

分类号：061
密级：公开

单位代码：10363
学 号：2220620111

题目

磁性金属有机框架材料固定化漆酶的制备及
其催化活性研究

Title

PREPARATION AND CATALYTIC ACTIVITY OF
LACCASE IMMOBILIZED ON MAGNETIC
METAL-ORGANIC FRAMEWORK MATERIALS

学生姓名： 谢围围

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：2025 年 5 月 10 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：谢圆圆

日期：2025年5月10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或部分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 ____ 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：谢圆圆

日期：2025 年 5 月 10 日

指导教师签名：陈志明

日期：2025 年 5 月 10 日

磁性金属有机框架材料固定化漆酶的制备及其催化活性研究

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，本文以磁性金属有机框架作为载体，利用酰胺反应和铜离子螯合法制备固定化漆酶。研究了固定化漆酶的催化性质(如最适温度、最适 pH、热稳定性、金属离子耐受性、重复性等)，考察了固定化漆酶光热降解染料废水、双酚 A、邻氯苯酚的性能。具体如下：

(1) 制备出巯基丙酸修饰的 Fe_3O_4 纳米粒子，再在其表面包裹 $\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ ，再经高温炭化处理，制备出 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 八面体。用 EDC/NHS 活化 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 八面体表面的羧基，再利用酰胺化反应，将漆酶固定在 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 八面体表面，制备出固定化漆酶($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$)。用 SEM、XRD、FT-IR、BET、M-H 测试手段表征分析了 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 八面体。研究了游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 的最适 pH、最适温度、金属离子耐受性等催化性能。考察了 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 光热降解染料废水，发现 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 对高浓度染料废水具有快速、可持续的光热降解能力。

(2) 制备出柠檬酸修饰的 Fe_3O_4 纳米粒子，再在其表面包裹 ZIF-8，制备出 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 十二面体。修饰聚丙烯酰胺(PAM)后，再用铜离子螯合法固定漆酶，制备固定化漆酶($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$)。用 SEM、TEM、EDS-Mapping、XRD、FT-IR、TGA、M-H 测试手段对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 十二面体进行了表征分析。研究了游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 的催化性质(如最适温度、最适 pH、热稳定性、耐酸性等)。发现 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 具有高的催化活性，且 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 的热稳定性、耐酸性和可重复使用性均得到了显著提高。研究了 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 光热降解双酚 A 性能，重点探讨了双酚 A 的浓度、固定化漆酶的量、ABTS 浓度对双酚 A 降解效率的影响。

(3) 制备出柠檬酸修饰的 Fe_3O_4 纳米粒子，再在其表面包裹 Cu-ZIF-8，制备

出 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 纳米花。修饰聚丙烯酰胺(PAM)后,再用铜离子螯合法固定漆酶,制备固定化漆酶($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$)。用 SEM、EDS-Mapping、XRD、FT-IR、TGA、TEM、M-H 测试手段对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 纳米花进行了表征分析。研究了游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 的催化性质(如最适温度、最适 pH、有机物耐受性、重复性等)。发现 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 的有机物、金属离子耐受性均得到了显著提高。研究了 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 光热降解氯苯酚性能,重点探讨了氯苯酚的浓度、固定化漆酶的量、ABTS 浓度对氯苯酚降解效率的影响。

关键词: $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$, 固定化漆酶, 催化活性, 染料废水, 双酚 A, 邻氯苯酚

PREPARATION AND CATALYTIC ACTIVITY OF LACCASE IMMOBILIZED ON MAGNETIC METAL-ORGANIC FRAMEWORK MATERIALS

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, this study employs magnetic metal-organic frameworks as carriers for the preparation of immobilized laccase through amide reactions and copper ion chelation methods. The catalytic properties of the immobilized laccase were investigated, including optimal temperature, optimal pH, thermal stability, metal ion tolerance, and reusability. Furthermore, the performance of the immobilized laccase in photothermal degradation of dye wastewater, BPA, and 2-CP was examined. The details are as follows:

(1) The mercaptopropionic acid-modified Fe_3O_4 nanoparticles were prepared, followed by the encapsulation of $\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ on their surface. Subsequently, high-temperature carbonization treatment was conducted to synthesize $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ octahedrons. The carboxyl groups on the surface of the $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ octahedrons were activated using EDC/NHS, and then laccase was immobilized onto the surface through an amidation reaction, resulting in the formation of immobilized laccase ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$). The characterization and analysis of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ octahedrons were performed using SEM, XRD, FT-IR,

BET, and M-H testing methods. The catalytic performance regarding optimal pH, optimal temperature, and metal ion tolerance for both free laccase and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ was investigated. Furthermore, the photothermal degradation of dye wastewater using $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ was examined. It was found that $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ exhibited rapid and sustainable photothermal degradation ability towards high-concentration dye wastewater.

(2) The citrate-modified Fe_3O_4 nanoparticles were prepared, followed by the encapsulation of ZIF-8 on their surface to obtain $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ dodecahedra. After modification with polyacrylamide (PAM), laccase was immobilized using a copper ion chelation method, resulting in the formation of immobilized laccase ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$). The characterization and analysis of the $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ dodecahedra were conducted using various techniques including SEM, TEM, EDS mapping, XRD, FT-IR, TGA, and M-H testing. The catalytic properties of free laccase and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ were investigated with respect to optimal temperature, optimal pH, thermal stability, acid resistance, and other factors. It was found that $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ exhibited high catalytic activity while demonstrating significant improvements in thermal stability, acid resistance, and reusability. Furthermore, the photothermal degradation performance of BPA using $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ was studied. The effects of BPA concentration, immobilized laccase, and ABTS concentration on the degradation efficiency of BPA were specifically examined.

(3) The citrate-modified Fe_3O_4 nanoparticles were prepared, followed by the encapsulation of Cu-ZIF-8 on their surface to obtain $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ nanoflowers. After modification with PAM, laccase was immobilized using a copper ion chelation method, resulting in the formation of immobilized laccase ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$). The

characterization and analysis of the $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ nanoflowers were conducted using various techniques including SEM, EDS-Mapping, XRD, FT-IR, TGA, TEM, and M-H testing. The catalytic properties of free laccase and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ were investigated in terms of optimal temperature, optimal pH, organic compound tolerance, and reusability. It was found that both organic compound and metal ion tolerances for $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ were significantly enhanced. Furthermore, the photothermal degradation performance of 2-CP by $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ was studied with a focus on how factors such as 2-CP concentration, immobilized laccase, and ABTS concentration influenced the degradation efficiency of 2-CP.

Xie Weiwei (Chemistry)

Supervised by Chen Zhiming

KEY WORDS: $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$,
Immobilized laccase, Catalytic activity, Dye wastewater, BPA, 2-CP

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	III
第 1 章 绪 论	3
1.1 漆酶及其固定化载体	3
1.1.1 漆酶概述	3
1.1.2 漆酶的固定化载体	5
1.2 金属有机框架的概述	7
1.3 漆酶固定化方法	8
1.4 固定化漆酶的应用	10
1.5 选题指导思想与研究意义	13
第 2 章 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 的制备及其催化活性研究	15
2.1 实验试剂及仪器	16
2.2 实验方案	16
2.2.1 磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 的制备	16
2.2.2 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 性能研究	17
2.3 结果与讨论	23
2.3.1 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 催化性能研究	27
2.3.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 处理染料废水的效果研究	31
2.3.4 不同材料降解染料的效果对比	33
2.4 小结	34
第 3 章 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 的制备及其催化活性研究	35
3.1 实验试剂及仪器	36
3.1.1 主要实验试剂	36
3.1.2 主要实验仪器	36
3.2 实验方案	36
3.2.1 磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 的制备	36
3.2.2 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 固定化漆酶性能研究	37

3.2.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 处理双酚 A 的效果研究	42
3.3 结果与讨论	44
3.3.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 的表征与分析	44
3.3.2 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 催化性能研究	48
3.3.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 处理双酚 A 的效果研究	54
3.3.4 不同材料降解双酚 A 的效果对比	56
3.4 小结	58
第 4 章 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 的制备及其催化活性研究	59
4.1 实验试剂及仪器	60
4.1.1 主要实验试剂	60
4.1.2 主要实验仪器	60
4.2 实验方案	60
4.2.1 磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 的制备	60
4.2.2 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 固定化漆酶性能研究	61
4.2.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 处理邻氯苯酚的效果研究	65
4.3 结果与讨论	67
4.3.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 的表征与分析	67
4.3.2 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 固定化漆酶催化性能研究	71
4.3.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 处理邻氯苯酚的效果研究	76
4.3.4 不同材料降解邻氯苯酚的效果对比	79
总结与展望	81
参考文献	83
攻读学位期间发表的学术论文目录	98
致谢	99

第 1 章 绪 论

1.1 漆酶及其固定化载体

1.1.1 漆酶概述

漆酶(EC 1.10.3.2)是一种多铜蛋白,也被称为蓝色多铜氧化酶^[1]。在 1883 年,日本科学家 Yoshida 从漆树中发现了这种酶,这也是漆酶研究的起点^[2]。随后于 1896 年, Bertrand 首次分离出一种生物活性物质,它能促进油漆原料固化成薄膜,并将其命名为漆酶(laccase)^[3]。漆酶在自然界分布比较广泛,主要存在于植物^[4]、真菌^[5]、细菌和昆虫中,其不同的生物体功能可能与生物体的起源、生理和病理条件有关^[6]。迄今为止,大多数已定性的漆酶都是从真菌中分离出来的,尤其是在木质素降解中发挥作用的白腐真菌^[7]。然而,真菌漆酶的商业应用面临着发酵时间长、生长速度慢和对有机溶剂的耐受性低要求等挑战^[8]。相比较之下,细菌漆酶因其在高温及高 pH 等条件下稳定存在,而在工业领域广受欢迎^[9]。

漆酶的催化活性中心是由四个铜原子构成,根据其周围环境的特征、对溶剂的可及性和电子顺磁共振(EPR)信号可分为 I 型(蓝色位点)、II 型(正常位点)和 III 型(偶联双核位点)Cu-Cu 对^[10, 11],如图 1-1 所示。漆酶的催化机制与铜离子有密切的关系。研究表明, I 型铜位点是大多数漆酶从还原性底物接收电子的中心^[12],且 I 型铜的氧化还原电位决定了底物分子的催化效率^[13],底物通过疏水作用附着在漆酶的结合位点上,且所有铜离子都参与了催化作用^[14]。漆酶从底物中提取电子并将其转化为可以聚合的自由基。在接收到四个电子后,漆酶将双氧分子还原为水分子^[15]。总而言之,漆酶催化过程一般包括 4 部分:酶分子对底物的作用、酶分子中电子的转移、氧分子对酶分子的还原及产物的反应^[16]。漆酶催化机理如图 1-2 所示。因此,漆酶被称为绿色生物催化剂。

在漆酶氧化底物的过程中,有些介质也发挥了重要的作用。起初,人们认为漆酶只能氧化部分酚醛木质素,然而其中大多数木质素是具有更高的氧化还原电位的非酚醛,又因为漆酶本身的氧化还原电位不足以破坏碳氢脂肪键,使其很难被氧化^[17]。因此,用低分子量的氧化还原介质来扩大漆酶底物范围或提

高反应速率，尤其是对于具有较高氧化还原电位或分子太大而无法容纳酶活性位点的底物^[18]。低分子量的氧化还原介质中通常含有一些特定官能团(NO、NOH、HRNOH)，通过介导电子从底物转移到漆酶活性中心。最常用的介质有羟基苯并三唑(HBT)^[19]、2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧基(TEMPO)、羟基乙酰苯胺(NHA)、2,2-联氨双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)^[20]及丁香醛等^[21]。在漆酶的氧化过程中，介质会受到漆酶的类型和基材、形成的自由基以及介质的可回收性等因素的影响^[22]。不论漆酶与介质的反应机制如何，使用介质都会增加额外的成本，也可能导致漆酶失活等^[23]情况，因此，我们需要通过认真地选择合适的底物和介质来发挥漆酶的潜力，从而有效地进行催化氧化反应。

尽管在工业环境中使用漆酶具有许多优点，但在不同环境条件下(如 pH、离子强度和温度、蛋白水解、抑制剂溶液)可能会造成漆酶失活^[24]。因游离漆酶具有操作稳定性低、价格高、漆酶循环利用和难以回收等缺点，所以限制了漆酶产品的商业化应用及降低了工业应用经济效益^[25]。固定化是改善漆酶性能和循环利用性的理想技术，因为它们可以提高操作稳定性、可循环利用性以及极端环境条件下的耐受性^[26]。因此，进行固定化是非常有必要的。将漆酶附着在不溶性载体上，材料固定化就可以很容易地回收漆酶，从而快速地测定的活性，并且在催化循环过程中具有高效的利用性^[27]，这将降低测定成本。

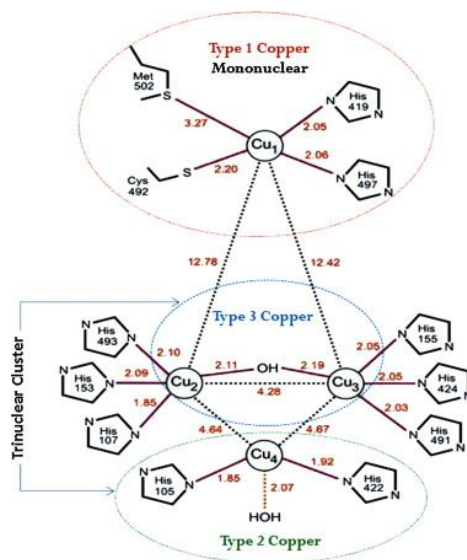
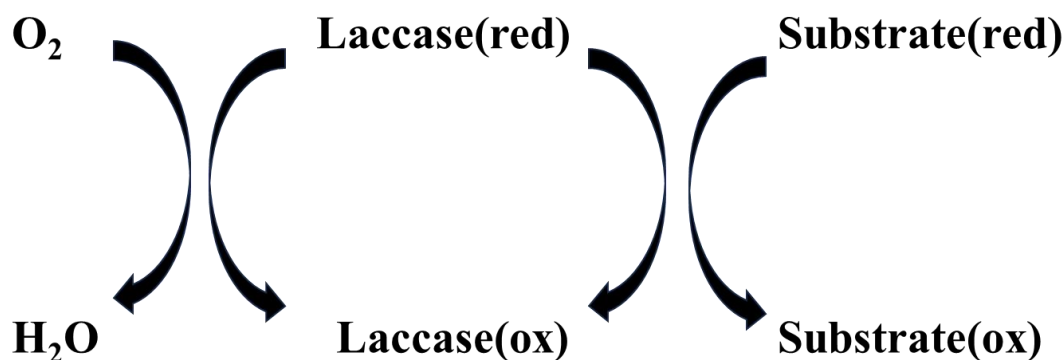


图 1-1 铜配位中心的示意图，包括所有相关配体之间的原子间距离^[6]

Figure 1-1 Schematic diagram of copper coordination centers, including the interatomic distances between all relevant ligands ^[6]

图 1-2 漆酶催化机理示意图^[28]Figure 1-2 Schematic diagram of laccase catalysis mechanism^[28]

1.1.2 漆酶的固定化载体

漆酶的固定是将漆酶限制在不同底物和产物的相(基质/支持物)中。大量科研人员已经研究了不同类型的基材,比如天然聚合物^[29]、无机^[30]、电极^[31]、复合材料^[32]。在选择这些载体时,需要考虑漆酶催化位点可能会与载体基团形成螯合物,并可能破坏固定化酶的催化活性及稳定性。合适的载体材料有利于提高漆酶催化能力和稳定性。接下来,总结一些常用的载体。

1.1.2.1 天然聚合物

常用的天然聚合物有海藻酸盐、壳聚糖、胶原蛋白、卡拉胶、明胶、纤维素、淀粉、果胶等。海藻酸盐是另一种天然线性聚合物,具有无毒、生物相容性和生物降解性等突出特性,它被广泛应用于化妆品、药物递送、组织工程等领域。海藻酸钡固定化漆酶体系显著提升了酶的催化性能,具体表现为:催化活性增强、底物亲和力提高以及抗环境干扰能力改善^[33]。壳聚糖是一种生物相容性良好的天然高分子材料,其制备主要通过甲壳素的脱乙酰化反应实现。壳聚糖表面主要包括-OH 和-NH₂ 官能团,可通过直接与漆酶结合,经过化学修饰作用使漆酶不易脱落^[34]。明胶是一种成本低且容易获得的蛋白质,其生物学特性与胶原蛋白大致相同,这使得明胶广泛用于药物输送和组织工程应用^[35]。纤维素具有种类丰富、结构刚度强、质量较低及可再生性,在固定漆酶领域受到很多人的青睐^[36]。淀粉具有稳定性好、生物相容性等特点,被认为是合适的载体^[37]。

1.1.2.2 合成聚合物

除了许多天然聚合物材料外，不同尺寸和形状的合成聚合物也用于固定漆酶，比如离子交换树脂、聚苯乙烯、聚酰胺、聚丙烯腈^[38]。天然聚合物具有比面积大、高负载、支持结合、官能团丰富等优点，但是也具有复杂的合成过程、成本高等缺点^[39]。特别的是，这种材料不具有亲水性，有助于生物催化剂在反应时轻松分离^[40]。

1.1.2.3 无机材料

无机材料因具有种类丰富、刚性和孔隙率高等优点而被广泛应用漆酶固定化，且无机载体的刚度可维持孔径/孔体积的不变性，保证了载体本身的体积和形状恒定^[41]。较为典型的无机材料有 SiO_2 、沸石、金属氧化物、陶瓷、活性炭等。其中二氧化硅因其比表面积大、机械稳定性、水不溶性、生物相容性、可调节的孔径、高度有序的结构以及无毒而作为催化剂载体而受到关注^[42]。另外沸石具有热稳定性强、孔隙结构多样、成本较低等特点，已成为酶固定化的理想载体材料^[43]。总的来说，无机载体具有高 pH 和热稳定性高、低成本、高机械强度及对环境影响较小等优点，被广泛应用于漆酶固定化。

1.1.2.4 电极

漆酶被固定在电极上，用于生物传感器。尤为重要是生物传感器的应用，因为它有可能与复杂的基质相互作用，减少了样品制备的时间，降低了分析物需求，增强响应时间，同时具有更好的实时监测和便携性，特别是对于药物监测^[44]和环境污染物的检测^[45]。漆酶具有出色的选择性和催化活性，大多数基于酶的电化学生物传感器之所以价格比较实惠，是因为它们不需要很多设备。酶电极常被用于许多临床和即时护理领域，用于分析各种分析物^[46]。

1.1.2.5 金属有机框架

MOF 是一种多孔骨架材料，其化学结构通常由有机连接体的几何形状和连通性决定。与大多数传统基质材料相比，MOF 具有数千种不同的结构，可以通过改变大量可定制的有机配体和金属节点来制备。同时也具有较大的比表面积和孔体积，有利于分子的吸附和扩散。其中孔径大小可根据不同尺寸的漆酶进行调整^[47]。此外，MOF 骨架具有高度可调的孔隙和晶体结构，这有利于减少漆酶的不良浸出或变性的官能团，可以积极促进催化过程；MOF 骨架表面的金属节点和连接体，为漆酶与载体的结合提供了丰富的位点；MOF 骨架的表面积大，

有利于固定化酶接近目标底物；MOF 骨架化学/热/机械稳定性，使固定化酶在恶劣条件下具有很高的稳定性^[48]。

1.2 金属有机框架的概述

根据结构的不同，MOF 又分为多孔金属有机框架(PCN)^[49]、类沸石金属有机框架(ZMOF)^[50]、沸石咪唑酸盐框架(ZIF)^[51]。根据 MOF 的功能，可分为同构网络金属有机框架(IRMOF)^[52]和多功能金属有机框架(MTV-MOF)^[53]。然而，在大多数情况下，MOF 是按首次合成的实验室或大学分类的，如奥斯陆大学(UiO)^[54]、拉瓦锡研究所的 MIL 材料(MIL)^[55]等。

1.2.1 铁基 MOF

铁基 MOF 主要以 Fe 为金属离子，其中主要代表是拉瓦锡研究所(MIL)系列和多孔配位网络(PCN)系列的材料。Fe-MOF 本身可以作为药物递送载体^[56]、抗肿瘤^[57]和抗菌^[58]特性而被广泛使用，尤其是 MIL 系列 Fe-MOFs，由于其品种多、结构优良、载药量高、安全性好，经常用于抗肿瘤药物的研究。Fe₃O₄ 可用作磁性纳米粒子，常与其他 MOF 结合制备磁性纳米粒子通过施加外部磁场实现灵活运作。Fe₃O₄@MOF 结合孔隙率和磁性的优点制备具有高比表面积和磁分离性的新材料，对于扩大 MOF 材料的应用具有重要意义。

1.2.2 锆基 MOF

与许多由各种金属离子簇构建的其他类型的 MOF 相比，Zr-MOF 表现出显著的稳定性。它们的稳定性在多个方面表现得都很明显：它们可以承受高达 450°C 的高温而不会发生显著降解；它们可以浸入各种有机溶剂和酸性水溶液中而不会受到明显损坏，即使在高压条件下它们也能保持其晶体结构^[59-61]。Zr-MOF 的出色稳定性可归因于 Zr-羧酸盐键的稳定性和金属团簇之间的高度连接^[59]。Zr-MOFs 因其卓越的稳定性展现出多领域的应用潜力。其中，气体分离领域表现尤为突出，其多孔特性与结构刚性赋予材料优异的气体吸附与筛分性能。

