrochimica Acta*, 2006, 51(24): 5187-5192.
- [116] Mishra S, Maiti A. The efficacy of bacterial species to decolourise reactive azo, anthroquinone and triphenylmethane dyes from wastewater: a review [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25: 8286-8314.
- [117] Mani S, Bharagava R N. Exposure to crystal violet, its toxic, genotoxic and carcinogenic effects on environment and its degradation and detoxification for environmental safety [J]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 237*, 2016: 71-104.
- [118] Stamatii A, Nebbia C, De Angelis I, et al. Effects of malachite green (MG) and its major metabolite, leucomalachite green (LMG), in two human cell

- lines [J]. *Toxicology in vitro*, 2005, 19(7): 853-858.
- [119] Yao Y, Gao M, Zhang Y, et al. Nonprecious bimetallic (Mo, Fe)-N/C nanostructures loaded on PVDF membrane for toxic CrVI reduction from water [J]. *Journal of hazardous materials*, 2020, 389: 121844.
- [120] Chubar N, Gerda V, Szlachta M, et al. Effect of Fe oxidation state (+ 2 versus + 3) in precursor on the structure of Fe oxides/carbonates-based composites examined by XPS, FTIR and EXAFS [J]. *Solid State Sciences*, 2021, 121: 106752.
- [121] Siddhardhan E V, Surender S, Arumanayagam T. Degradation of tetracycline drug in aquatic environment by visible light active CuS/CdS photocatalyst[J]. *Inorganic Chemistry Communications*, 2023, 147: 110244.
- [122] Wu S, Zhang P, Jiang Z, et al. Enhanced peroxidase-like activity of CuS hollow nanocages by plasmon-induced hot carriers and photothermal effect for the dual-mode detection of tannic acid [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2022, 14(35): 40191-40199.
- [123] Xie Y, Riedinger A, Prato M, et al. Copper sulfide nanocrystals with tunable composition by reduction of covellite nanocrystals with Cu^+ ions [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(46): 17630-17637.
- [124] Kong L, Zou S, Mei J, et al. Outstanding resistance of H_2S -modified Cu/TiO_2 to SO_2 for capturing gaseous Hg^0 from nonferrous metal smelting flue gas: performance and reaction mechanism [J]. *Environmental science & technology*, 2018, 52(17): 10003-10010.
- [125] Telke A A, Kalyani D C, Dawkar V V, et al. Influence of organic and inorganic compounds on oxidoreductive decolorization of sulfonated azo dye C.I. Reactive Orange 16 [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 172(1): 298-309.
- [126] Telke A A, Kadam A A, Jagtap S S, et al. Biochemical characterization and potential for textile dye degradation of blue laccase from *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146 [J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2010, 15(4): 696-703.
- [127] Telke A A, Ghodake G S, Kalyani D C, et al. Biochemical characteristics of a textile dye degrading extracellular laccase from a *Bacillus* sp. ADR [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(2): 1752-1756.
- [128] Mishra D, Arora R, Lahiri S, et al. Synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles by solvothermal method[J]. *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*, 2014, 50: 628-631.
- [129] Qi D, Lu J, Deng C, et al. Magnetically responsive $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{C} @ \text{SnO}_2$ core-shell microspheres: synthesis, characterization and application in phosphoproteomics[J]. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2009, 113(36): 15854-15861.
- [130] Liang H, Niu H, Li P, et al. Multifunctional $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{C} @ \text{Ag}$ hybrid nanoparticles: Aqueous solution preparation, characterization and photocatalytic activity[J]. *Materials Research Bulletin*, 2013, 48(7): 2415-2419.