1.2.3 镍基 MOF

镍(II)离子是一种应用广泛的过渡金属离子，因为它们成本低、丰度好、催化活性和电化学性质好^[62]。通过控制 Ni-MOF 的尺寸，能够改变其比表面积并降低电荷转移电阻，从而提升 Ni-MOF 的导电性。同时 Ni-MOF 的形貌控制

可以暴露更多的 Ni 离子活性位点, 提高 Ni-MOF 的电导率和稳定性。由于 Ni-MOF 多方面优势, 在电化学传感、电能存储和电催化领域显示出良好的潜力, 并受到越来越多的关注。

1.2.4 MOF 复合材料

MOF 具有高表面积、可调孔隙率以及金属和官能团的多样性, 然而, 单一 MOF 的活性和底物特异性仍然需要提高。单一 MOF 的这些局限性可以通过将 MOF 材料与其他功能材料整合来克服^[63]。比如二氧化硅、磁性颗粒、贵金属颗粒等功能材料, 与单一 MOF 相比, 含功能材料的 MOF 实现了单一 MOF 无法直接实现的新功能^[64]。

MOF-on-MOF 的不同合成策略极大地丰富了 MOF-on-MOF 的结构多样性。目前有六种结构形态, 包括: 核壳形态、核-卫星形态、蛋黄壳形态、空心多壳形态、不对称形态、MOF-on-MOF 薄膜形态^[65]。整合 MOF 和其他类型的 MOF 是实现单个 MOF 功能化的一种很有前途的途径。通过将一种 MOF 封装在另一种 MOF 中制备的核壳 MOF@MOF 复合材料可以保留两种 MOF 的化学、物理和结构优势^[66]。Cao 等^[67]提出了一种构建定义明确且分层的蛋黄/壳 PCN-222@ZIF-8 杂化催化剂的策略, 从而提高了 MOF 作为传感器平台的催化活性和选择性。

1.3 漆酶固定化方法

固定化通常是采用物理或化学方法将游离酶连接或包裹到特定的载体上, 以改善其实用特性。更具体地说, 固定化工艺可以大大提高漆酶的热稳定性、pH 稳定性、储存稳定性和重复使用性等。漆酶活性持续的先决条件是选择合适的固定方法^[68]。固定化方法通常包括吸附、包埋、共价结合和共沉淀, 如图 1-3 所示。

1.3.1 物理吸附

吸附是将漆酶固定在载体表面或孔内的最简单方法, 主要借助微弱的相互作用力来实现, 例如疏水相互作用、氢键、范德华相互作用和离子吸附。该方法具有显著优势, 无需添加额外试剂, 且反应条件温和, 漆酶能够轻易地附着在金属有机骨架(MOF)的表面或者孔道之中^[69]。尤为关键的是, 温和的吸附条

件以及相对较弱的结合力，不会致使漆酶的天然结构发生改变，进而有效避免了漆酶活性的大幅损失。原则上，任何 MOF 均可用于漆酶的吸附，但并非每一种漆酶都能够固定在所有的 MOF 上。这是由于漆酶的有效吸附必须满足特定条件，其中漆酶与 MOF 之间的亲和力起着至关重要的作用^[70]。Jia 等人^[71]成功合成了介孔与微孔兼具的 Meso-MIL-53(Al)，并将其作为固定化漆酶的载体。研究发现，Lac-MIL-53(Al)不仅维持了 MOF 的框架结构，而且其活性与游离漆酶近乎一致。

1.3.2 共价结合

共价固定可以通过漆酶和载体的官能团相互作用形成的共价键将漆酶锚定在载体表面上。强化学键能够阻止漆酶的浸出，不同的载体可以通过官能团激活或修饰(如氨基功能化)与漆酶形成共价键^[72]。MOF 表面呈现出多种多功能基团(例如游离酰胺基、羧基、羟基、环氧基和乙醛基等)，它们能够与漆酶分子表面的相应活性基团结合^[73]。固定化过程中功能性添加剂主要有 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺磺酸钠盐(Sulfo-NHS)、N,N'-二环己基碳酰亚胺(DCC)等，通常被诱导到固定系统中，以促进氨基或羧基的活化^[74]。Li 等人^[75]采用 ABTS 和漆酶共价固定到 ZIF-8 中，形成了 Lac@ZIF-8-Fe 材料，Lac@ZIF-8-Fe 表现出优异的热稳定性、耐酸性和可重复使用性。

1.3.3 孔封装

漆酶在 MOF 腔内的原位包封已成为一种有效的酶固定化方法。在这种策略中，随着 MOF 的生长过程漆酶被封装，因此需要合适的生物相容合成条件，避免了在原位封装过程中酶的失活。该策略的优点是：1)可以保持酶的构象，从而保持甚至增强生物催化活性；2)负载效率高；3)不考虑 MOF 的互补孔径，简化了固定过程^[76]。Yang 等^[77]采用封装法将漆酶和 ABTS 固定在双金属 Cu/ZIF 载体上，然后锚定到 PVA 水凝胶中，成功制备具有高催化活性和稳定性的生物催化剂 PVA/ABTS-Lac@Cu/ZIFs。封装法在一定程度上避免了恶劣条件下漆酶失活，但是酶负载速率与 MOF 的孔径和尺寸密切相关。此外，在封装过程中，酶分子被封装在多孔材料的孔隙中，这可以通过物理或化学手段实现，其中包括形成化学键以增强封装的稳定性^[78]。

1.3.4 共沉淀

共沉淀法涉及将漆酶和共沉淀剂添加到含无机金属离子和有机配体的溶液中，从而在合成过程中将酶分子封装在高度有序的 MOF 晶体中^[79]。共沉淀法因其过程快速、简单而受到关注。在温和的水基条件下，Yang 等人^[80]通过共沉淀法将漆酶固定在双金属中心的 Cu/Zn-ZIF 中。通过 Cu/Zn-ZIF 充当保护载体，保护漆酶免受各种恶劣条件的影响，并实现高效的生物催化活性。然而，共沉淀法也存在一些弊端，如固定过程中漆酶存在灭活的可能性、对载体表面漆酶的控制有限、恶劣条件下的低稳定性等^[81]。有趣的是，四配位金属(如 Zn、Co 和 Ni)与咪唑配体在室温下自组装形成 ZIFs，这在漆酶固定方面具有很大的潜力^[82]。

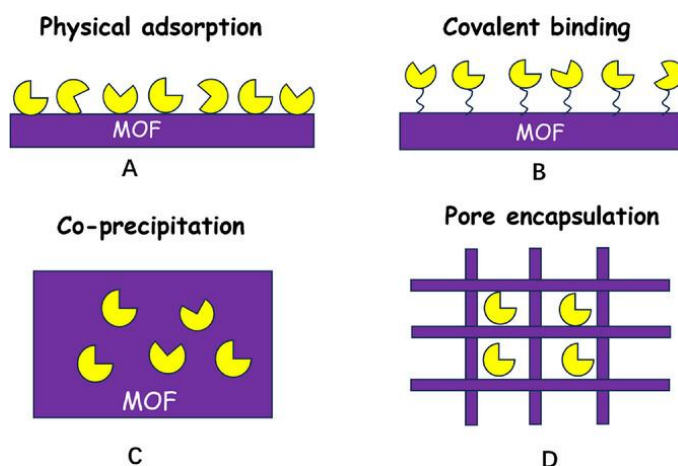
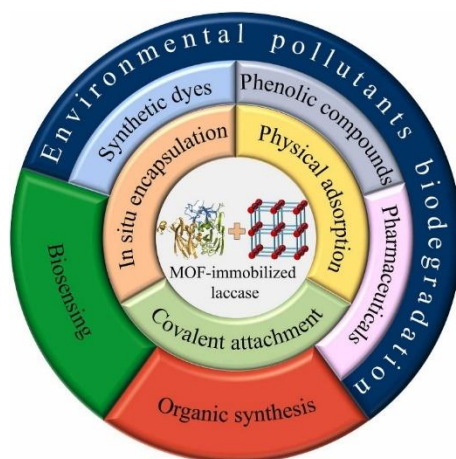


图 1-3 固定方法^[81]

Figure 1-3 Immobilization methods^[81]

1.4 固定化漆酶的应用

漆酶是可以氧化有机化合物的多功能酶。基于 MOF 载体对漆酶的性能改进使其成为生物降解、生物传感和有机合成应用的理想选择，如图 1-4 所示。此外，一些 MOF 本身可以用作纳米酶，MOF 在生物催化领域具有广泛的应用^[83]。金属有机框架材料(MOFs)作为酶固定化载体展现出显著优势，相较于传统支撑材料，其独特的结构特性即使在苛刻条件下仍能维持优异的酶稳定性和可重复利用性。基于这些优势，MOF-漆酶复合体系的应用领域正快速拓展，尤其在生物传感与生物催化领域表现出重要应用价值。

图 1-4 漆酶-MOFs 的应用^[84]Figure 1-4 Applications of laccase-MOFs ^[84]

1.4.1 染料脱色

由于染料在造纸和纸浆、食品、石化和纺织工业等多个工业领域中得到广泛应用，因此净化污水是一个重要问题。根据调查显示，纺织工业是染料污水的最大来源，在纺织品的加工过程中会使用大量的水和化学品，并释放出难以脱色的染料污水^[85]。大多数染料是水溶性的，其结构复杂且稳定，所以处理染料污水成为难题。其中由于染料污水水质复杂，应根据水的特点和排放要求选择合适的处理方法。开发基于漆酶的处理方法将是一种有吸引力的策略，因为它具有各种化学染料(包括合成染料)的降解能力。Jiang 等人^[86]采用共沉淀法制备了 Lac@Cu(PABA)复合材料,并利用其进行染料脱色。其中 Lac@Cu(PABA)良好的可回收性提高了酶促反应的效率，同时也降低了生产成本。更重要的是，固定化漆酶在连续 10 次重复使用后仍保持 70%的 DR31 去除率。

1.4.2 去除酚类化合物

酚类化合物(PC)在自然界中含量丰富，自然界中存在的大部分酚类化合物起源于植物代谢过程^[87]。酚类化合物在环境中长期的积累会对人类和动物产生毒性作用。酚类化合物被广泛用于石化、制药、食品加工、农药生产、染色和冶金等领域。由于化学污染物的广泛使用，它们经常与排放的废水一起流入水源。酚类废水的主要特点是高生成、污染物复杂、生物毒性高^[88]。因此，去除酚类化合物已成为社会和政府机构的主要关注点。酚类化合物是漆酶的传统底物，许多研究人员已经利用漆酶去除酚类化合物。以戊二醛为交联剂，Wang 等人^[89]将漆酶(Gllacc- II)共价固定在静电纺丝构建的磁性聚合物复合纳米纤维

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PANI-Chit}$ 上。 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PANI-Chit-Gllacc-II}$ 对苯酚、4-CP、2,4-DCP 和 2,4,6-TCP 均表现出优异的去效率。即使在 30 天的储存和 14 个连续重复使用周期后, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PANI-Chit-Gllacc-II}$ 分别保持了 66.59%和 60.01%的初始活性。

1.4.3 生物传感器

生物传感器是一种将生物反应转换为电信号的分析设备。在没有额外辅助因子的情况下漆酶能够完成催化电子转移反应。这种独特的氧化还原特性使它们能够作为有用的生物受体, 可用于食品、农药、环境和医疗领域的生物传感应用^[90]。然而, 由于漆酶相关稳定性面临挑战, 基于漆酶的生物传感器的利用通常受到限制。考虑到这一点, 需要迫切提出有前途的解决方案^[91]。作为固定化支持, MOF 的与众不同之处在于其本身固有的适应性, 它们可以在分子水平上进行工程改造, 以选择性地与特定分析物相互作用^[92]。MOF-laccase 复合材料卓越的特性使其成为生物传感应用的理想选择。Szymon 等^[93]通过 SPP 方法构建的基于漆酶的生物传感器夹层中沉积的 MWCNT 数量的增加导致其灵敏度增加和检测限降低。研究表明, 碳纳米管的形态和数量显著影响同时测定 CT 和 HQ 的可能性。最重要的是, 适当选择 MWCNT 的结构并优化其数量可以获得用于定量测定环境样品中二羟基苯异构体的生物传感器。

1.4.4 药物降解

药物包括人类或动物使用的任何药物, 其广泛使用被证明有助于延长寿命和提高生活质量。然而, 新型药物不断进入市场, 用于治疗炎症、发烧、细菌感染、心血管、癌症和各类传染病等人类疾病。药物的过量生产和使用, 以及其未经处理或未完全代谢的排放, 会污染水生态系统, 危害环境可持续性和人类健康^[94]。漆酶是用于去除药物化合物的最常用酶之一。漆酶的酶促反应有效地将这些污染物转化为危害较小或无生物活性物质的化学物质。尽管漆酶具有降解污染物的潜力, 但由于其难以从反应介质中回收并重复利用, 且对温度和 pH 敏感, 其在工业中的应用仍面临挑战。为克服这些限制, 研究人员采用固定化技术将漆酶固定在稳定载体上, 以提高其可回收性和操作稳定性^[95]。来自真菌 *Trametes versicolor* 和 *Pycnoporus cinbarinus* 的漆酶基因在酵母 *A. adeninivorans* 中表达, Katarzyna 等人^[96]成功制备了一种全细胞生物催化剂, 其中包含附着在细胞表面的漆酶和 CYP450 的活性, 这对于通过氧化聚合灭活废

水中的药物活性化合物至关重要。

1.4.5 有机合成

在有机合成中的应用中，漆酶由于其广泛的底物范围，能够将底物转化为不稳定的游离(阳离子)自由基，这些自由基可能会发生进一步的非酶促反应，例如聚合或水合。具体来说，漆酶可以进行转变，从官能团的氧化到生产新抗生素衍生物的杂分子自由基偶联^[97]。由 *T. versicolor* 的漆酶催化，Fabrizia 等人^[98]已经证明磺化聚苯胺聚合物 SPANI 可以通过 3-ABSa 的氧化获得。但是，SPANI 不是作为唯一产品获得的，伴随着副产物的产生。

1.5 选题指导思想与研究意义

漆酶作为一种多功能氧化还原酶，具有广谱底物特异性、无需辅因子参与以及仅以水为副产物的显著特征，这些特性使其成为环境污染降解领域极具应用前景的生物催化剂。值得注意的是，受污染水体中复杂成分(如高盐浓度或碱性 pH 条件)的影响，污染物的有效降解往往面临显著障碍。然而，以漆酶工程为代表的现代生物技术为解决这一问题提供了可行方案。其中，漆酶固定化技术因其能显著提高酶的稳定性、催化活性和可重复利用性，已成为最常用的改性方法之一。因此，漆酶也被固定在多种载体上，并已用于检测和降解多种污染物。

MOF 是一种多孔晶体材料，由有机配体和金属节点之间的周期性连接组成，形成 2D 或 3D 有序网络。MOF 具有理想的物理和化学性能，包括高表面积、开放金属位点、丰富的孔隙率、可设计的功能和相对较高的稳定性。值得注意的是，通过改变金属离子组分的类型和有机配体的性质，可以很容易地改变 MOF 的形态和结构。此外，MOF 为固定方法提供了机会，由于其简单和温和的固定程序而受到广泛关注。MOF 与漆酶的固定方式显示出潜在的优越催化活性和操作稳定性。

本论文制备了三种磁性金属有机框架材料，并通过共价结合法、铜离子螯合法合成磁性金属有机框架固定化漆酶。文中之所以使用了磁性材料作为载体，是因为与过滤或离心等传统操作相比，可以使用外部磁场从反应混合物中轻松分离。将磁性金属有机框架固定化漆酶分别用于染料、双酚 A 和邻氯苯酚的降

解，结果显示固定化漆酶在染料、双酚 A 和邻氯苯酚的降解方面均展现出良好的催化降解能力，为环境治理保护提供一种高效的生物催化降解方案。

第 2 章 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 的制备及其催化活性研究

随着各行业对合成染料需求的持续增长，染料生产规模不断扩大。这类染料通常具有复杂的芳香族结构，导致其难以被自然降解，进而对水体生态系统和人类健康构成严重威胁。目前，染料废水的处理技术主要包括吸附法、电化学氧化、臭氧氧化、膜分离和生物降解等。其中，生物降解技术因其环境友好性、高效性和可持续性优势，被认为是最具应用前景的解决方案之一。漆酶是一种多样化的酶生物催化剂，具有在生物技术应用方面的潜力，可以将有些环境污染物转化成无毒产物^[99]。然而，游离漆酶应用受到低稳定性、不可重复等限制，漆酶固定化可以解决这些问题。

金属有机骨架作为晶态多孔材料，与传统的多孔材料相比，具有高多孔性结构、组分空间分散均匀、孔径和拓扑结构可调、有机-无机混合性质和高稳定性等特性。其中， $\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 因其制备程序简单、产率高和优异的结构特性而成为潜在的吸附剂或催化剂的已知 MOF 之一^[100]。然而，由于开放金属位点或相对弱的金属-氧配位而容易受到水分子的攻击，导致 MOF 的结构分解。因此，需要增强 MOF 对水的结构稳定性^[101]。Sun 等人^[102]通过 GO 和 RGO 样品来改性 Cu-BTC，添加的 RGO 对 Cu-BTC 的热稳定性产生了积极影响：RGO 的存在将 Cu-BTC 的分解温度从 300°C 提高到 330°C，扩大了其应用范围。

本章首先采用共沉淀法制备出巯基丙酸修饰的 Fe_3O_4 纳米粒子，然后向其中加入硝酸铜和均苯三甲酸溶液，成功制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 材料。随后将其放入管式炉在氩气气氛中对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 进行热处理。以 2°C/min 的速度升温至 260°C，保持 6 h，得到热处理后的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 。然后使用 EDC/NHS 活化表面的羧基，加入漆酶后成功制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 。利用 SEM、XRD、FT-IR、BET、M-H 测试手段表征分析了热处理后的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 。然后，对游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 进行最适 pH、最适温度、有机溶剂和金属离子耐受性等测试。同时，将 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 用于降解染料废水。

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：六水合氯化铁(99%)、1,3,5-苯三甲酸(98%)、硝酸铜(99.9%)、氨水(AR)、 Na_2HPO_4 (AR)、氯化钙(AR)、酵母蛋白胨(用于微生物)。

国药集团化学试剂有限公司：氯化亚铁(AR)、无水乙醇(AR)、 Na_2HPO_4 (AR)、氯化钠(AR)、硫酸镁(AR)、葡萄糖(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%)。

麦克林有限公司：3-巯基丙酸(99%)。

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)、傅里叶红外光谱(FT-IR、天津港东 FT-IR-850)、X 射线粉末衍射仪(XRD、Rigaku Smartlab 9KW)、热重分析仪(岛津 DSC-60A)、超导量子干涉磁测量系统(MPMS3)、X 射线光电子能谱仪(赛默飞 Nexsa G2)。

2.2 实验方案

2.2.1 磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 的制备

2.2.1.1 巯基丙酸修饰的 Fe_3O_4 纳米粒子的制备

称取 0.09 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 和 0.22 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶于 25 mL 水中，氩气下搅拌加热至 65°C 。之后，加入 1.5 mL 的 28% 氨水，分成 3 份，每份 0.5 mL，每次间隔 20 分钟。通保护气的条件下加热至 65°C 搅拌 1.5 h，再升温至 93°C ，继续反应 1 h。所得的 Fe_3O_4 纳米颗粒聚集，用水洗涤 2 次。随后，将 Fe_3O_4 纳米粒子和 30 μL 巯基丙酸分散于 20 mL 乙醇中，在 25°C 氩气中搅拌 6 h。得到巯基丙酸修饰的 Fe_3O_4 纳米离子，乙醇洗涤两次。

2.2.1.2 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的制备

将 0.63 g $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 溶于 15 mL 水中，形成硝酸铜溶液。将 0.35 g 1,3,5-苯三甲酸溶于 15 mL 乙醇中，形成均苯三甲酸溶液。将硝酸铜溶液加入到均苯三甲酸溶液中，在 25°C 下搅拌 30 min，加入巯基丙酸修饰的 Fe_3O_4 纳米颗粒，超声

处理 15 min。将混合物转移到高压釜中，密封，在 120°C 下加热 12 h，然后自然冷却至室温。收集沉淀物($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$)，用乙醇洗涤两次，并在 80°C 下干燥。随后，在氩气气氛中对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 进行热处理。以 2°C/min 的速度升温至 260°C，保持 6 h。最后，使样品自然冷却至室温，得到加热的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 。

2.2.1.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ -Lac 的制备

将 10 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 加入 4 mL 0.5 mM MPA 中，25°C 孵育 6 h。收集所得 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 样品，用水洗涤一次，加入 20 mg EDC、30 mg NHS 和 40 mL 蒸馏水，在 30°C 下振荡 2 h，收集沉淀，用水洗涤一次。加入 0.1 mL 漆酶(稀释 10 倍)，在 32°C 下振荡 2 h，水洗一次。

2.2.2 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ -Lac 性能研究

2.2.2.1 牛血清蛋白(BSA)标准曲线测试

考马斯亮蓝溶液的配制步骤如下：精确称取 50 mg 考马斯亮蓝 G250，将其完全溶解于 25 mL 95%乙醇中，随后加入 50 mL 85%(W/V)磷酸，充分混合均匀后，用蒸馏水定容至 500 mL。牛血清蛋白(BSA)标准溶液的配制：通过用蒸馏水将牛血清蛋白逐步稀释，从而得到一系列不同浓度的标准蛋白质溶液。采用考马斯亮蓝法，对溶液中的 BSA 含量进行精确测定。

2.2.2.2 愈创木酚标准曲线

取 0.1 mL 游离漆酶，向其中加入 2.9 mL pH=5 的醋酸缓冲液，在 50°C 恒温混匀仪中充分混匀，并预热 5 min。同时将不同浓度(0.1-0.8 Mm)的愈创木酚预热 5 min。取 1 mL 50°C 预热后的愈创木酚，快速加入到已预热的混合体系中，迅速将样品转移至比色皿中，反应时间为 20 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

2.2.2.3 固载量测试

将 10 mg 热处理后 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 加入 4 mL 0.5 mM MPA 中，25°C 孵育 6 h。收集所得 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 样品，用水洗涤一次，加入 20 mg EDC、30 mg NHS 和 40 mL 蒸馏水，在 30°C 下振荡 2 h，收集沉淀，用水洗涤一次。加入 2 mL 漆酶(稀释 10 倍)，在 32°C 下振荡 2 h。取 1 mL 固定酶上清液加入 0.1 mL 蒸馏水混合，再加入 5 mL 考马斯亮蓝溶液混匀均匀，染色 5 min，在最大吸收波

长为 595 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

2.2.2.4 游离漆酶和固定漆酶的最适 pH 测试

准备不同 pH 值的醋酸缓冲溶液体系，pH 值分别为 3.6、4、4.4、4.8、5.2、5.6、6，每个体系的体积为 2.9 mL。取 0.1 mL 游离酶，加入上述不同 pH 值的缓冲溶液体系中，在 50℃恒温混匀仪中充分混匀，并预热 5 min。取 1 mL 的 1 mmol/L 愈创木酚溶液(50℃)，快速加入到已预热的混合体系中，迅速将样品转移至比色皿中，反应时间为 35 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

准备不同 pH 值的醋酸缓冲溶液体系，pH 值分别为 3.6、4、4.4、4.8、5.2、5.6、6，每个体系的体积为 3.0 mL。取 10 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ ，加入上述不同 pH 值的缓冲溶液体系中，在 50℃恒温混匀仪中充分混匀，并预热 5 min。取 1 mL 1 mmol/L 愈创木酚溶液(50℃)，快速加入到已预热的混合体系中，磁分离后迅速将样品转移至比色皿中，反应时间为 35 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

2.2.2.5 游离漆酶和固定漆酶的最适温度测试

准备 2.9 mL pH 值为 5.2 的醋酸缓冲溶液。取 0.1 mL 游离酶，加入到上述缓冲溶液中，充分混合均匀。将混合液分别置于温度为 30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃的恒温混匀仪中，并预热 5 min。向每个温度条件下的混合液中加入 1 mL 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50℃)，迅速将样品转移至比色皿，反应时间为 20 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

准备 3.0 mL pH 值为 5.2 的醋酸缓冲溶液。取 10 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ ，加入到上述缓冲溶液中，充分混合均匀。将混合液分别置于温度为 30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃的恒温混匀仪中，并预热 5 min。向每个温度条件下的混合液中加入 1 mL 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50℃)，磁分离后迅速将样品转移至比色皿，反应时间为 35 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

2.2.2.6 漆酶活性测试

取 0.1 mL 游离漆酶，加入至含有 2.9 mL pH 5.2 醋酸缓冲液的容器中，使

两者充分混合、分散均匀。随后，将所得混合溶液转移至 50℃恒温混匀仪中，并预热 5 min。向混合液中加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液，迅速转移至比色皿中，反应时间为 20 s。反应结束后，使用紫外分光光度计，在最大吸收波长 465 nm 处对样品进行吸光度测定。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

取 10 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ ，加入至含有 3.0 mL pH 5.2 醋酸缓冲液的容器中，使两者充分混合、分散均匀。随后，将所得混合溶液转移至 45℃恒温混匀仪中，并预热 5 min。向混合液中加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(45℃)，磁分离后迅速转移至比色皿中，反应时间为 35 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

2.2.2.7 游离漆酶和固定漆酶的有机物耐受性测试

取 0.1 mL 游离漆酶，分别转移至多个离心管中。向各离心管内依次加入体积为 0.2 mL、浓度为 10 mM 的不同有机溶剂，所选有机溶剂包括异丙醇、吡啶、二氯甲烷、1,4-二氧六环、乙二醇、一正丁胺。将添加完试剂的离心管放置于温度设定为 30℃的恒温混匀仪中，静置孵育 2 h。孵育结束后，向每个离心管内准确加入 2.7 mL pH 5.2 的醋酸缓冲溶液，放入温度为 50℃的恒温混匀仪中预热 5 min，预热完成后，迅速向各离心管内加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50℃)，迅速转移至比色皿中，反应时间为 20 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

取 10 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ ，分别转移至多个离心管中。向各离心管内依次加入 0.1 mL 蒸馏水和体积为 0.2 mL、浓度为 10 mM 的不同有机溶剂，所选有机溶剂包括异丙醇、吡啶、二氯甲烷、1,4-二氧六环、乙二醇、一正丁胺。将添加完试剂的离心管放置于温度设定为 30℃的恒温混匀仪中，静置孵育 2 h。孵育结束后，磁分离，向每个离心管内准确加入 3.0 mL pH 5.2 的醋酸缓冲溶液，放入温度为 50℃的恒温混匀仪中预热 5 min，预热完成后，迅速向各离心管内加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50℃)，磁分离后迅速转移至比色皿中，反应时间为 35 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

2.2.2.8 游离漆酶和固定漆酶的金属离子耐受性测试

取 0.1 mL 游离酶，分别转移至多个离心管中。向各离心管内依次加入体积为 0.2 mL、浓度为 10 mM 的不同金属离子溶液，所选金属离子溶液包括 Mn^{3+} 、 Li^+ 、 Ce^{4+} 、 Cr^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Ca^{2+} 溶液。将添加完试剂的离心管放置于温度为 30°C 的恒温混匀仪中，静置孵育 2 h。孵育结束后，向每个离心管内准确加入 2.7 mL pH 5.2 的醋酸缓冲溶液，放入温度为 50°C 的恒温混匀仪中预热 5 min，预热完成后，迅速向各离心管内加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50°C)，迅速转移至比色皿中，反应时间为 20 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

取 10 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ ，分别转移至多个离心管中。向各离心管内依次加入 0.1 mL 蒸馏水和体积为 0.2 mL、浓度为 10 mM 的不同金属离子溶液，所选金属离子溶液包括 Mn^{3+} 、 Li^+ 、 Ce^{4+} 、 Cr^{3+} 、 Ni^{2+} 、 Ca^{2+} 溶液。将添加完试剂的离心管放置于温度设定为 30°C 的恒温混匀仪中，静置孵育 2 h。孵育结束后，磁分离，向每个离心管内准确加入 3.0 mL pH 5.2 的醋酸缓冲溶液，放入温度为 50°C 的恒温混匀仪中预热 5 min，预热完成后，迅速向各离心管内加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50°C)，磁分离后迅速转移至比色皿中，反应时间为 35 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

2.2.2.9 游离漆酶和固定漆酶的耐酸性测试

取 0.1 mL 游离漆酶，加入到体积为 0.2 mL，pH 值分别为 3、3.5、4、4.5、5.0、5.5、6 的醋酸缓冲溶液体系中。将混合液置于 30°C 恒温混匀仪中，静置孵育 5 h。向上述处理后的混合液中加入 2.7 mL pH 5.2 的醋酸缓冲溶液，随后将溶液转移至 50°C 恒温混匀仪中，预热 5 min。预热结束后，快速向离心管内加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50°C)。反应时间为 20 s 后，迅速转移至比色皿。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

称取 10 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ ，将其置于不同的离心管中，分别加入 0.1 mL 蒸馏水。随后，pH 值分别为 3、3.5、4、4.5、5.0、5.5、6 的醋酸缓冲溶液体系中。将混合液置于 30°C 恒温混匀仪中，静置孵育 5 h。将离心管从恒温混匀仪中取出，采用磁分离技术去除上清液。随后，向离心管内加入 3.0 mL pH 5.2 的醋酸缓冲溶液，再次放入温度为 50°C 的恒温混匀仪中预热 5 min，预热结

束后，快速向离心管内加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50°C)。反应时间为 35 s 后，磁分离后迅速转移至比色皿。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

2.2.2.10 游离漆酶和固定漆酶的抑制剂耐受性测试

取 0.1 mL 游离酶，分别转移至多个离心管中。向各离心管内依次加入体积为 0.2 mL、浓度为 10 mM 的不同抑制剂，所选抑制剂包括十二烷基硫酸钠、过硫酸铵、乙二胺四乙酸、柠檬酸钠、硫脲、三乙胺溶液。将添加完试剂的离心管放置于温度为 30°C 的恒温混匀仪中，静置孵育 2 h。孵育结束后，向每个离心管内准确加入 2.7 mL pH 5.2 的醋酸缓冲溶液，放入温度为 50°C 的恒温混匀仪中预热 5 min，预热完成后，迅速向各离心管内加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50°C)，迅速转移至比色皿中，反应时间为 20 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

取 10 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ ，分别转移至多个离心管中。向各离心管内依次加入 0.1 mL 蒸馏水和体积为 0.2 mL、浓度为 10 mM 的不同抑制剂，所选抑制剂包括十二烷基硫酸钠、过硫酸铵、乙二胺四乙酸、柠檬酸钠、硫脲、三乙胺溶液。将添加完试剂的离心管放置于温度设定为 30°C 的恒温混匀仪中，静置孵育 2 h。孵育结束后，磁分离，向每个离心管内准确加入 3.0 mL pH 5.2 的醋酸缓冲溶液，放入温度为 50°C 的恒温混匀仪中预热 5 min，预热完成后，迅速向各离心管内加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50°C)，磁分离后迅速转移至比色皿中，反应时间为 35 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

2.2.2.11 米氏常数的测试

取 0.1 mL 游离漆酶，加入到 2.9 mL pH 值为 5.2 的醋酸缓冲溶液中，使两者充分混合。将混合液转移至 50°C 的恒温混匀仪中并预热 5 min。分别准备浓度为 6、5、4、3、2、1 mM 且温度为 50°C 的愈创木酚溶液各 1 mL。依次加入 1 mL 不同浓度的愈创木酚溶液，反应时间为 20 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

取 10 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ ，加入到 3.0 mL pH 值为 5.2 的醋酸缓冲溶液中，使两者充分混合。将混合液转移至 45°C 的恒温混匀仪中并预热 5 min。分

别准备浓度为 6、5、4、3、2、1 mM 且温度为 45°C 的愈创木酚溶液各 1 mL。依次加入 1 mL 不同浓度的愈创木酚溶液，反应时间为 35 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

2.2.2.12 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 降解染料废水

固定化漆酶动力学：取 20 mg 固定化漆酶，加入 2 mL 1mmol/L ABTS 溶液，加入 25 mL pH 5.2 500 mg/L 灿烂绿废水溶液，置于氙灯光源下光照，在不同时间间隔，磁分离，取 1 mL 反应后灿烂绿废水溶液，对上清液中灿烂绿浓度测试，采用紫外可见分光光度计测定，灿烂绿的最大吸附波长为 624 nm。

重复性：取 10 mg 固定化漆酶，加入 1 mL 1mmol/L ABTS 溶液，加入 12.5 mL pH 5.2 500 mg/L 灿烂绿废水溶液，置于氙灯光源下光照，反应 90 min 后磁分离，取 1 mL 反应后灿烂绿溶液，对上清液中灿烂绿浓度测试，采用紫外可见分光光度计测定，灿烂绿的最大吸附波长为 624 nm。相同实验步骤重复 10 次。

固定化漆酶动力学：取 20 mg 固定化漆酶，加入 2 mL 1mmol/L ABTS 溶液，加入 25 mL pH 5.2 500 mg/L 活性艳蓝废水溶液，置于氙灯光源下光照，在不同时间间隔，磁分离，取 1 mL 反应后活性艳蓝废水溶液，对上清液中灿烂绿浓度测试，采用紫外可见分光光度计测定，活性艳蓝的最大吸附波长为 595 nm。

重复性：取 10 mg 固定化漆酶，加入 1 mL 1mmol/L ABTS 溶液，加入 12.5 mL pH 5.2 500 mg/L 活性艳蓝废水溶液，置于氙灯光源下光照，反应 90 min 后磁分离，取 1 mL 反应后活性艳蓝溶液，对上清液中活性艳蓝浓度测试，采用紫外可见分光光度计测定，活性艳蓝的最大吸附波长为 595 nm。相同实验步骤重复 10 次。

固定化漆酶动力学：取 20 mg 固定化漆酶，加入 2 mL 1mmol/L ABTS 溶液，加入 25 mL pH 5.2 500 mg/L 酸性绿废水溶液，置于氙灯光源下光照，在不同时间间隔，磁分离，取 1 mL 反应后酸性绿废水溶液，对上清液中酸性绿浓度测试，采用紫外可见分光光度计测定，酸性绿的最大吸附波长为 506 nm。

重复性：取 10 mg 固定化漆酶，加入 1 mL 1mmol/L ABTS 溶液，加入 12.5 mL pH 5.2 500 mg/L 酸性绿废水溶液，置于氙灯光源下光照，反应 90 min 后磁分离，取 1 mL 反应后酸性绿溶液，对上清液中酸性绿浓度测试，采用紫外可见分光光度计测定，酸性绿的最大吸附波长为 506 nm。相同实验步骤重复 10 次。

2.3 结果与讨论

2.3.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的表征与分析

2.3.1.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的 SEM 表征与分析

图 2-1 对热处理后 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 样品的形貌进行了表征和描述。如图 2-1a 所示, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 产物呈八面体结构, 尺寸为 $9 \sim 18 \mu\text{m}$ 。放大后的 SEM 图像表明, 制备的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 八面体由 Fe_3O_4 纳米颗粒和 $\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 骨架组成, 形成层状结构。

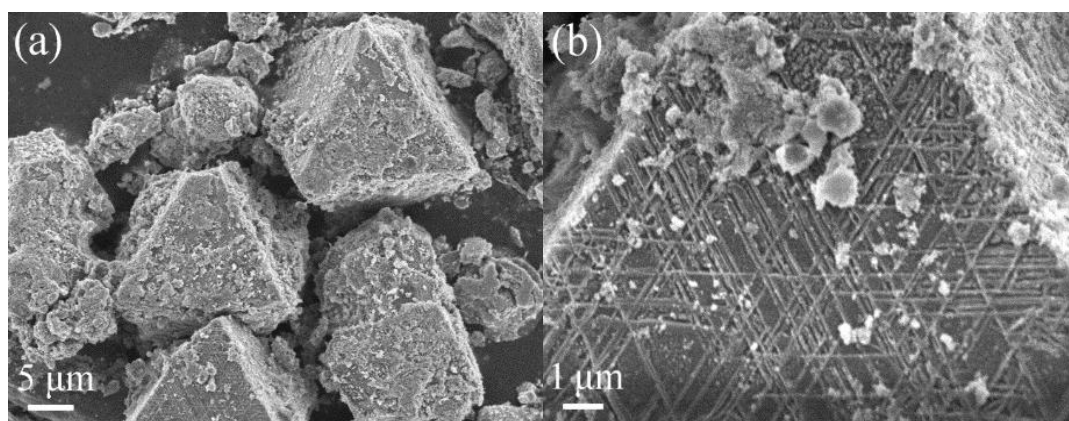


图 2-1 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的 SEM (a-b) 分析图

Figure 2-1 SEM (a-b) analysis of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$

2.3.1.2 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的 XRD 表征与分析

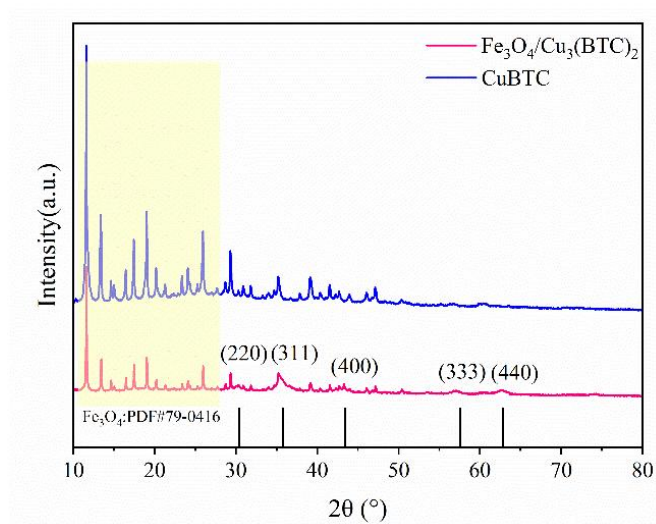


图 2-2 $\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的 XRD 分析图

Figure 2-2 XRD analysis of $\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$

$\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 、热处理后的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的 XRD 谱图如图 2-2 所示。 Fe_3O_4 的特征峰位于 30.4° 、 35.8° 、 43.4° 、 57.6° 、 62.8° 处，并且在 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的 XRD 谱图中也观察到 Fe_3O_4 的特征峰，与 Fe_3O_4 标准 PDF 卡片(79-0416)相匹配。同时， $\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的特征峰在 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 谱图中能够观察到。这表明 $\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 负载成功，同时加热前后材料结构没有发生改变。

2.3.1.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的 FI-IR 表征与分析

如图 2-3 所示，在 $4000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ 波长范围内研究了热处理后 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的表面官能团。在 587 cm^{-1} 处有一个强吸收带对应于 Fe-O 的拉伸振动，表明复合材料中存在 Fe_3O_4 。在 729 cm^{-1} 处有很强的吸收带，对应于 Cu-O 的伸缩振动。 1634 cm^{-1} 、 1372 cm^{-1} 和 1109 cm^{-1} 附近的吸收峰可能分别归因于 O=C-C 拉伸振动、C=C 拉伸振动和 C-O-C 拉伸振动^[103]。

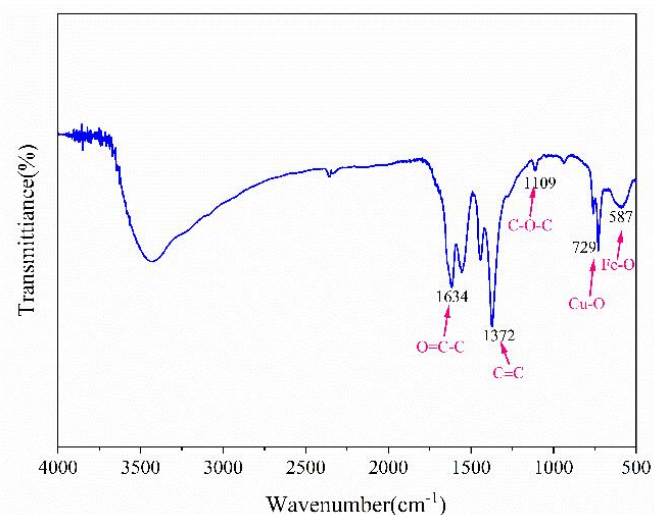
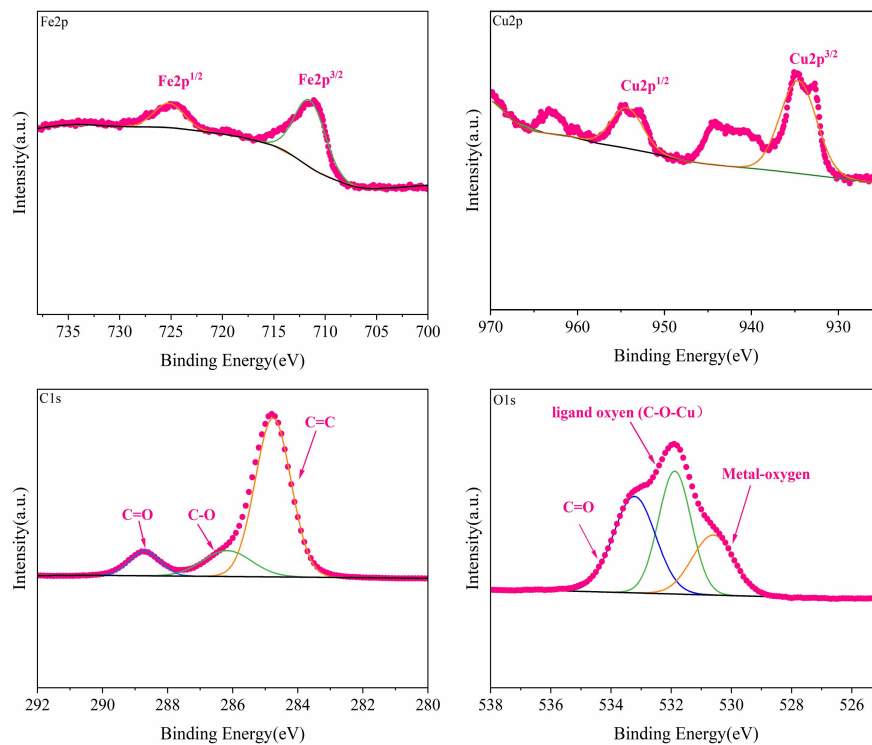


图 2-3 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的 FI-IR 分析图

Figure 2-3 FT-IR analysis of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$

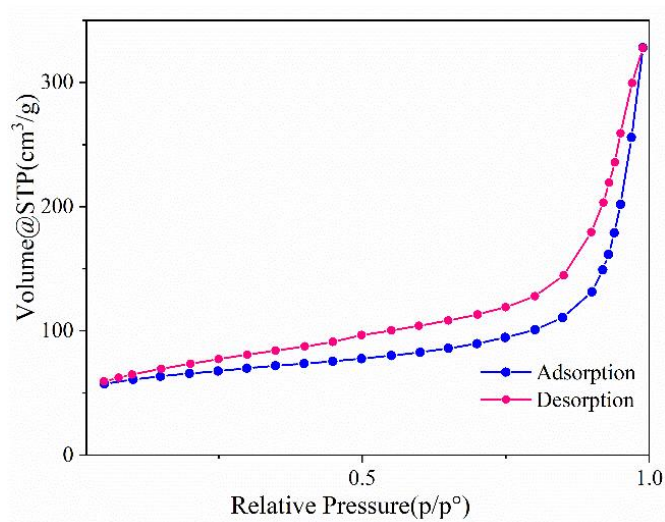
2.3.1.4 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的 XPS 表征与分析