-
- [131] Xia H, Cui B, Zhou J, et al. Synthesis and characterization of $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{C} @ \text{Ag}$ nanocomposites and their antibacterial performance[J]. *Applied Surface Science*, 2011, 257(22): 9397-9402.
- [132] Campos T B C, Alves W A. Employing vibrational spectroscopy to confirm the catalytic activity of Ce (III) and Cr (III) towards amide bond cleavage[J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2016, 85: 134-138.
- [133] Zhao X, Chu X, Rauhut G, et al. Phosphorus analogues of methyl nitrite and nitromethane: CH_3OPO and CH_3PO_2 [J]. *Angewandte Chemie*, 2019, 131(35): 12292-12297.
- [134] Chong S, Zhang G, Tian H, et al. Rapid degradation of dyes in water by magnetic $\text{Fe}^0/\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{graphene}$ composites[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2016, 44: 148-157.
- [135] Lu J, Fu F, Ding Z, et al. Removal mechanism of selenite by Fe_3O_4 -precipitated mesoporous magnetic carbon microspheres[J]. *Journal of hazardous materials*, 2017, 330: 93-104.
- [136] Mao Z, Wu Y, Ma X Y, et al. In situ wide-frequency surface-enhanced infrared absorption spectroscopy enables one to decipher the interfacial structure of a Cu plating additive[J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2022, 13(39): 9079-9084.
- [137] Tian R, Seitz O, Li M, et al. Infrared characterization of interfacial Si–O bond formation on silanized flat SiO_2/Si surfaces[J]. *Langmuir*, 2010, 26(7): 4563-4566.
- [138] Cai L, Sun Y, Li W, et al. CuS hierarchical hollow microcubes with improved visible-light photocatalytic performance[J]. *RSC advances*, 2015, 5(119): 98136-98143.

攻读学位期间发表的学术论文目录

文章:

- (1) **Yuhang Wei**, Qingpeng Zhu, Weiwei Xie, et al. Biocatalytic enhancement of laccase immobilized on ZnFe_2O_4 nanoparticles and its application for degradation of textile dyes [J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2024,68: 216-223.
- (2) Zhaoifei Liu, Lili Zhang, **Yuhang Wei**, Zhiming Chen. Immobilization of laccase on $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MF-CNTs}$ for the rapid and sensitive biosensing of catechol [J]. New Journal of Chemistry, 2023, 47(17): 8083-8089.
- (3) Zhaoifei Liu, Xinyue Wang, **Yuhang Wei**, et al. Photothermal enhanced biosensing platform of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{CS-Au-Lac}$ for dopamine detection[J]. Microchemical Journal, 2024: 110094.

专利:

- (1) 陈志明, **卫雨航**, 崇庆阳, 李巧妹, 王秀敏, 汪春梅. 磁性固定化漆酶、制备方法及应用. 申请号: 2023118487162
- (2) 陈志明, 张莉莉, 刘肇菲, **卫雨航**, 汪春梅. 减反膜镀膜液及其制备方法、光伏玻璃珊瑚仿生减反膜及其制备方法. 中国, ZL 202210671450.8.
- (3) 陈志明, 刘肇菲, 涂成梓, **卫雨航**, 汪春梅. 一种磁性碳修饰的邻苯二酚传感器酶电极及其制备方法和应用. 中国, ZL202210698767.0.
- (4) 陈志明, 刘肇菲, **卫雨航**, 汪新月, 谢围围, 汪春梅. 磁性纳米粒子修饰的多巴胺光热酶电极、制备方法及应用. 申请号: 202310553205.1

致 谢

时光如水，生命如歌，转眼间硕士生活已经接近尾声。从 2016 年的秋天到 2024 年的盛夏，我在安徽工程大学度过了七年时光，这期间有喜悦，也有迷茫。在导师、同学、家人和朋友的帮助鼓励下，我顺利完成了硕士期间的学业并学会不断自我成长。

本论文是在陈志明教授的指导下完成的。我要由衷的感谢我的导师，无论是科研还是生活中遇到困难，陈老师都会悉心指导，帮助我克服困难。在陈老师对我不辞幸苦的指导下，我顺利完成了实验的总结和论文的撰写。正是有了导师的悉心帮助才能使本文得以顺利完成。

我要感谢我的父母，在我背后默默关怀与支持，始终做我最坚实的后盾，让我能够全心全意的完成学业。我要感谢我的同学们，在与你们相处的时间里，你们给予了我很多帮助，也教会了我很多为人处世的道理，他们的帮助成为了我人生道路上增加了宝贵的指引。感谢我的师兄朱庆鹏，在我刚进入实验室时对我耐心指导，帮助我分析解决实验中遇到的问题，让我的实验能够顺利开展。同时还要感谢我的师姐张莉莉和刘肇菲，在挫折时鼓励我，在开心时能和我一起分享。最后还要感谢我师妹汪新月、谢围围、师弟崇庆阳带给实验室的欢乐。这些点点滴滴构成了我的研究生生涯，正是因为有你们，生活才丰富多彩。

硕士学业的完成，又是一段新征程的开始，我将怀着感恩的心继续前行，也衷心希望所有给予我关心和帮助的人们一生平安、快乐幸福！

作者：卫雨航

2024 年 3 月 20 日