通过 XPS 分析进一步测定了热处理后 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的表面化学组成和元素价态。由图 2-4 可以看出，C 1s 在 284.8 eV 、 286.2 eV 和 288.6 eV 处的特征峰分别归属于 C-C、C-O 和 C=O 键。 711 eV 、 724.28 eV 下的 Fe 2p 分别对应于 Fe $2p^{3/2}$ 和 Fe $2p^{1/2}$ 轨道，表明该材料是基于 Fe_3O_4 纳米粒子。O 1s 光谱峰位于 530.18 、 531.68 和 532.88 eV ，与金属氧键、配体氧(C-O-Cu)和 O-C=O 有关^[104]。

图 2-4 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的 XPS 分析图Figure 2-4 XPS analysis of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$

2.3.1.5 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的 BET 表征与分析

采用表面积法的 BET 模型计算 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的氮吸附-解吸等温线, 如图 2-5 所示。 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的 BET 表面积、孔隙体积和平均孔径分别约为 $136.33 \text{ m}^2/\text{g}$ 、 $0.507 \text{ cm}^3/\text{g}$ 和 14.88 nm 。

图 2-5 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的 BET 分析图Figure 2-5 BET analysis of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$

2.3.1.6 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的磁滞回线表征与分析

$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的饱和磁化强度(M_s)为 27.9 emu/g。值得注意的是, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 可以通过磁性手段轻松地从溶液中回收,使其适合用于催化回收。

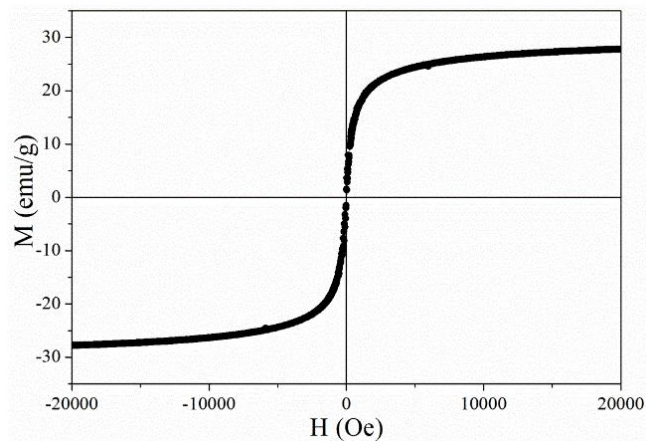


图 2-6 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的磁滞回线分析图

Figure 2-6 M-H analysis of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$

2.3.1.7 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的热重表征与分析

为了了解 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的热行为,采用热重分析(TGA)技术进行了研究。从图 2-7 可以观察到三个明显的失重区间。第一部分失重是由于去除吸附的溶剂分子。在 285-395°C 范围内,有机骨架的失重率为 33.2%。在 395°C 以上, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的结构完全崩溃并逐渐碳化。

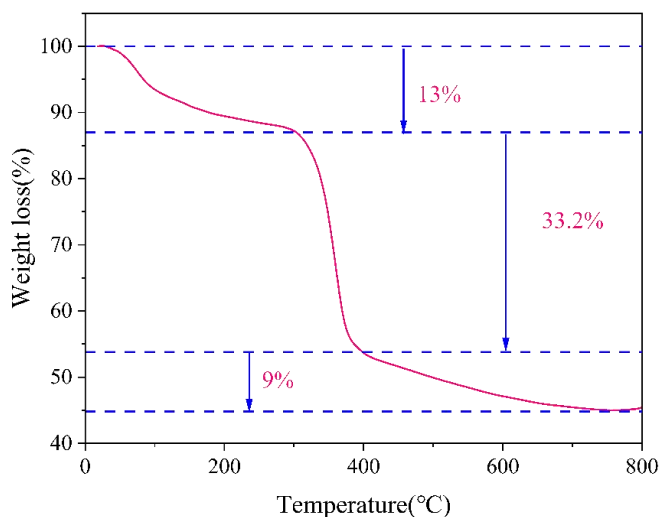


图 2-7 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的磁滞回线分析图

Figure 2-7 M-H analysis of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$

2.3.1 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 催化性能研究

2.3.1.1 游离漆酶和固定化漆酶最适 pH 的探究

图 2-8 比较了游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 的最佳 pH。观察到两种形式在 pH 为 5.2 时均表现出最高活性。值得注意的是, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 在 3.2 ~ 6.0 的 pH 范围内表现出超过其最大活性 60.6% 的保留率。相比之下, 游离漆酶表现出相对适度的保存大约 43.9% 的功能容量。 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 的 pH 适应性增强是由于 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 的稳定性, 防止结构变化, 而结构变化通常会降低催化活性。

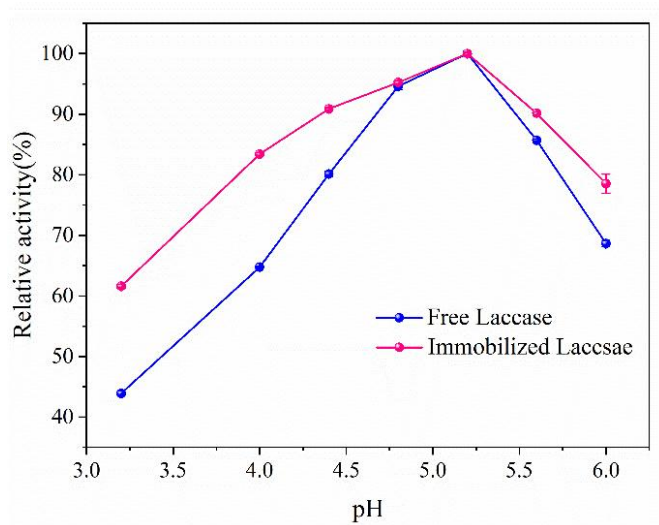
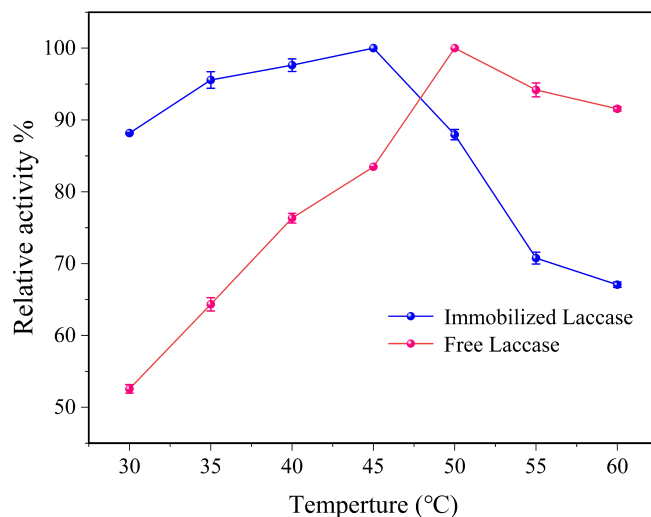


图 2-8 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 的最适 pH

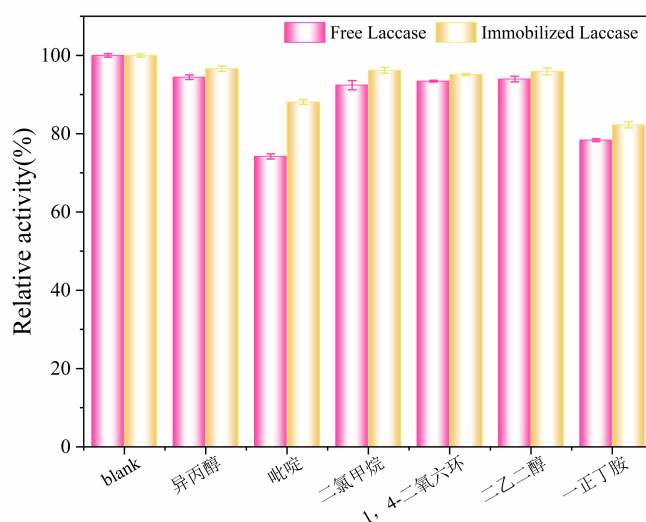
Figure 2-8 Optimum pH for free laccase and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$

2.3.1.2 游离漆酶和固定化漆酶最适温度的探究

如图 2-9 所示, 确定游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 的最佳温度分别为 50°C 和 45°C 。固定化过程改变了漆酶的催化活性, 在 $30\text{--}45^\circ\text{C}$ 条件下, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 的相对催化活性高于游离漆酶。但在 $50\text{--}60^\circ\text{C}$ 时, 其相对催化活性低于游离漆酶。 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 固定化漆酶在 $35\text{--}55^\circ\text{C}$ 范围内表现出较高的催化活性 ($>89\%$), 表明 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 最适合在 $35\text{--}55^\circ\text{C}$ 范围内应用。

图 2-9 游离漆酶和 Fe₃O₄/Cu₃(BTC)₂-Lac 的最适温度Figure 2-9 Optimum temperature for free laccase and Fe₃O₄/Cu₃(BTC)₂-Lac

2.3.2.3 游离漆酶和固定化漆酶有机物耐受性的探究

图 2-10 游离漆酶和 Fe₃O₄/Cu₃(BTC)₂-Lac 的有机物耐受性Figure 2-10 Organic tolerance of free laccase and Fe₃O₄/Cu₃(BTC)₂-Lac

将游离酶和 Fe₃O₄/Cu₃(BTC)₂-Lac 置于 IPA、Py、DCM、Diox、DEG、N-BuNH₂ 溶液中 30°C 静置 2 h，其相对活性如图 2-10 所示。数据表明 Fe₃O₄/Cu₃(BTC)₂ 固定化漆酶比游离漆酶保留了更高活性。特别是在吡啶溶液中，Fe₃O₄/Cu₃(BTC)₂ 固定化漆酶保留了 88.1% 的相对活性。

2.3.2.4 游离漆酶和固定化漆酶金属离子耐受性的探究

本研究将游离酶和 Fe₃O₄/Cu₃(BTC)₂-Lac 置于 Mn³⁺、Li⁺、Ce⁴⁺、Cr³⁺、Ni²⁺、Ca²⁺ 溶液中 30°C 静置 2 h，游离漆酶和固定化漆酶表现出不同的相对活性，如图

2-11 所示。其中，在 Mn^{3+} 溶液中， $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 保留了 91.4% 的相对活性。表明 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 可以降低金属离子对漆酶活性的影响。

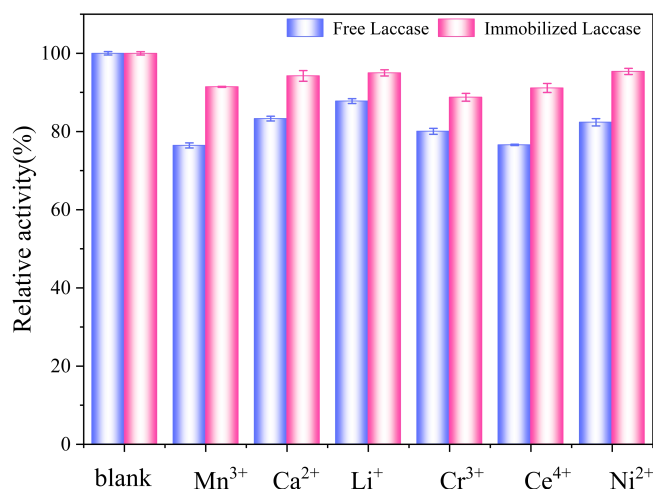


图 2-11 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 的金属离子耐受性

Figure 2-11 Metal ions tolerance of free laccase and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$

2.3.2.5 游离漆酶和固定化漆酶耐酸性的探究

在 3.5 至 6.0 的不同酸度范围内研究了游离漆酶和固定化漆酶相对活性的影响。本研究将游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 置于不同 pH 的醋酸缓冲溶液中，实验结果如图 2-12 所示。可以看出，游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 在不同 pH 值的缓冲液中表现出不同的相对活性。与游离酶相比，固定化漆酶在较宽的 pH 范围内表现出高活性。

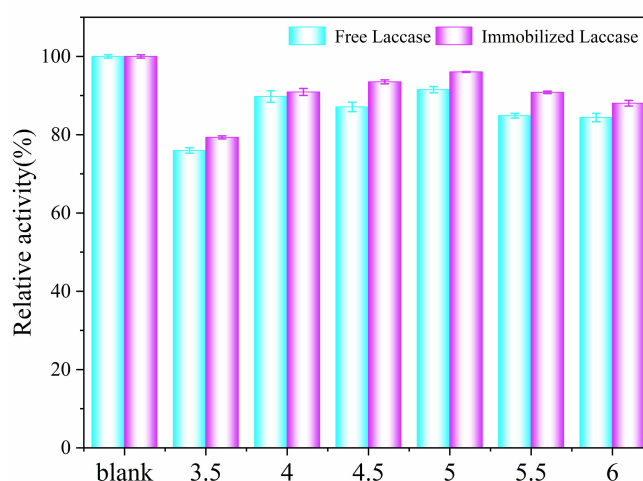


图 2-12 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 的耐酸性

Figure 2-12 pH stabilities of free laccase and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$

2.3.2.6 游离漆酶和固定化漆酶抑制剂耐受性的探究

本研究将游离酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 置于 SDS、TU、EDTA、Citric acid、APA、TEA 溶液中 30°C 静置 2 h，游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 的抑制剂耐受性结果如图 2-13 所示。由图可以观察到， $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 的相对活性高于游离漆酶。特别是，在 APA、TEA 溶液中，固定化漆酶保留了 79%、96% 的相对活性，而游离漆酶保留了 41.2%、22.2% 的相对活性。综上所述， $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 具有良好的抑制剂耐受性。

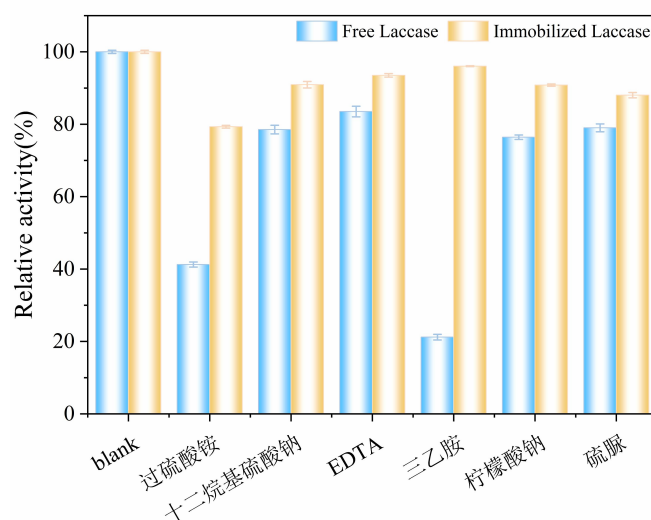


图 2-13 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 的抑制剂耐受性

Figure 2-13 Inhibitors tolerance of free laccase and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$

2.3.2.7 游离漆酶和固定化漆酶米氏常数的探究

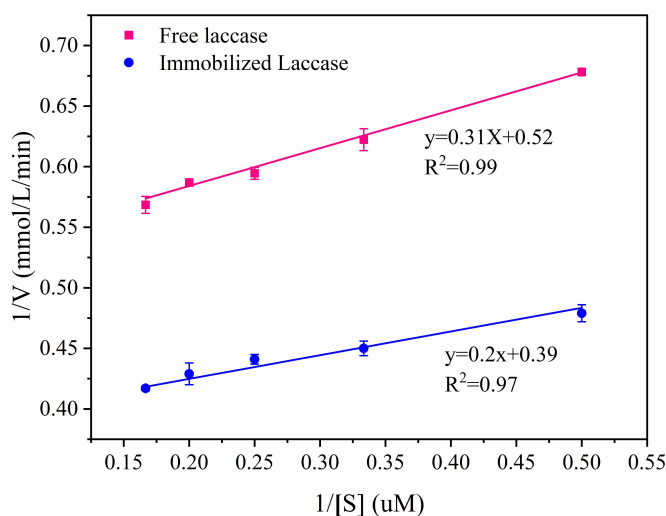


图 2-14 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 的米氏常数方程

Figure 2-14 Michaelis constant of free laccase and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$

动力学参数是根据 Lineweaver-Burk 图和 K_m 和 V_{max} 分别由 X 轴和 Y 轴的截距确定。固定化漆酶的 K_m 值高于游离漆酶的值，固定化漆酶的 V_{max} 值为 0.46，而游离漆酶的 V_{max} 值为 1.92。游离和固定漆酶的 K_m 值分别为 0.62 和 2.56。固定化酶 K_m 比游离酶增加了约 4 倍。另一方面， V_{max} 与游离酶相比，固定化酶的值下降了约 5 倍。

2.3.3 $Fe_3O_4/Cu_3(BTC)_2$ -Lac 处理染料废水的效果研究

采用 $Fe_3O_4/Cu_3(BTC)_2$ -Lac 在 500 W 氙灯照明下光热降解含 BG、RB19 和 AG1 废水。如图 2-15(a)所示，光照 90 min 后， $Fe_3O_4/Cu_3(BTC)_2$ 对含 RB19 和 AG1 废水的脱色率分别为 8.6%和 21.3%，吸附量分别为 53.7 mg/g 和 133.4 mg/g。在含 BG 的废水中，光照 60 min 后， $Fe_3O_4/Cu_3(BTC)_2$ 的脱色率和吸附量分别为 22.5%和 140.4 mg/g。值得注意的是， $Fe_3O_4/Cu_3(BTC)_2$ -Lac 可以快速光热降解高浓度染料废水。光照 60 min 后，含 BG 废水的脱色率达到 97.1%，相应的脱色量为 607 mg/g；同样，对含 RB19 和 AG1 的废水进行 90 分钟的光热处理后，脱色率约为 92.6%和 90.4%，脱色量分别为 578.8 mg/g 和 565.3 mg/g。前 30 min 分别占总降解量的 79.6%、93.7%和 99.3%。这可能与 $Fe_3O_4/Cu_3(BTC)_2$ -Lac 的高光热催化活性与磁性载体的多孔性协同作用有关，从而为染料降解提供了更大的驱动力。如图 2-15 (b)所示，光热降解染料废水过程中的温度监测显示，光照 90 min 后，含 BG、RB19 和 AG1 的废水温度分别从 25°C上升到 47.8°C、47.0°C和 47.2°C。温度升高是由于 $Fe_3O_4/Cu_3(BTC)_2$ 的光热转化，这对维持 $Fe_3O_4/Cu_3(BTC)_2$ -Lac 的催化效果起着至关重要的作用。这些结果表明， $Fe_3O_4/Cu_3(BTC)_2$ -Lac 可以作为一种有效的生物催化剂用于高浓度染料废水的快速光热处理。

为了评估光热生物催化剂的再现性，利用 $Fe_3O_4/Cu_3(BTC)_2$ -Lac 在连续 10 个循环中系统地降解染料废水。如图 2-15(c)所示， $Fe_3O_4/Cu_3(BTC)_2$ -Lac 在染料废水的光热降解中表现出显著的可重复使用性。光照 90 min 后，RB19 和 AG1 废水的初始脱色率分别为 92.6%和 90.4%。经过 10 次应用，含 RB19 和 AG1 废水的脱色率分别保持在 62.8%和 73.4%左右。值得注意的是，含 BG 的废水在第 1 次和第 10 次循环照射 60 min 后，脱色率分别为 97.1%和 70.9%。这些结果表明固定化漆酶可以作为光热生物催化剂降解高浓度染料废水。

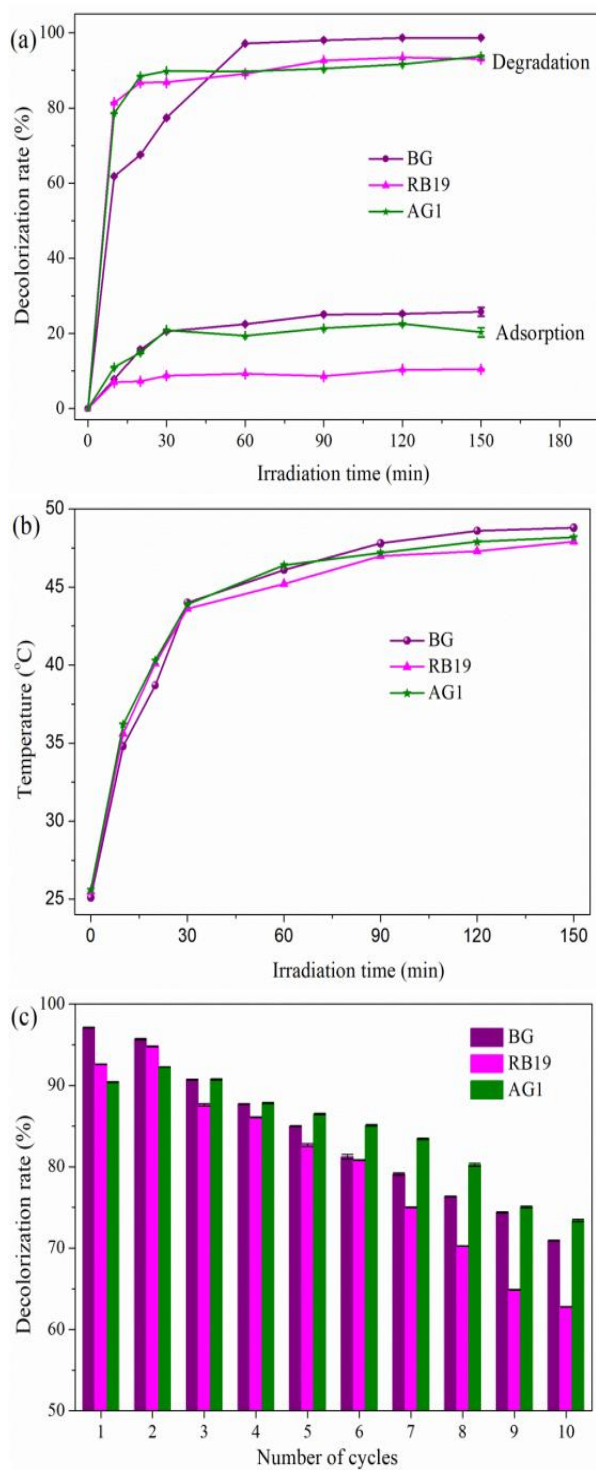


图 2-15 (a) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 光热降解染料废水的动力学, (b)温度变化, (c)可重复利用性。

Figure 2-15 (a) Kinetics, (b) temperature changes, and (c) reusabilities of photothermal degradation of dye wastewater by $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$

2.3.4 不同材料降解染料的效果对比

表 2-1 比较了各种催化剂的染料降解效果。结果表明, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 的降解效果与其他文献报道的结果相当, 同时表明其可作为光热生物催化剂用于高浓度染料废水的降解。

表 2-1 染料降解的比较

Table 2-1 Comparison of Dye degradation

固定化载体	固定化方法	染料名称	去除率	文献
OBC/ TiO_2	crosslinking	red X-3B	95% (within 3h)	[105]
chitosan、genipin	crosslinking	Acid Black 172、 Congo Red、 Neutral Red, et	>55% (after 5 cycles)	[106]
fruit processing waste biochar	adsorption	BG	93% (pH=5,30°C)	[107]
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$	electrostatic, covalent supramolecular interactions	MB	70% (pH=5)	[108]
$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2@\text{MIL-101}(\text{Cr})$	adsorption	AR RB	92% 73% (after 5 cycles)	[109]
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$	covalent	BG RB19 AG1	70.9% 62.8% 73.4% (after 10 cycles)	This work

2.4 小结

本章成功制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 材料，并经过热处理得到加热后的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 。然后使用 EDC/NHS 活化表面的羧基，加入漆酶后成功制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 。考察了游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 的最适温度、最适 pH、有机溶剂和金属离子耐受性等催化性能以及 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 在降解染料废水实际应用中的效能表现。具体为：

(1)采用共沉淀法制备出巯基丙酸修饰的 Fe_3O_4 纳米粒子，然后向其中加入硝酸铜和均苯三甲酸溶液，成功制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 材料。随后将其放入管式炉在氩气气氛中对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 进行热处理。以 $2^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速度升温至 260°C 并保持 6 h,得到加热的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 。然后使用 EDC/NHS 活化表面的羧基，加入漆酶后成功制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 。

(2)利用 SEM、XRD、FT-IR、BET、M-H 测试手段表征分析了热处理后的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 。然后，对游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 进行最适 pH、最适温度、有机溶剂、金属离子耐受性等测试。

(3)选取灿烂绿、活性艳蓝 19 和酸性绿 1 作为染料废水模型。通过氙灯模拟光照对染料废水的降解动力学做了系统的研究。重要的是， $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 。经过 10 次循环使用后，去除率仍分别为 70.9%、62.8% 和 73.4%。 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 在光热降解实际应用中具有特殊的潜力。

第 3 章 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 的制备及其催化活性研究

双酚 A(BPA)是一种典型的内分泌干扰物(EDC)，对人类健康和生态环境构成严重威胁。随着工业化进程的推进，BPA 在全球范围内的环境污染问题日益加剧，已成为备受关注的重大环境风险因子。作为一种典型的环境内分泌干扰物，BPA 可通过模拟内源性雌激素、拮抗雄激素受体等分子机制，干扰人体及其他生物体的正常内分泌功能，进而导致生殖、发育和代谢等关键生理过程的紊乱。不仅如此，双酚 A 具有高毒性，并且在自然环境中极难通过生物降解过程去除，长期残留于土壤、水体等环境介质中，持续对生态系统构成潜在威胁^[34]。因此，开发经济高效且环境友好的双酚 A 污染修复技术，对实现生态环境可持续发展和保障人类健康具有重大战略意义。

沸石咪唑框架(ZIF-8)是一种广泛研究的金属有机框架(MOF)，它结合了 MOF 的结构多样性和沸石的稳健性。由锌离子(Zn^{2+})和 2-甲基咪唑酸酯接头，ZIF-8 表现出方钠石(SOD)拓扑结构，其特征是高度多孔的晶体结构。ZIF-8 具有卓越的热稳定性和化学稳定性，加上可调特性，使其成为广泛应用的首选材料。利用 Fe_3O_4 的磁性功能修饰 ZIF-8 材料构建 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ ，形成的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 具有较大的比表面积和磁性功能，为漆酶的固定化提供了理想选择。Zheng^[110]等人采用简单的方法制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{ZIF-8}$ 核壳结构材料，该异质结构具有独特的形貌、大的比表面积、优异的热稳定性和超顺磁性。

本章首先采用共沉淀法制备出柠檬酸钠修饰的 Fe_3O_4 纳米粒子，然后向其中加入 $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 2-Melm 溶液，成功制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 材料。最后，加入聚丙烯酰胺和硫酸铜溶液，采用 Cu^{2+} 螯合的方法固定漆酶，得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 。利用 SEM、TEM、EDS-Mapping、XRD、FT-IR、TGA、M-H 测试手段对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 材料进行了表征分析。同时，对游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 进行基本性质(如最适 pH、最适温度、金属离子耐受性等)测试，结果显示， $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 各项性能优于游离漆酶。 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 高效的催化能力，为双酚 A 的降解提供了一种绿色环保的处理方案。

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：六水合氯化铁(99%)、氨水(AR)、柠檬酸钠(98%)、2-甲基咪唑(98%)、考马斯亮蓝 G-250(AR)、五水硫酸铜(99%)、无水氯化钙(AR)、十六烷基三甲基溴化铵(99%)、乙二胺四乙酸(AR)、硫脲(AR)、曲拉通 X-100(分子生物级)、L-半胱氨酸(99%)、三乙胺(99%)、双酚 A(99%、GC)。

国药集团化学试剂有限公司：二水合醋酸锌(AR)、硫酸亚铁(AR)、无水乙醇(AR)、氯化镁(AR)、氯化钠(AR)、氯化钾(AR)、三氯化铬(AR)、氯化铝(AR)、四氢呋喃(99%)、二甲基乙酰胺(98%)、二甲基亚砷(99%)、苯甲酸乙酯(99%)、乙酸乙酯(95%)。

麦克林生化科技股份有限公司：聚丙烯酰胺(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%)。

3.1.2 主要实验仪器

L6S 型紫外-可见分光光度计、液相色谱仪(Agress W1100)、扫描电子显微镜(SEM、S-4800)、傅里叶红外光谱(天津港东 FT-IR-850)、Thermo Fisher Scientific Nicolet iS20)、X 射线粉末衍射仪(XRD、Rigaku Smartlab 9KW)、热重分析仪(岛津 DSC-60A)、透射电子显微镜(TEM、FEI Tecnai G2 F20)、超导量子干涉磁测量系统(MPMS3)、X 射线光电子能谱仪(赛默飞 Nexsa G2)。

3.2 实验方案

3.2.1 磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 的制备

3.2.1.1 柠檬酸钠修饰的 Fe_3O_4 纳米粒子的制备

称取 1.4 g 七水合硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)和 1.6 g 六水合三氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)，将其溶解于 40 mL 蒸馏水中。待两种物质完全溶解后，转移至三口烧瓶。向其中缓慢滴加 6 mL 氨水，随后将三口烧瓶置于水浴锅中，升温至 65°C，以 500 r/min 的速度进行机械搅拌，反应持续 1 小时。接着，将水浴锅温度升至 90°C，继续搅拌反应 1 h。之后，向三口烧瓶中加入 2.4 g 柠檬酸钠，搅拌 30 min，随后进行磁分离，并使用蒸馏水多次洗涤产物。

3.2.1.2 Fe₃O₄/ZIF-8 材料的制备

将上述 Fe₃O₄ 分散于 100 mL 蒸馏水中，准确量取 15 mL 转移至三口烧瓶内，将三口烧瓶置于 25°C 的水浴锅中，开启搅拌装置。向其中加入 2.3 g 2-甲基咪唑，持续搅拌 10 min。与此同时，另取 0.22 g Zn(CH₃COO)₂·2H₂O，使其完全溶解于 15 mL 蒸馏水中，随后将该溶液缓慢滴加至三口烧瓶内的体系中，继续搅拌 1 h。反应结束后，使用蒸馏水和乙醇交替洗涤产物多次，最后将洗涤后的产物置于 60°C 的环境中干燥。

3.2.1.3 Fe₃O₄/ZIF-8-Lac 的制备

称取 10 mg 的 Fe₃O₄/ZIF-8 载体，将其加入到含有 1 mL 浓度为 4 mg/L 的聚丙烯酰胺溶液中，随后将混合液置于 50°C 恒温混匀仪中，充分混匀并反应 2 h。反应结束后，利用磁分离技术进行分离，再使用蒸馏水洗涤一次。接着，向洗涤后的产物中加入 1.5 mL 浓度为 0.2 mol/L 的 CuSO₄ 溶液，再次将其置于 30°C 恒温混匀仪中，混匀并反应 1 h。待反应完成，同样进行磁分离操作，并用蒸馏水洗涤一次。最后，加入 1 mL 经过 10 倍稀释的漆酶，在 30°C 恒温混匀仪中混匀反应 1 h。反应结束后，进行最后一次磁分离，并用蒸馏水洗涤一次。

3.2.2 游离漆酶和 Fe₃O₄/ZIF-8 固定化漆酶性能研究

3.2.2.1 牛血清蛋白(BSA)标准曲线测试

牛血清蛋白(BSA)标准曲线测试步骤同“2.2.2.1”

3.2.2.2 愈创木酚标准曲线

愈创木酚标准曲线步骤同“2.2.2.2”

3.2.2.3 固载量测试

取 10 mg Fe₃O₄/ZIF-8 载体，加入 1 mL 4 mg/L 聚丙烯酰胺溶液，在 50°C 恒温混匀仪混匀反应 2 h，反应结束后，磁分离，蒸馏水洗涤一次，加入 1.5 mL 0.2 mol/L CuSO₄ 溶液，在 30°C 恒温混匀仪混匀反应 1 h，反应结束后，磁分离，蒸馏水洗涤一次，加入 2 mL 漆酶(稀释 10 倍)在 30°C 恒温混匀仪混匀反应 1 h，反应结束后，取 1 mL 固定酶上清液加入 0.1 mL 蒸馏水混合，再加入 5 mL 考马斯亮蓝溶液混匀均匀，染色 5 min，在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

3.2.2.4 游离漆酶和固定漆酶的最适 pH 测试

准备不同 pH 值的醋酸缓冲溶液体系, pH 值分别为 3、3.5、4、4.5、5.0、5.5、6, 每个体系的体积为 2.9 mL。取 0.1 mL 游离酶, 加入上述不同 pH 值的缓冲溶液体系中, 在 50°C 恒温混匀仪中充分混匀, 并预热 5 min。取 1 mL 的 1 mmol/L 愈创木酚溶液(50°C), 快速加入到已预热的混合体系中, 迅速将样品转移至比色皿中, 反应时间为 20 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定, 三组平行实验。

准备不同 pH 值的醋酸缓冲溶液体系, pH 值分别为 3、3.5、4、4.5、5.0、5.5、6, 每个体系的体积为 3.0 mL。取 10 mg Fe₃O₄/ZIF-8-Lac, 加入上述不同 pH 值的缓冲溶液体系中, 在 50°C 恒温混匀仪中充分混匀, 并预热 5 min。取 1 mL 1 mmol/L 愈创木酚溶液(50°C), 快速加入到已预热的混合体系中, 磁分离后迅速将样品转移至比色皿中, 反应时间为 26 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定, 三组平行实验。

3.2.2.5 游离漆酶和固定漆酶的最适温度测试

准备 2.9 mL pH 值为 5.0 的醋酸缓冲溶液。取 0.1 mL 游离酶, 加入到上述缓冲溶液中, 充分混合均匀。将混合液分别置于温度为 30°C、35°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C 的恒温混匀仪中, 并预热 5 min。向每个温度条件下的混合液中加入 1 mL 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50°C), 迅速将样品转移至比色皿, 反应时间为 20 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定, 三组平行实验。

准备 3.0 mL pH 值为 5.0 的醋酸缓冲溶液。取 10 mg Fe₃O₄/ZIF-8-Lac, 加入到上述缓冲溶液中, 充分混合均匀。将混合液分别置于温度为 30°C、35°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C 的恒温混匀仪中, 并预热 5 min。向每个温度条件下的混合液中加入 1 mL 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50°C), 磁分离后迅速将样品转移至比色皿, 反应时间为 26 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定, 三组平行实验。

3.2.2.6 漆酶活性测试

取 0.1 mL 游离漆酶, 加入至含有 2.9 mL pH 5.0 醋酸缓冲液的容器中, 使两者充分混合、分散均匀。随后, 将所得混合溶液转移至 50°C 恒温混匀仪中, 并预热 5 min。向混合液中加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液, 迅速转

移至比色皿中，反应时间为 20 s。反应结束后，使用紫外分光光度计，在最大吸收波长 465 nm 处对样品进行吸光度测定。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

取 10 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ ，加入至含有 3.0 mL pH 5.0 醋酸缓冲液的容器中，使两者充分混合、分散均匀。随后，将所得混合溶液转移至 50°C 恒温混匀仪中，并预热 5 分钟。向混合液中加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50°C)，磁分离后迅速转移至比色皿中，反应时间为 26 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

3.2.2.7 游离漆酶和固定漆酶的有机物耐受性测试

取 0.1 mL 游离酶，分别转移至多个离心管中。向各离心管内依次加入体积为 0.2 mL、浓度为 10 mM 的不同有机溶剂，所选有机溶剂包括四氢呋喃、二甲基乙酰胺、二甲基亚砷、苯甲酸乙酯、甘油和乙酸乙酯。将添加完试剂的离心管放置于温度设定为 30°C 的恒温混匀仪中，静置孵育 2 h。孵育结束后，向每个离心管内准确加入 2.7 mL pH 5.0 的醋酸缓冲溶液，放入温度为 50°C 的恒温混匀仪中预热 5 min，预热完成后，迅速向各离心管内加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50°C)，迅速转移至比色皿中，反应时间为 20 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

取 10 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ ，分别转移至多个离心管中。向各离心管内依次加入 0.1 mL 蒸馏水和体积为 0.2 mL、浓度为 10 mM 的不同有机溶剂，所选有机溶剂包括四氢呋喃、二甲基乙酰胺、二甲基亚砷、苯甲酸乙酯、甘油和乙酸乙酯。将添加完试剂的离心管放置于温度设定为 30°C 的恒温混匀仪中，静置孵育 2 h。孵育结束后，磁分离，向每个离心管内准确加入 3.0 mL pH 5.0 的醋酸缓冲溶液，放入温度为 50°C 的恒温混匀仪中预热 5 min，预热完成后，迅速向各离心管内加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50°C)，磁分离后迅速转移至比色皿中，反应时间为 26 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

3.2.2.8 游离漆酶和固定漆酶的金属离子耐受性测试

取 0.1 mL 游离漆酶，分别转移至多个离心管中。向各离心管内依次加入体积为 0.2 mL、浓度为 10 mM 的不同金属离子溶液，所选金属离子溶液包括

Mg²⁺、Na⁺、K⁺、Cr³⁺、Al³⁺、Ca²⁺溶液。将添加完试剂的离心管放置于温度为 30℃ 的恒温混匀仪中，静置孵育 2 h。孵育结束后，向每个离心管内准确加入 2.7 mL pH 5.0 的醋酸缓冲溶液，放入温度为 50℃ 的恒温混匀仪中预热 5 min，预热完成后，迅速向各离心管内加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50℃)，迅速转移至比色皿中，反应时间为 20 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

取 10 mg Fe₃O₄/ZIF-8-Lac，分别转移至多个离心管中。向各离心管内依次加入 0.1 mL 蒸馏水和体积为 0.2 mL、浓度为 10 mM 的不同金属离子溶液，所选金属离子溶液包括 Mg²⁺、Na⁺、K⁺、Cr³⁺、Al³⁺、Ca²⁺溶液。将添加完试剂的离心管放置于温度设定为 30℃ 的恒温混匀仪中，静置孵育 2 h。孵育结束后，磁分离，向每个离心管内准确加入 3.0 mL pH 5.0 的醋酸缓冲溶液，放入温度为 50℃ 的恒温混匀仪中预热 5 min，预热完成后，迅速向各离心管内加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50℃)，磁分离后迅速转移至比色皿中，反应时间为 26 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

3.2.2.9 游离漆酶和固定漆酶的热稳定性测试

将游离漆酶置于温度为 60℃ 的恒温混匀仪中，分别进行 0-10 h 的静置处理。在静置过程中，从第 1 h 开始，每隔 1 h 进行一次取样操作。每次取 0.1 mL 游离酶，转移至离心管中。随后，向该离心管内加入 2.9 mL pH 为 5.0 的醋酸缓冲溶液，使两者充分混合、分散均匀。随后放入温度为 50℃ 的恒温混匀仪中预热 5 min，加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50℃)，反应时间为 20 s，迅速转移至比色皿中。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

称取 10 mg Fe₃O₄/ZIF-8-Lac，将其置于不同的离心管中，分别加入 0.1 mL 蒸馏水。随后，放入温度为 60℃ 的恒温混匀仪中，分别进行 0-10 h 的静置处理。在静置过程中，从第 1 h 开始，每隔 1 h 进行一次取样操作。将离心管从恒温混匀仪中取出，采用磁分离技术去除上清液。随后，向离心管内加入 3.0 mL pH 为 5.0 的醋酸缓冲溶液，再次放入温度为 50℃ 的恒温混匀仪中预热 5 min，预热结束后，快速向离心管内加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50℃)。反应时间为 26 s 后，磁分离后迅速转移至比色皿。在最大吸收波长为 465 nm 处

对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

3.2.2.10 游离漆酶和固定漆酶的耐酸性测试

取 0.1 mL 游离漆酶，加入到体积为 0.2 mL，pH 值分别为 3、3.5、4、4.5、5.0、5.5、6 的醋酸缓冲溶液体系中。将混合液置于 30℃恒温混匀仪中，静置孵育 5 h。向上述处理后的混合液中加入 2.7 mL pH 5.0 的醋酸缓冲溶液，随后将溶液转移至 50℃恒温混匀仪中，预热 5 min。预热结束后，快速向离心管内加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50℃)。反应时间为 20 s 后，迅速转移至比色皿。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

称取 10 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ ，将其置于不同的离心管中，分别加入 0.1 mL 蒸馏水。随后，pH 值分别为 3、3.5、4、4.5、5.0、5.5、6 的醋酸缓冲溶液体系中。将混合液置于 30℃恒温混匀仪中，静置孵育 5 h。将离心管从恒温混匀仪中取出，采用磁分离技术去除上清液。随后，向离心管内加入 3.0 mL pH 为 5.0 的醋酸缓冲溶液，再次放入温度为 50℃的恒温混匀仪中预热 5 min，预热结束后，快速向离心管内加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50℃)。反应时间为 26 s 后，磁分离后迅速转移至比色皿。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

3.2.2.11 游离漆酶和固定漆酶的抑制剂耐受性测试

取 0.1 mL 游离漆酶，分别转移至多个离心管中。向各离心管内依次加入体积为 0.2 mL、浓度为 10 mM 的不同抑制剂，所选抑制剂包括十六烷基三甲基溴化铵、硫脲、乙二胺四乙酸、L-半胱氨酸、曲拉通 X-100、三乙胺溶液。将添加完试剂的离心管放置于温度为 30℃的恒温混匀仪中，静置孵育 2 h。孵育结束后，向每个离心管内准确加入 2.7 mL pH 5.0 的醋酸缓冲溶液，放入温度为 50℃的恒温混匀仪中预热 5 min，预热完成后，迅速向各离心管内加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50℃)，迅速转移至比色皿中，反应时间为 20 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

取 10 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ ，分别转移至多个离心管中。向各离心管内依次加入 0.1 mL 蒸馏水和体积为 0.2 mL、浓度为 10 mM 的不同抑制剂，所选抑制剂包括十六烷基三甲基溴化铵、硫脲、乙二胺四乙酸、L-半胱氨酸、曲拉通 X-

100、三乙胺溶液。将添加完试剂的离心管放置于温度设定为 30℃的恒温混匀仪中，静置孵育 2 h。孵育结束后，磁分离，向每个离心管内准确加入 3.0 mL pH 5.0 的醋酸缓冲溶液，放入温度为 50℃的恒温混匀仪中预热 5 min，预热完成后，迅速向各离心管内加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50℃)，磁分离后迅速转移至比色皿中，反应时间为 26 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

3.2.2.12 固定化漆酶的重复性测试

取 10 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ ，加入 3.0 mL pH 5.0 醋酸缓冲溶液，在 50℃恒温混匀仪预热 5 min，加入 1 mL 1mmol/L 愈创木酚溶液(50℃)，反应时间为 26 s，在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。以上步骤重复 10 次。

3.2.2.13 米氏常数的测试

取 0.1mL 游离漆酶，加入到 2.9 mL pH 值为 5.0 的醋酸缓冲溶液中，使两者充分混合。将混合液转移至 50℃的恒温混匀仪中并预热 5 min。分别准备浓度为 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mM 且温度为 50℃的愈创木酚溶液各 1 mL。依次加入 1 mL 不同浓度的愈创木酚溶液，反应时间为 20 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

取 10 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ ，加入到 3.0 mL pH 值为 5.0 的醋酸缓冲溶液中，使两者充分混合。将混合液转移至 50℃的恒温混匀仪中并预热 5 min。分别准备浓度为 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mM 且温度为 50℃的愈创木酚溶液各 1 mL。依次加入 1 mL 不同浓度的愈创木酚溶液，反应时间为 26 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

3.2.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 处理双酚 A 的效果研究

3.2.3.1 初始 BPA 浓度对催化降解双酚 A 的影响

称取 20 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 置于玻璃瓶中，向其中加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的 ABTS，以及 50 mL 用 pH=5 醋酸缓冲溶液配制的不同初始浓度(200 mg/L、100 mg/L、50 mg/L、10 mg/L)双酚 A 溶液。将玻璃瓶放置在氙灯光源下，开启搅拌装置，使反应体系充分混合并均匀接受光照。在反应过程中，按照设定的不同时间间隔，对反应体系进行磁分离操作。每次磁分离后，准确吸取 1

mL 反应后的双酚 A 溶液。采用液相色谱仪对吸取的溶液进行测试，其中流动相体积比设定为甲醇:水=80:20，检测波长设置为 275 nm，流速控制在 1 mL/min，进样量为 10 μ L。设置三组平行实验。

3.2.3.2 Fe₃O₄/ZIF-8-Lac 投加量对催化降解双酚 A 的影响

称取不同量的 Fe₃O₄/ZIF-8-Lac (10 mg、20 mg、30 mg、40 mg)置于玻璃瓶中，向其中加入 1 mL 1 mmol/L ABTS，以及 50 mL 用 pH=5 醋酸缓冲溶液配制的双酚 A 溶液。将玻璃瓶放置在氙灯光源下，开启搅拌装置，使反应体系充分混合并均匀接受光照。在反应过程中，按照设定的不同时间间隔，对反应体系进行磁分离操作。每次磁分离后，准确吸取 1 mL 反应后的双酚 A 溶液。采用液相色谱仪对吸取的溶液进行测试，其中流动相体积比设定为甲醇:水=80:20，检测波长设置为 275 nm，流速控制在 1 mL/min，进样量为 10 μ L。设置三组平行实验。

3.2.3.3 ABTS 浓度对 Fe₃O₄/ZIF-8-Lac 催化降解双酚 A 的影响

取 30 mg Fe₃O₄/ZIF-8-Lac 置于玻璃瓶中，向其中加入 1 mL 不同浓度 ABTS (0.5 mM、1 mM、2 mM、4 mM)，以及 50 mL 用 pH=5 醋酸缓冲溶液配制的双酚 A 溶液。将玻璃瓶放置在氙灯光源下，开启搅拌装置，使反应体系充分混合并均匀接受光照。在反应过程中，按照设定的不同时间间隔，对反应体系进行磁分离操作。每次磁分离后，准确吸取 1 mL 反应后的双酚 A 溶液。采用液相色谱仪对吸取的溶液进行测试，其中流动相体积比设定为甲醇:水=80:20，检测波长设置为 275 nm，流速控制在 1 mL/min，进样量为 10 μ L。设置三组平行实验。

3.2.3.4 Fe₃O₄/ZIF-8-Lac 的重复降解双酚 A

取 30 mg Fe₃O₄/ZIF-8-Lac 置于玻璃瓶中，向其中加入 1 mL 2 mM ABTS，以及 50 mL 用 pH=5 醋酸缓冲溶液配制的双酚 A 溶液。将玻璃瓶放置在氙灯光源下，开启搅拌装置，使反应体系充分混合并均匀接受光照。搅拌反应 90 min 后磁分离，准确吸取 1 mL 反应后的双酚 A 溶液。以上步骤重复 10 次。采用液相色谱仪对吸取的溶液进行测试，其中流动相体积比设定为甲醇:水=80:20，检测波长设置为 275 nm，流速控制在 1 mL/min，进样量为 10 μ L。设置三组平行实验。

3.3 结果与讨论

3.3.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 的表征与分析

3.3.1.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 的 SEM、TEM 和 EDS-mapping 表征与分析

$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 的 SEM、TEM 和 EDS-mapping 分析分别如图 3-1(a)-(f)所示, 图(a)为 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 的 SEM 电镜图, 观察到 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 呈粗糙的十二面体结构。图(b)、图(c)为 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 的 TEM 电镜图, 观察到 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 为十二面体结构, 与 SEM 表示的结果相同, 同时可以看到大量 Fe_3O_4 负载在 ZIF-8 表面。图(d-f)为 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 的 EDS-mapping 分析图, 元素分布图显示了 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 材料为二层结构, Fe_3O_4 的 Fe 元素均匀分布在最外层, ZIF-8 的 Zn、N 等元素分布最内层。因此, 证明已成功合成 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 固定化载体材料。

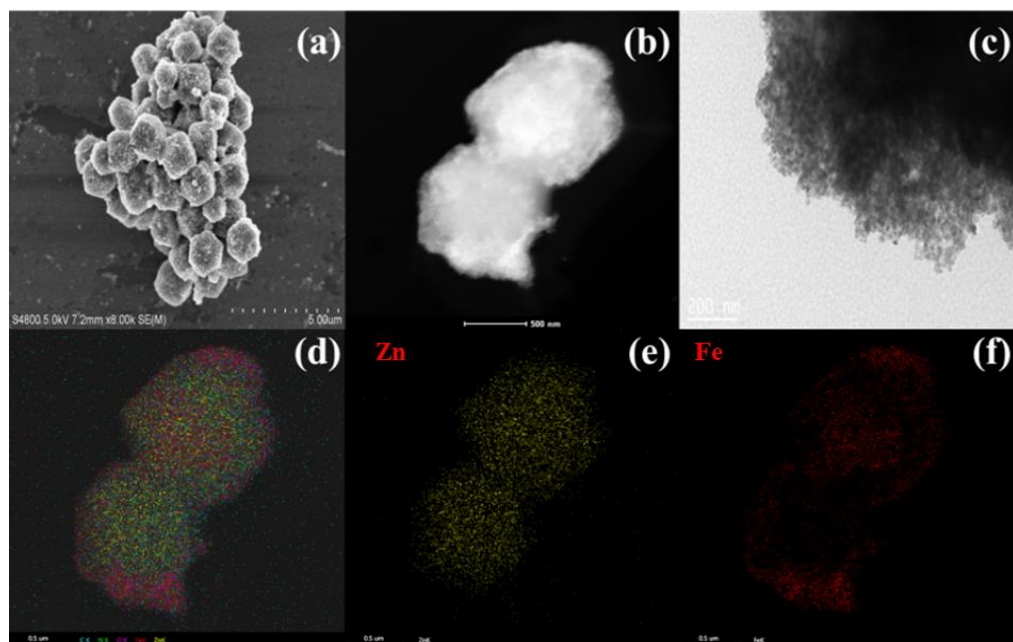


图 3-1 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 的 SEM (a)、TEM(b-c)和 EDS-mapping (d-f)分析图

Figure 3-1 SEM (a), TEM(b-c) and EDS-mapping (d-f) analysis of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$

3.3.1.2 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 的 XRD 表征与分析

通过 X 射线衍射(XRD)对 ZIF-8、 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 的晶格结构进行了表征。如图 3-2 所示, Fe_3O_4 的特征峰位于 30.4° 、 35.8° 、 43.4° 、 57.6° 、 62.8° 处, 并且在 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 的 XRD 谱图中也观察到 Fe_3O_4 的特征峰, 与 Fe_3O_4 标准 PDF 卡片(79-0416)相匹配。同时, ZIF-8 的特征峰在 10.4° 、 12.7° 、 14.6° 、 16.4° 、 18.0° 、 24.5° 和 26.7° 观察到 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$, 与文献中报道的特征峰一致^[111]。证明我

们成功合成 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 材料。

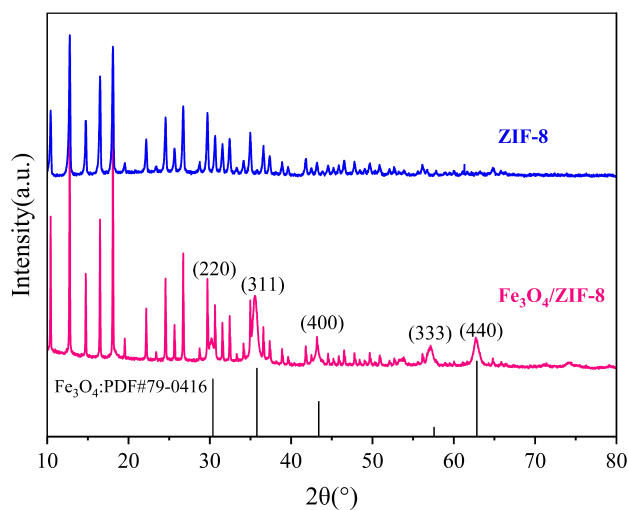


图 3-2 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 的 XRD 分析图

Figure 3-2 XRD analysis of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$

3.3.1.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 的 FI-IR 表征与分析

在 $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ 范围内收集的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-PAM}$ 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 如图 3-3 所示。位于 580 cm^{-1} 处的特征峰在 Fe_3O_4 归因于 Fe-O 拉伸振动。在随后合成的材料的 FT-IR 光谱中也观察到该波段，但它表现出较低的强度和微小的偏移。在 2926 cm^{-1} 和 3132 cm^{-1} 处观察到的特征峰归因于咪唑环中 C-H 键的弯曲振动^[112]。在 421 cm^{-1} 、 1138 cm^{-1} 、 1422 cm^{-1} 和 1578 cm^{-1} 处在光谱中分别归属于 Zn-N、C-N、N-H 和 C=N，表明 ZIF-8 的特征基团存在于 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 表面上。在固定化漆酶的光谱中还发现了蛋白质在 3390 cm^{-1} 和 1643 cm^{-1} 处的特征带，分别对应于主要来自 C=O 的 -NH₂ 和酰胺 I 的拉伸振动^[113]。以上数据表明，成功合成了 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 复合材料并成功将其与漆酶固定化。

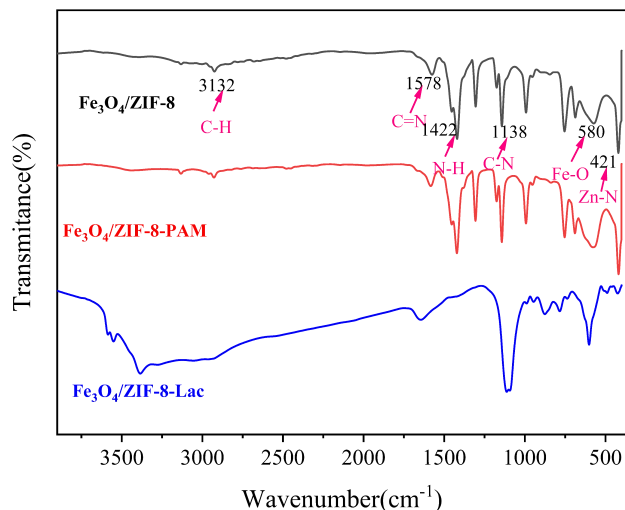


图 3-3 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-PAM}$ 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 的 FT-IR 分析图

Figure 3-3 FT-IR analysis of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-PAM}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$

3.3.1.4 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 的 TGA 表征与分析

通过热重分析(TGA)测定 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 的热稳定性, 如图 3-4 所示。根据相关文献报道, Fe_3O_4 纳米颗粒具有高热稳定性。根据图 3-4 所示, 温度升高至 510°C 附近后 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 质量不变。 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 在 $25-510^\circ\text{C}$ 范围内质量损失, 可分为两个阶段。在 200°C 之前, 由于某些溶剂或客体分子的损失, 在 200 至 510°C 之间, 高温导致 ZIF-8 的有机框架塌陷和碳化, 从而导致质量损失^[114]。结果表明, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 具有良好的热稳定性。

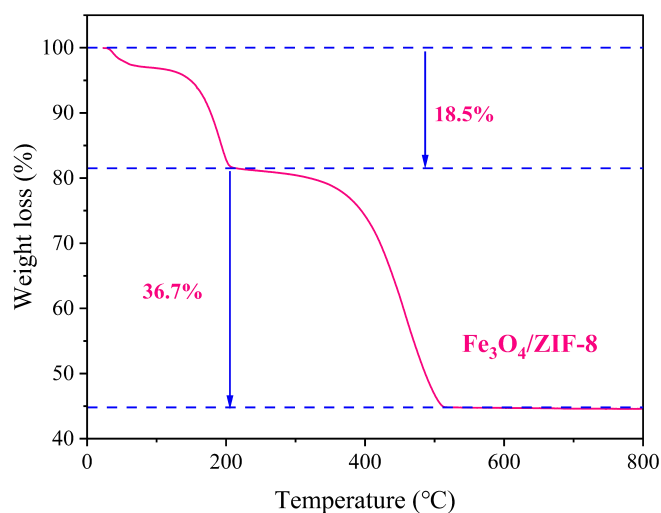


图 3-4 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 的 TGA 分析图

Figure 3-4 TGA analysis of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$

3.3.1.5 Fe₃O₄/ZIF-8 的 XPS 表征与分析

利用 X 射线光电子能谱(XPS)对 Fe₃O₄/ZIF-8 的组成进行了表征分析。Fe₃O₄/ZIF-8 结构中 Fe、O、N、Zn 元素分析如图 3-5 所示。在 711.3 eV、724.4 eV 处的峰分别对应 Fe 2p^{3/2} 和 Fe 2p^{1/2}, 证实了 Fe₃O₄ 的存在。在 1045.1 eV、1022.1 eV、400.7 eV 处检测到强峰, 归因于 Zn 和 N 元素, 证实了 ZIF-8 的存在^[115]。N 1s 图谱中, 结合能为 400.7 eV 和 399.2 eV 处的特征峰分别归因于 2-甲基咪唑中的 C=N、C-N 基团。O 1s 图谱中, 结合能为 530.0 eV、531.3 eV 和 532.9 eV 处的特征峰分别归因于金属离子基团、N-C=O 和 C=O 基团^[116]。

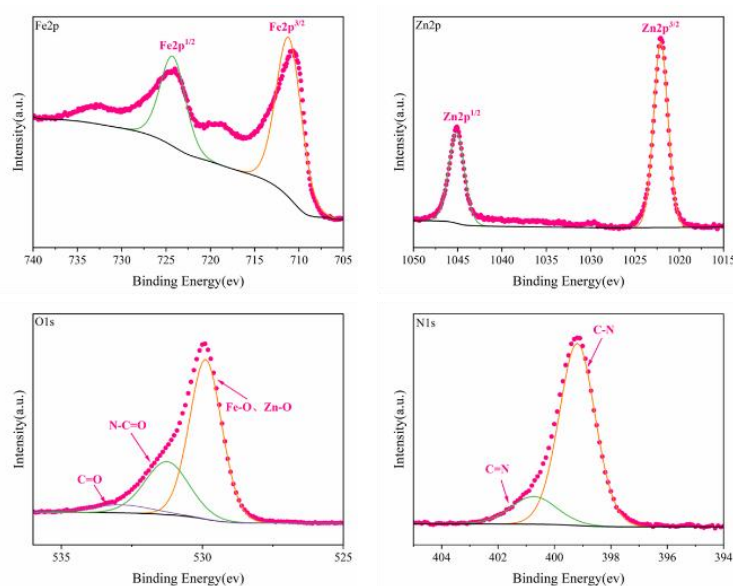
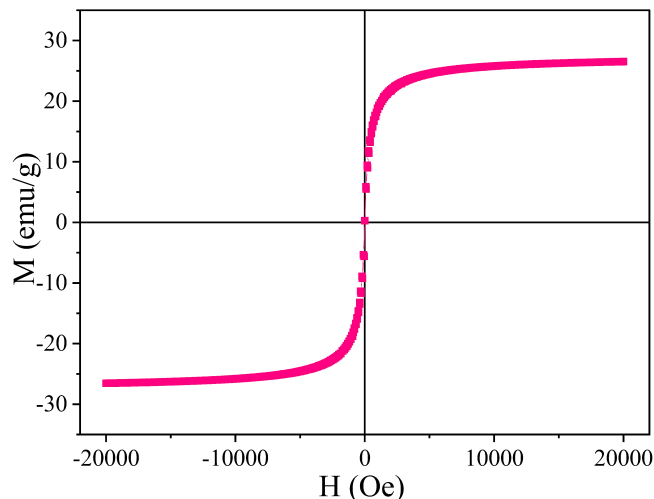


图 3-5 Fe₃O₄/ZIF-8 的 XPS 分析图

Figure 3-5 XPS analysis of Fe₃O₄/ZIF-8

3.3.1.6 Fe₃O₄/ZIF-8 的磁滞回线表征与分析

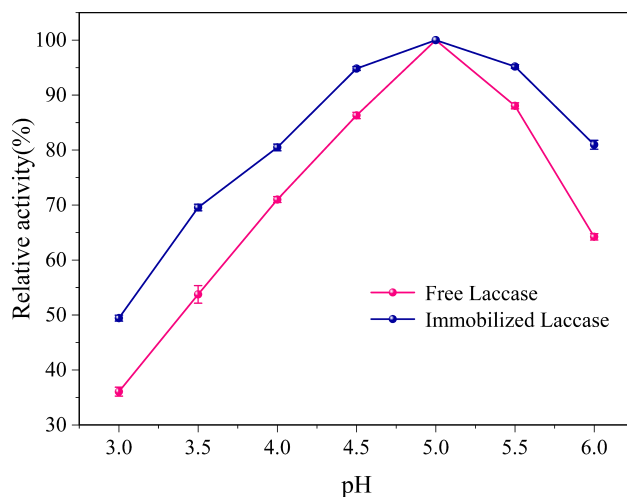
Fe₃O₄/ZIF-8 的磁滞回线如图 3-6 所示, 复合材料表现出超顺磁性。由图可知 Fe₃O₄/ZIF-8 的饱和磁化强度为 27.1 emu/g。表明 Fe₃O₄/ZIF-8 仍然表现出足够的磁化强度以进行磁分离。综上所述, Fe₃O₄/ZIF-8 在回收生物催化剂方面有着广阔的应用前景。

图 3-6 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 的磁滞回线分析图Figure 3-6 M-H analysis of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$

3.3.2 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 催化性能研究

3.3.2.1 游离漆酶和固定化漆酶最适 pH 的探究

游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 均在 $\text{pH}=5.0$ 时表现出最高活性，如图 3-7 所示。然而，游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 的酶活性在酸性和弱碱性条件下均出现下降，这可能是由于固定化过程中漆酶构象变化及其电离状态改变所导致的 pH 敏感性变化^[117]。

图 3-7 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 的最适 pHFigure 3-7 Optimum pH for free laccase and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$

3.3.2.2 游离漆酶和固定化漆酶温度的探究

将其漆酶置于最适 pH 5.0 环境中，探究游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 的最适

温度。如图 3-8 所示, 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 均在温度为 50°C 时表现出最高活性。然而, 游离漆酶在 30°C 时失去了大约 40% 的活性, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 在 30°C 时损失了大约 15%。这可能是由于 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 对漆酶的亲和力。

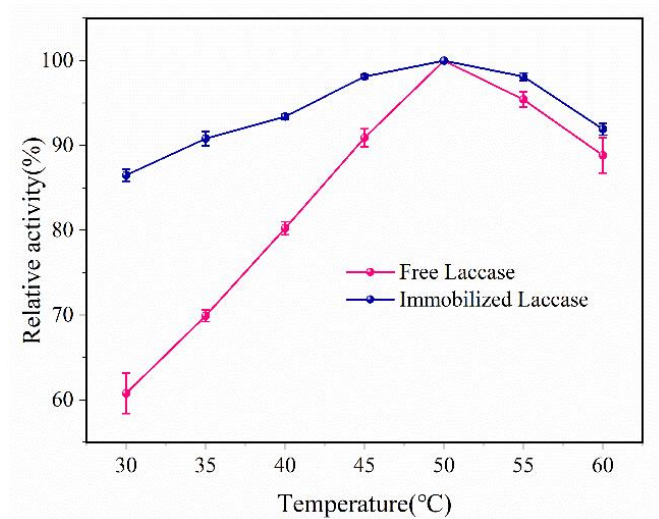


图 3-8 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 的最适温度

Figure 3-8 Optimum temperature for free laccase and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$

3.3.2.3 游离漆酶和固定化漆酶有机物耐受性的探究

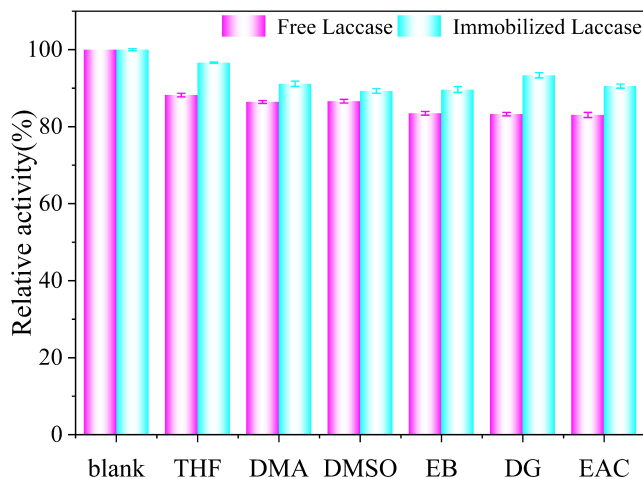


图 3-9 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 的有机物耐受性

Figure 3-9 Organic tolerance of free laccase and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$

将游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 置于 THF、DMA、DMSO、EB、DG、EAC 溶液中 30°C 静置 2 h, 其相对活性如图 3-9 所示。数据表明 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 比游离漆酶保留了更高活性。在 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 载体的保护下, 提高了漆酶对有机物环境的适应能力。

3.3.2.4 游离漆酶和固定化漆酶金属离子耐受性的探究

水体中含有大量的盐，会影响漆酶与底物的结合，从而影响漆酶的催化效率。本研究将游离酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 置于 Mg^{2+} 、 Na^+ 、 K^+ 、 Cr^{3+} 、 Al^{3+} 、 Ca^{2+} 溶液中 30°C 静置 2 h，游离漆酶和固定化漆酶表现出不同的相对活性，如图 3-10 所示。其中，对游离漆酶影响最大的是 Al^{3+} ，仅仅保留了 56% 的相对活性。然而，在 Al^{3+} 溶液中， $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 保留了 96% 的相对活性。表明 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 可以降低金属离子对漆酶活性的影响，从而可以广泛应用。

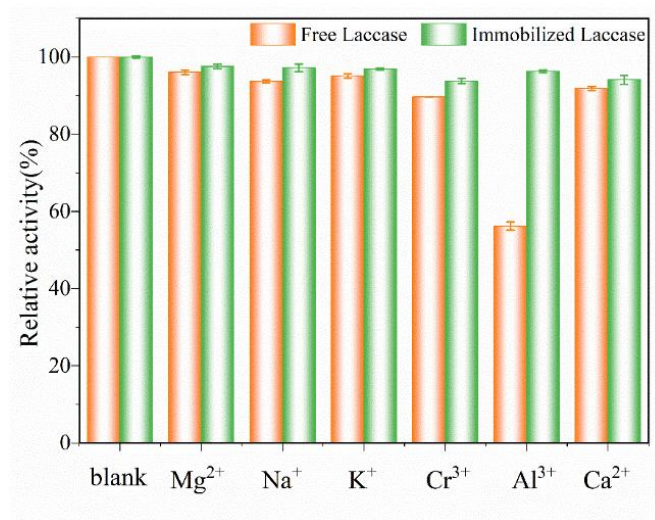
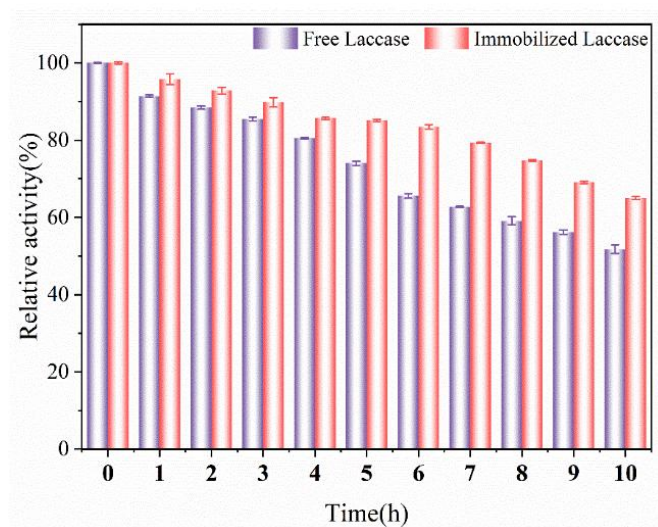


图 3-10 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 的金属离子耐受性

Figure 3-10 Metal ions tolerance of free laccase and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$

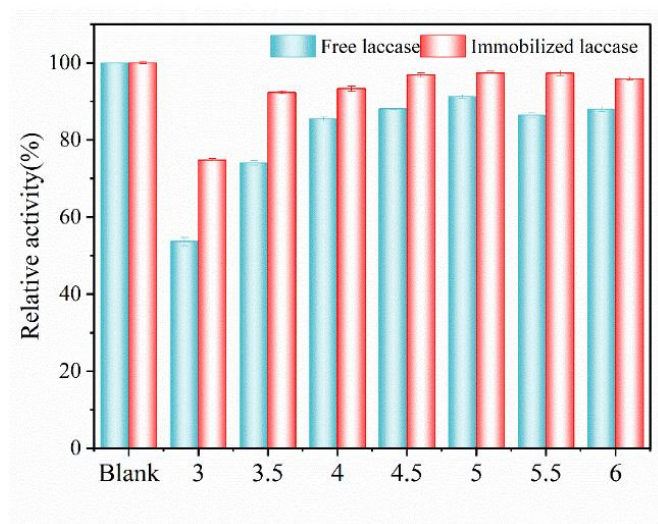
3.3.2.5 游离漆酶和固定化漆酶热稳定的探究

热稳定性是评价漆酶特性重要指标之一。本研究游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 置于 60°C 环境中静置 1-10 h 来探究漆酶的热稳定。由图 3-11 可知，游离漆酶保留了 52% 的相对活性，固定化漆酶保留了 65% 的相对活性，结果表明固定化漆酶在高温环境中可以保留相对较高的活性。在高温环境中静置时间过长会导致漆酶结构变性，其活性中心的铜离子配位环境遭到破坏。然而， $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 通过与漆酶的相互作用提升了漆酶的热稳定性。

图 3-11 游离漆酶和 Fe₃O₄/ZIF-8-Lac 的热稳定性Figure 3-11 Thermal stability of free laccase and Fe₃O₄/ZIF-8-Lac

3.3.2.6 游离漆酶和固定化漆酶耐酸性的探究

在 3.0 至 6.0 的不同酸度范围内研究了游离漆酶和固定化漆酶相对活性的影响。本研究将游离漆酶和 Fe₃O₄/ZIF-8-Lac 置于不同 pH 的醋酸缓冲溶液中，实验结果如图 3-12 所示。可以看出，游离漆酶和 Fe₃O₄/ZIF-8 固定化漆酶在不同 pH 值的缓冲液中表现出不同的相对活性。与游离酶相比，固定化漆酶在较宽的 pH 范围内表现出高活性。这种特性可能是由于 Fe₃O₄/ZIF-8-Lac 的稳定性增加造成的。此外，Fe₃O₄/ZIF-8 为固定化漆酶提供了理想的微环境。

图 3-12 游离漆酶和 Fe₃O₄/ZIF-8-Lac 的耐酸性Figure 3-12 pH stabilities of free laccase and Fe₃O₄/ZIF-8-Lac

3.3.2.7 游离漆酶和固定化漆酶抑制剂耐受性的探究

在实际废水中存在大量的表面活性剂，它们会影响催化剂对城市和工业废水中有害物质的降解。根据相关文献报道，抑制剂能够通过使漆酶结构变性来抑制活性^[118]。本研究将游离酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 置于 CTAB、TU、EDTA、L-cys、Triton X-100、TEA 溶液中 30°C 静置 2 h，游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 的抑制剂耐受性结果如图 3-13 所示。由图可以观察到， $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 的相对活性高于游离漆酶。特别是，在 CTAB、TEA 溶液中，固定化漆酶保留了 70%、41% 的相对活性，而游离漆酶保留了 6.8%、12.6% 的相对活性。综上所述， $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 具有良好的抑制剂耐受性。

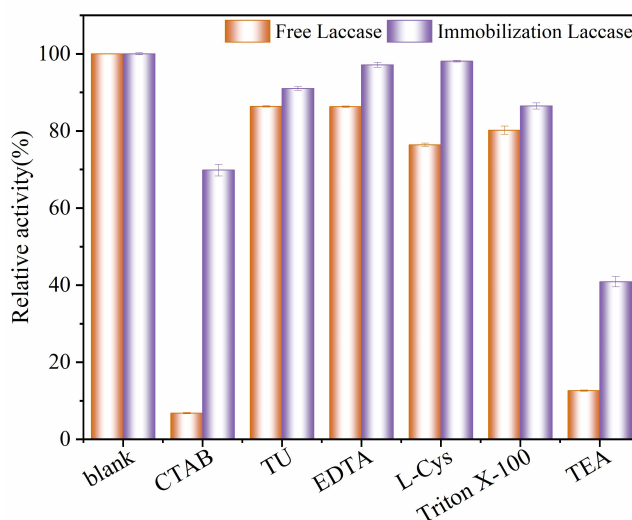
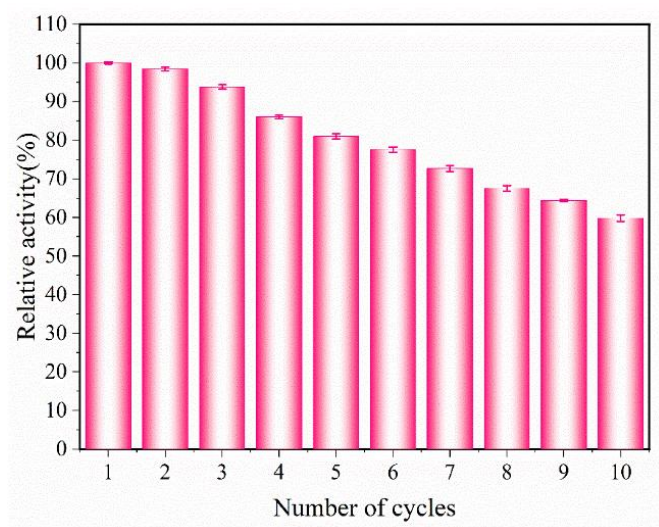


图 3-13 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 的抑制剂耐受性

Figure 3-13 Inhibitors tolerance of free laccase and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$

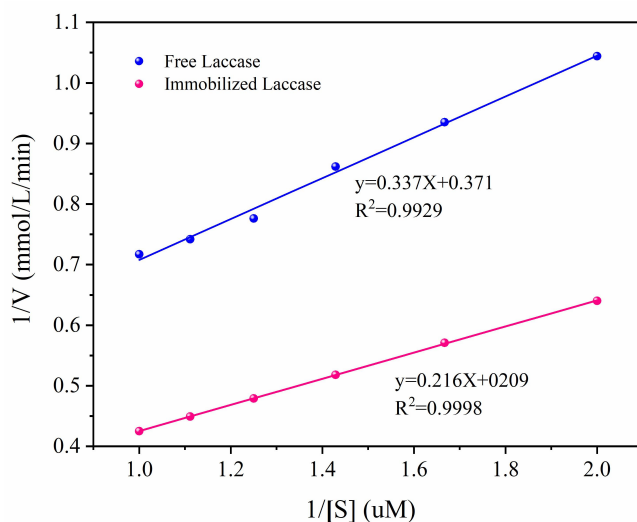
3.3.2.8 固定化漆酶的重复使用性的探究

磁性纳米颗粒提供了通过使用外部磁场从反应中回收漆酶的机会。在连续循环中效率更高的酶可以降低工业的生产成本。本研究中， $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 固定化漆酶循环使用 10 次，其相对活性依然保留 60% 的相对活性，如图 3-14 所示。然而，尽管固定化漆酶表现出良好的可重复使用性，但是其活性在每个循环后适度下降。由于物理损伤造成活性位点失活，从而活性降低。

图 3-14 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 的重复使用性Figure 3-14 Reusability of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$

3.3.2.9 游离漆酶和固定化漆酶米氏常数的探究

为了评估底物浓度的影响,用不同浓度的愈创木酚测定了游离酶和固定化酶的动力学参数 K_m (Michaelis constant)和 $V_{\max}$ (maximum velocity)。收集到数据用于创建漆酶活性与底物浓度之间的双倒数图,如图 3-15 所示。 K_m 和 $V_{\max}$ 游离酶分别为 0.909 和 2.697, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 分别为 1.035 和 4.785。显然,与游离酶相比,固定化过程影响了米氏常数的大小,这可能是由结构变化、位阻等引起的。

图 3-15 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 的米氏常数方程Figure 3-15 Michaelis constant of free laccase and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$

3.3.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 处理双酚 A 的效果研究

3.3.3.1 初始 BPA 浓度对催化降解的影响

在 pH 5.0、1 mmol/L ABTS 和双酚 A 初始浓度为 10-200 mg/L 的反应体系内，研究初始浓度对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 催化降解双酚 A 的影响，如图 3-16 所示。可以看出，在所有实验初始浓度下 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 固定化酶均能降解 BPA，为漆酶的广泛应用奠定了基础。当双酚 A 浓度为 20 mg/L 时，经过 150 min 催化降解，去除率达到 95%。特别是，当浓度为 10 mg/L 时，60 min 时双酚 A 去除率达到 100%。然而，当浓度增加到一定程度时， $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 催化降解能力降低。在双酚 A 浓度为 200 mg/L 时，去除率仅仅达到 20%。造成这种现象的原因可能是双酚 A 降解过程中产生酚自由基引起的，酚自由基可与漆酶反应，形成酶自由基偶联物，从而导致漆酶活性失活^[119]。

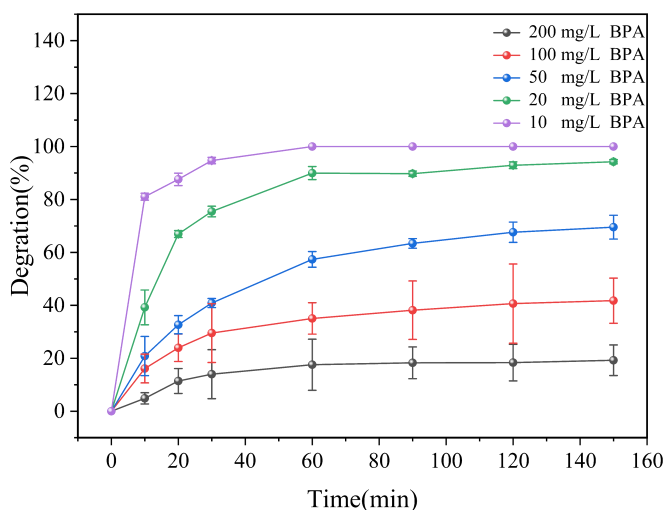


图 3-16 初始 BPA 浓度对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 固定化酶催化降解的影响

Figure 3-16 Effect of initial BPA concentration on $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ immobilized laccase catalytic degradation

3.3.3.2 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 投加量对催化降解的影响

漆酶的浓度是生物催化降解过程的一个重要考虑因素，因为它对双酚 A 的降解有重要影响。在 pH 5.0、1 mmol/L ABTS、50 mg/L 双酚 A 和不同质量的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 的反应体系内，研究固定化漆酶投加量对双酚 A 降解的影响，如图 3-17 所示。随着 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 的增加，双酚 A 的去除率也随之增加。在 150 min 时间内，当固定化漆酶的投加量从 10 mg 增加到 40 mg 时，双酚 A

的去除率从 33.6% 增加到 97.6%，可见 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 固定化酶能够高效去除双酚 A。然而，当 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 的投加量从 30 mg 增加到 40 mg 时，双酚 A 的去除率增加幅度较小，可能是由于 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 加入量过多出现了团聚现象，从而使漆酶的催化活性位点减少。

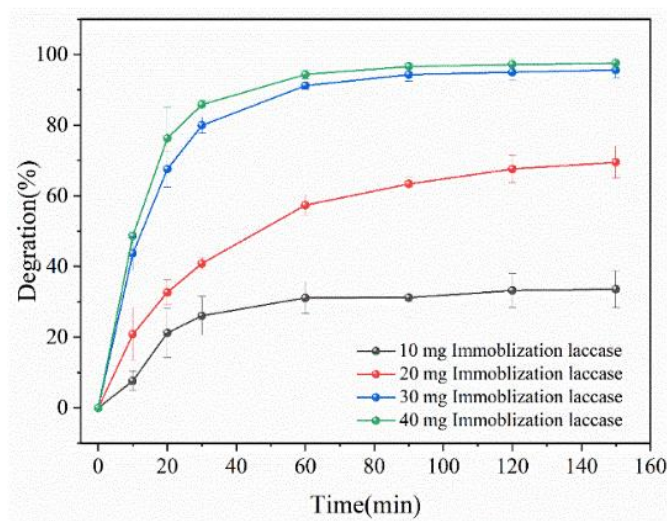


图 3-17 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 投加量对催化降解的影响

Figure 3-17 Effect of the dosage of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ on catalytic degradation

3.3.3.3 ABTS 浓度对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 催化降解的影响

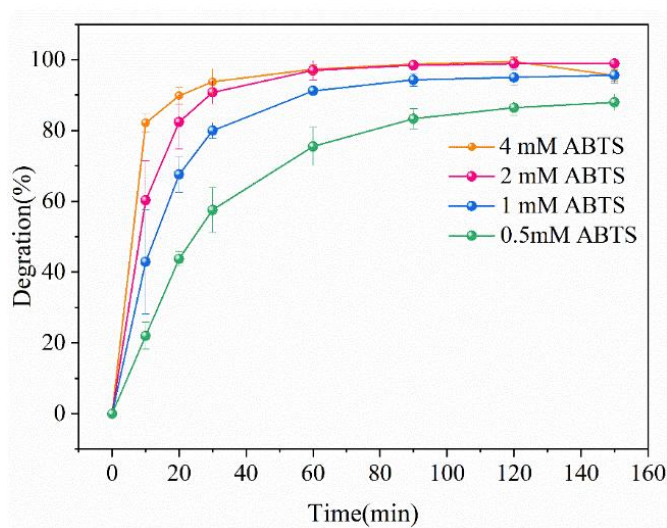


图 3-18 ABTS 浓度对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 催化降解的影响

Figure 3-18 Effect of ABTS concentration on the catalytic degradation of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$

ABTS 不仅可以用作底物，还可以用作增强漆酶催化性能的介质。因此，本研究在 30 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 、pH 5.0、50 mg/L 双酚 A 和不同浓度的 ABTS 的反应体系内，研究 ABTS 浓度对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 催化降解双酚 A 的影响。如

图 3-18 所示, 随着 ABTS 从 0.5 mmol/L 增加到 4 mmol/L, 双酚 A 去除率从 88% 增加到 99.5%, 同时也缩短了降解时间。当 ABTS 浓度过高时, 双酚 A 的去除率会进入平台期。这是因为整个体系的电子转移已达到最大值, 即便继续增加 ABTS, 也无法进一步推动体系中的电子转移^[120]。

3.3.3.4 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 的重复降解双酚 A

$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 可重复使用性是评估其实际应用潜力的重要参数。本研究在 30 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 、pH 5.0、50 mg/L 双酚 A 和 2 mmol/L ABTS 的反应体系内, 研究 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 降解双酚 A 的重复性。如图 3-19 所示, 经过 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 固定化漆酶 10 次循环使用后, 双酚 A 的去除率仍然能达到 72.7%, 这表明 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 对 BPA 的生物降解对其可重用性的重要性。综上所述, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 具有出色的可重复使用性, 可以支持对双酚 A 污染后的废水进行低成本生物修复。

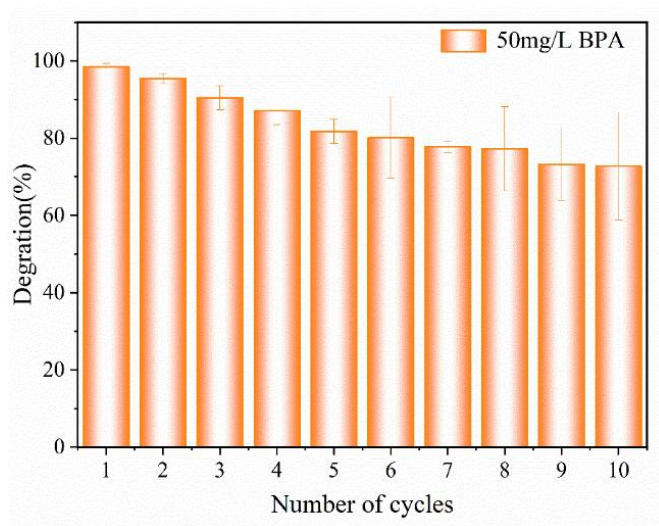


图 3-19 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 降解双酚 A 的重复性

Figure 3-19 The reusability of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ for BPA degradation

3.3.4 不同材料降解双酚 A 的效果对比

表 3-1 比较了各种催化剂的双酚 A 降解效果。结果表明, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 的降解效果与其他文献报道的结果相当, 同时表明其具有出色的可重复使用性, 可以支持对双酚 A 污染后的废水进行低成本生物修复。

表 3-1 双酚 A 降解的比较

Table 3-1 Comparison of BPA degradation

固定化载体	固定化方法	BPA 浓度	去除率	文献
Cu/Fe ₂ O ₄	covalent	50 μ M	99.3%	[121]
		250 μ M	24.9%	
DSY	adsorption	0.5 mM	46%	[122]
DAY			67%	
			(after 10 cycles)	
Cu-alginate gel beads	entrapment	10 mg/L	65%	[123]
			(pH=7,30°C)	
			72%	
			(pH=6,30°C)	
Ca-alginate beads	crosslinking	20 mg/L	99%	[124]
			(pH=5,30°C)	
HHSS	crosslinking	200 mg/L	90%	[125]
			(after 11 cycles)	
Fe ₃ O ₄ /ZIF-8	covalent	50 mg/L	72.7%	This work
			(after 10 cycles)	

3.4 小结

本章成功制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 复合材料, 并采用 Cu^{2+} 螯合法固定漆酶, 考察了游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 的催化性能以及在降解双酚 A 实际应用中的效能表现。具体为:

(1) 采用共沉淀法制备 Fe_3O_4 纳米粒子, 然后向其中加入醋酸锌和二甲基咪唑溶液, 成功制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 复合材料。最后, 加入聚丙烯酰胺和硫酸铜溶液, 采用铜离子螯合的方法固定漆酶, 得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 。

(2) 利用 SEM、TEM、EDS-Mapping、XRD、FT-IR、TGA、M-H 测试手段对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 材料进行了表征分析。

(3) 探究了游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 的热稳定性、耐酸性、有机试剂耐受性、抑制剂耐受性和米氏常数等基础性质测试, 结果显示, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 固定化漆酶各项性能优于游离漆酶, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 表现出高效的催化能力。

(4) 通过氙灯模拟光照对双酚 A 的降解动力学做了系统的研究。通过改变初始双酚 A 浓度、固定化漆酶的投加量、ABTS 浓度来探究 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 对双酚 A 催化降解的影响。实验结果表明, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 对双酚 A 展现出优异的降解性能。最重要的是, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 经过 10 次循环使用降解双酚 A, 去除率仍可以达到 72.7%。

第 4 章 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 的制备及其催化活性研究

苯酚及其衍生物是工业废水中最常见的有机污染物，炼油厂、制造业、农业和石化工业废水中的酚类浓度可达到 $2.8\text{--}6800\text{ mg/L}$ ^[126]。作为工业领域的重要副产品，邻氯苯酚(2-CP)因其高毒性、致癌性和致畸性而被列为典型难降解有机污染物，对人类健康和环境安全构成严重威胁。因此，开发高效的 2-CP 去除技术对环境保护具有重要意义。目前，已有研究表明漆酶介导的生物催化体系可有效降解邻氯苯酚，这为环境治理提供了新思路。

在众多 MOF 中，沸石咪唑酸框架(ZIF-8)作为一种被广泛研究、开发和商业化的材料，以其优异的化学和热稳定性、温和的合成条件和忽略的细胞毒性而闻名，使其成为漆酶固定化的理想候选材料^[127]。以往的许多研究表明，通过适当的改性可以有效提高 MOF 的性能^[128]。用于 MOF 材料改性的主要技术包括表面功能化、缺陷诱导、有机配体改性和金属掺杂。本研究将 Cu^{2+} 掺杂在 ZIF-8 里获得双金属材料。之所以选择 Cu^{2+} 掺杂在 ZIF-8 里面，是因为 Zn 和 Cu 在元素周期表中是相邻的位置，它们具有相似的特性。另外，合成 Cu-ZIF-8 后改性反应中用锌离子取代一些铜离子中心^[129]。Zhang 等人^[130]通过添加 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ，将 Cu^{2+} 锚定在高表面积 of ZIF-8 上，合成 Cu-ZIF-8，并在不同的实验条件下对水中盐酸多西环素(DCH)进行了脱除。

本章首先采用共沉淀法制备出柠檬酸钠修饰的 Fe_3O_4 纳米粒子，然后向其中加入 $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ 和 2-Melm 溶液，成功制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 材料。最后，加入聚丙烯酰胺和硫酸铜溶液，铜离子螯合的方法固定漆酶，得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 。利用 SEM、TEM、EDS、XRD、FT-IR、TGA、M-H 测试手段证明成功制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 材料。同时，通过对游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 进行基本性质(如最适 pH、最适温度、有机溶剂耐受性等)测试，评估 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 的催化能力。结果显示， $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 各项性能优于游离漆酶。 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 复合材料展现出高效的催化性能，为邻氯苯酚的降解提供了一种绿色可持续的处理方案。

4.1 实验试剂及仪器

4.1.1 主要实验试剂

阿拉丁生化科技股份有限公司：六水合氯化铁(99%)、氨水(AR)、柠檬酸钠(98%)、硝酸铜水合物(99.9%)、2-甲基咪唑(98%)、五水硫酸铜(99%)、考马斯亮蓝 G-250(AR)、柠檬酸三钠(98%)、十六烷基硫酸钠(99%、GC)、过硫酸铵(AR)、谷氨酸(AR)、曲拉通 X-100(分子生物级)、L-半胱氨酸(99%)、三乙胺(99%)、异丙醇(99%)、吡啶(AR)。

国药集团化学试剂有限公司：六水合·硝酸锌(AR)、硫酸亚铁(AR)、无水乙醇(AR)、氯化镁(AR)、氯化钾(AR)、氯化锰(AR)、氯化钴(AR)、氯化镍(AR)、氯化钒(AR)、氯化钆(AR)、四氢呋喃(99%)、环己烷(98%)、乙腈(99%)。

麦克林生化科技股份有限公司：聚丙烯酰胺(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%)。

4.1.2 主要实验仪器

L6S 型紫外-可见分光光度计、液相色谱仪(Agess W1100)、扫描电子显微镜(SEM、S-4800)、傅里叶红外光谱(天津港东 FT-IR-850)、Thermo Fisher Scientific Nicolet iS20)、X 射线粉末衍射仪(XRD、Rigaku Smartlab 9KW)、热重分析仪(岛津 DSC-60A)、X 射线光电子能谱仪(赛默飞 Nexsa G2)、超导量子干涉磁测量系统 MPMS-SQUID XL 5。

4.2 实验方案

4.2.1 磁性 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 的制备

4.2.1.1 柠檬酸钠修饰的 Fe_3O_4 纳米粒子的制备

称取 1.4 g 七水合硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)和 1.6 g 六水合三氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)，将其溶解于 40 mL 蒸馏水中。待两种物质完全溶解后，转移至三口烧瓶。向其中缓慢滴加 6 mL 氨水，随后将三口烧瓶置于水浴锅中，升温至 65℃，以 500 r/min 的速度进行机械搅拌，反应持续 1 h。接着，将水浴锅温度升至 90℃，继续搅拌反应 1 h。之后，向三口烧瓶中加入 2.4 g 柠檬酸钠，搅拌 30 min，随后进行磁分离，并使用蒸馏水多次洗涤产物。

4.2.1.2 Fe₃O₄/Cu-ZIF-8 材料的制备

将上述 Fe₃O₄ 分散于 100 mL 蒸馏水中，准确量取 15 mL 转移至三口烧瓶内，将三口烧瓶置于 25°C 的水浴锅中，开启搅拌装置。向其中加入 2.3 g 2-甲基咪唑，持续搅拌 10 min。与此同时，另取 0.3 g 硝酸锌和 0.18 g 硝酸铜，使其完全溶解于 15 mL 蒸馏水中，随后将该溶液缓慢滴加至三口烧瓶内的体系中，继续搅拌 1 h。反应结束后，使用蒸馏水和乙醇交替洗涤产物多次，最后将洗涤后的产物置于 60°C 的环境中干燥。

3.2.1.3 Fe₃O₄/Cu-ZIF-8-Lac 的制备

称取 8 mg 的 Fe₃O₄/Cu-ZIF-8 载体，将其加入到含有 1 mL 浓度为 4 mg/L 的聚丙烯酰胺溶液中，随后将混合液置于 50°C 恒温混匀仪中，充分混匀并反应 2 h。反应结束后，利用磁分离技术进行分离，再使用蒸馏水洗涤一次。接着，向洗涤后的产物中加入 1.5 mL 浓度为 0.2 mol/L 的 CuSO₄ 溶液，再次将其置于 30°C 恒温混匀仪中，混匀并反应 1 h。待反应完成，同样进行磁分离操作，并用蒸馏水洗涤一次。最后，加入 1 mL 经过 10 倍稀释的漆酶，在 30°C 恒温混匀仪中混匀反应 1 h。反应结束后，进行最后一次磁分离，并用蒸馏水洗涤一次。

4.2.2 游离漆酶和 Fe₃O₄/Cu-ZIF-8 固定化漆酶性能研究

4.2.2.1 牛血清蛋白(BSA)标准曲线测试

牛血清蛋白(BSA)标准曲线测试步骤同“3.2.2.1”

4.2.2.2 愈创木酚标准曲线

愈创木酚标准曲线测试步骤同“3.2.2.2”

4.2.2.3 固载量测试

取 10 mg Fe₃O₄/Cu-ZIF-8 载体，加入 1 mL 4 mg/L 聚丙烯酰胺溶液，在 50°C 恒温混匀仪混匀反应 2 小时，反应结束后，磁分离，蒸馏水洗涤一次，加入 1.5 mL 0.2 mol/L CuSO₄ 溶液，在 30°C 恒温混匀仪混匀反应 1 h，反应结束后，磁分离，蒸馏水洗涤一次，加入 1 mL 漆酶(稀释 10 倍)，在 30°C 恒温混匀仪混匀反应 1 h，反应结束后，取 1 mL 固定酶上清液加入 0.1 mL 蒸馏水混合，再加入 5 mL 考马斯亮蓝溶液混匀均匀，染色 5 min，在最大吸收波长为 595 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

4.2.2.4 游离漆酶和固定漆酶的最适 pH 测试

游离漆酶的最适 pH 测试方案如“3.2.2.4”

准备不同 pH 值的醋酸缓冲溶液体系，pH 值分别为 3、3.5、4、4.5、5.0、5.5、6，每个体系的体积为 3.0 mL。取 8 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ ，加入上述不同 pH 值的缓冲溶液体系中，在 50°C 恒温混匀仪中充分混匀，并预热 5 min。取 1 mL 1 mmol/L 愈创木酚溶液(50°C)，快速加入到已预热的混合体系中，磁分离后迅速将样品转移至比色皿中，反应时间为 26 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

4.2.2.5 游离漆酶和固定漆酶的最适温度测试

游离漆酶的最适 pH 测试方案如“3.2.2.5”

准备 3.0 mL pH 值为 5.0 的醋酸缓冲溶液。取 8 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ ，加入到上述缓冲溶液中，充分混合均匀。将混合液分别置于温度为 30°C、35°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C 的恒温混匀仪中，并预热 5 min。向每个温度条件下的混合液中加入 1 mL 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50°C)，磁分离后迅速将样品转移至比色皿，反应时间为 26 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

4.2.2.6 漆酶活性测试

游离漆酶的酶活测试方案如“3.2.2.6”

取 8 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ ，加入至含有 3.0 mL pH 5.0 醋酸缓冲液的容器中，使两者充分混合、分散均匀。随后，将所得混合溶液转移至 50°C 恒温混匀仪中，并预热 5 min。向混合液中加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50°C)，磁分离后迅速转移至比色皿中，反应时间为 26 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

4.2.2.7 游离漆酶和固定漆酶的有机物耐受性测试

取 0.1 mL 游离漆酶，分别转移至多个离心管中。向各离心管内依次加入体积为 0.2 mL、浓度为 10 mM 的不同有机溶剂，所选有机溶剂包括四氢呋喃、异丙醇、三氯甲烷、环己烷、吡啶和乙腈。将添加完试剂的离心管放置于温度设定为 30°C 的恒温混匀仪中，静置孵育 2 h。孵育结束后，向每个离心管内准确加入 2.7 mL pH 5.0 的醋酸缓冲溶液，放入温度为 50°C 的恒温混匀仪中预热 5 min，预热完成后，迅速向各离心管内加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶

液(50°C), 迅速转移至比色皿中, 反应时间为 20 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定, 三组平行实验。

取 8 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$, 分别转移至多个离心管中。向各离心管内依次加入 0.1 mL 蒸馏水和体积为 0.2 mL、浓度为 10 mM 的不同有机溶剂, 所选有机溶剂包括四氢呋喃、异丙醇、三氯甲烷、环己烷、吡啶和乙腈。将添加完试剂的离心管放置于温度设定为 30°C 的恒温混匀仪中, 静置孵育 2 h。孵育结束后, 磁分离, 向每个离心管内准确加入 3.0 mL pH 5.0 的醋酸缓冲溶液, 放入温度为 50°C 的恒温混匀仪中预热 5 min, 预热完成后, 迅速向各离心管内加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50°C), 磁分离后迅速转移至比色皿中, 反应时间为 26 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定, 三组平行实验。

4.2.2.8 游离漆酶和固定漆酶的金属离子耐受性测试

取 0.1 mL 游离酶, 分别转移至多个离心管中。向各离心管内依次加入体积为 0.2 mL、浓度为 10 mM 的不同金属离子溶液, 所选金属离子溶液包括 Li^+ 、 Mn^{3+} 、 Co^{2+} 、 Ni^+ 、 Sm^{3+} 、 V^{4+} 溶液。将添加完试剂的离心管放置于温度为 30°C 的恒温混匀仪中, 静置孵育 2 h。孵育结束后, 向每个离心管内准确加入 2.7 mL pH 5.0 的醋酸缓冲溶液, 放入温度为 50°C 的恒温混匀仪中预热 5 min, 预热完成后, 迅速向各离心管内加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50°C), 迅速转移至比色皿中, 反应时间为 20 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定, 三组平行实验。

取 10 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$, 分别转移至多个离心管中。向各离心管内依次加入 0.1 mL 蒸馏水和体积为 0.2 mL、浓度为 10 mM 的不同金属离子溶液, 所选金属离子溶液包括 Li^+ 、 Mn^{3+} 、 Co^{2+} 、 Ni^+ 、 Sm^{3+} 、 V^{4+} 溶液。将添加完试剂的离心管放置于温度设定为 30°C 的恒温混匀仪中, 静置孵育 2 h。孵育结束后, 磁分离, 向每个离心管内准确加入 3.0 mL pH 5.0 的醋酸缓冲溶液, 放入温度为 50°C 的恒温混匀仪中预热 5 min, 预热完成后, 迅速向各离心管内加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50°C), 磁分离后迅速转移至比色皿中, 反应时间为 26 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定, 三组平行实验。

4.2.2.9 游离漆酶和固定漆酶的热稳定性测试

游离漆酶的热稳定测试方案如“3.2.2.9”

称取 8 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ ，将其置于不同的离心管中，分别加入 0.1 mL 蒸馏水。随后，放入温度为 60°C 的恒温混匀仪中，分别进行 0-10 h 的静置处理。在静置过程中，从第 1 h 开始，每隔 1 h 进行一次取样操作。将离心管从恒温混匀仪中取出，采用磁分离技术去除上清液。随后，向离心管内加入 3.0 mL pH 为 5.0 的醋酸缓冲溶液，再次放入温度为 50°C 的恒温混匀仪中预热 5 min，预热结束后，快速向离心管内加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50°C)。反应时间为 26 s 后，磁分离后迅速转移至比色皿。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

4.2.2.10 游离漆酶和固定漆酶的耐酸性测试

游离漆酶的热稳定测试方案如“3.2.2.9”

称取 8 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ ，将其置于不同的离心管中，分别加入 0.1 mL 蒸馏水。pH 值分别为 3、3.5、4、4.5、5.0、5.5、6 的醋酸缓冲溶液体系中。将混合液置于 30°C 恒温混匀仪中，静置孵育 5 h。将离心管从恒温混匀仪中取出，采用磁分离技术去除上清液。随后，向离心管内加入 3.0 mL pH 为 5.0 的醋酸缓冲溶液，再次放入温度为 50°C 的恒温混匀仪中预热 5 min，预热结束后，快速向离心管内加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50°C)。反应时间为 26 s 后，磁分离后迅速转移至比色皿。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

4.2.2.11 游离漆酶和固定漆酶的抑制剂耐受性测试

取 0.1 mL 游离漆酶，分别转移至多个离心管中。向各离心管内依次加入体积为 0.2 mL、浓度为 10 mM 的不同抑制剂，所选抑制剂包括柠檬酸三钠、谷氨酸、十二烷基硫酸钠、过硫酸铵、曲拉通 X-100、三乙胺溶液。将添加完试剂的离心管放置于温度为 30°C 的恒温混匀仪中，静置孵育 2 h。孵育结束后，向每个离心管内准确加入 2.7 mL pH 5.0 的醋酸缓冲溶液，放入温度为 50°C 的恒温混匀仪中预热 5 min，预热完成后，迅速向各离心管内加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50°C)，迅速转移至比色皿中，反应时间为 20 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

取 8 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ ，分别转移至多个离心管中。向各离心管内依次加入 0.1 mL 蒸馏水和体积为 0.2 mL、浓度为 10 mM 的不同抑制剂，所选抑制剂包括柠檬酸三钠、谷氨酸、十二烷基硫酸钠、过硫酸铵、曲拉通 X-100、三乙胺溶液。将添加完试剂的离心管放置于温度设定为 30°C 的恒温混匀仪中，静置孵育 2 h。孵育结束后，磁分离，向每个离心管内准确加入 3.0 mL pH 5.0 的醋酸缓冲溶液，放入温度为 50°C 的恒温混匀仪中预热 5 min，预热完成后，迅速向各离心管内加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的愈创木酚溶液(50°C)，磁分离后迅速转移至比色皿中，反应时间为 26 s。在最大吸收波长为 465nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

4.2.2.12 固定化漆酶的重复性测试

取 8 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ ，加入 3.0 mL pH 5.0 醋酸缓冲溶液，在 50°C 恒温混匀仪预热 5 min，加入 1 mL 1mmol/L 愈创木酚溶液(50°C)，反应时间为 26 s，在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。以上步骤重复 10 次。

4.2.2.13 米氏常数的测试

游离漆酶的米氏常数测试方案如“3.2.2.13”

取 8 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ ，加入到 3.0 mL pH 5.0 的醋酸缓冲溶液中，使两者充分混合。将混合液转移至 50°C 的恒温混匀仪中并预热 5 min。分别准备浓度为 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mM 且温度为 50°C 的愈创木酚溶液各 1 mL。依次加入 1 mL 不同浓度的愈创木酚溶液，反应时间为 26 s。在最大吸收波长为 465 nm 处对样品进行吸光度测定，三组平行实验。

4.2.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 处理邻氯苯酚的效果研究

4.2.3.1 初始邻氯苯酚浓度对催化降解邻氯苯酚的影响

称取 24 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 置于玻璃瓶中，向其中加入 1 mL 浓度为 1 mmol/L 的 ABTS，以及 50 mL 用 pH=5 醋酸缓冲溶液配制的不同初始浓度(200 mg/L、100 mg/L、50 mg/L、20 mg/L)邻氯苯酚溶液。将玻璃瓶放置在氙灯光源下，开启搅拌装置，使反应体系充分混合并均匀接受光照。在反应过程中，按照设定的不同时间间隔，对反应体系进行磁分离操作。每次磁分离后，准确吸取 1 mL 反应后的邻氯苯酚溶液。采用液相色谱仪对吸取的溶液进行测试，其中

流动相体积比设定为甲醇:水=70:30, 检测波长设置为 265 nm, 流速控制在 1 mL/min, 进样量为 10 μ L。设置三组平行实验。

4.2.3.2 Fe₃O₄/Cu-ZIF-8-Lac 投加量对催化降解邻氯苯酚的影响

称取不同量的 Fe₃O₄/Cu-ZIF-8-Lac (16 mg、24 mg、32 mg、40 mg)置于玻璃瓶中, 向其中加入 1 mL 1 mmol/L ABTS, 以及 50 mL 用 pH=5 醋酸缓冲溶液配制的 50 mg/L 邻氯苯酚溶液。将玻璃瓶放置在氙灯光源下, 开启搅拌装置, 使反应体系充分混合并均匀接受光照。在反应过程中, 按照设定的不同时间间隔, 对反应体系进行磁分离操作。每次磁分离后, 准确吸取 1 mL 反应后的邻氯苯酚溶液。采用液相色谱仪对吸取的溶液进行测试, 其中流动相体积比设定为甲醇:水=70:30, 检测波长设置为 265 nm, 流速控制在 1 mL/min, 进样量为 10 μ L。设置三组平行实验。

4.2.3.3 ABTS 浓度对 Fe₃O₄/Cu-ZIF-8 固定化漆酶催化降解邻氯苯酚的影响

取 24 mg Fe₃O₄/Cu-ZIF-8-Lac 置于玻璃瓶中, 向其中加入 1 mL 不同浓度 ABTS (0.5 mM、1 mM、2 mM、4 mM), 以及 50 mL 用 pH=5 醋酸缓冲溶液配制的 50 mg/L 邻氯苯酚溶液。将玻璃瓶放置在氙灯光源下, 开启搅拌装置, 使反应体系充分混合并均匀接受光照。在反应过程中, 按照设定的不同时间间隔, 对反应体系进行磁分离操作。每次磁分离后, 准确吸取 1 mL 反应后的邻氯苯酚溶液。采用液相色谱仪对吸取的溶液进行测试, 其中流动相体积比设定为甲醇:水=70:30, 检测波长设置为 265 nm, 流速控制在 1 mL/min, 进样量为 10 μ L。设置三组平行实验。

4.2.3.4 Fe₃O₄/Cu-ZIF-8-Lac 的重复降解邻氯苯酚

取 32 mg Fe₃O₄/Cu-ZIF-8-Lac 置于玻璃瓶中, 向其中加入 1 mL 2 mM ABTS, 以及 50 mL 用 pH=5 醋酸缓冲溶液配制的 50 mg/L 邻氯苯酚溶液。将玻璃瓶放置在氙灯光源下, 开启搅拌装置, 使反应体系充分混合并均匀接受光照。搅拌反应 90 min 后磁分离, 准确吸取 1 mL 反应后的邻氯苯酚溶液。采用液相色谱仪对吸取的溶液进行测试, 其中流动相体积比设定为甲醇:水=70:30, 检测波长设置为 265 nm, 流速控制在 1 mL/min, 进样量为 10 μ L。设置三组平行实验。

4.3 结果与讨论

4.3.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 的表征与分析

4.3.1.1 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 的 SEM 和 EDS 表征与分析

图 4-1 对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 样品的形貌和元素进行了表征和描述。如图 4-1(a-c)所示, Fe_3O_4 负载在 Cu-ZIF-8 表面上, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 产物呈十字花状。 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 元素分析, 如图 4-1(d-f)所示。表明成功合成 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 复合材料。

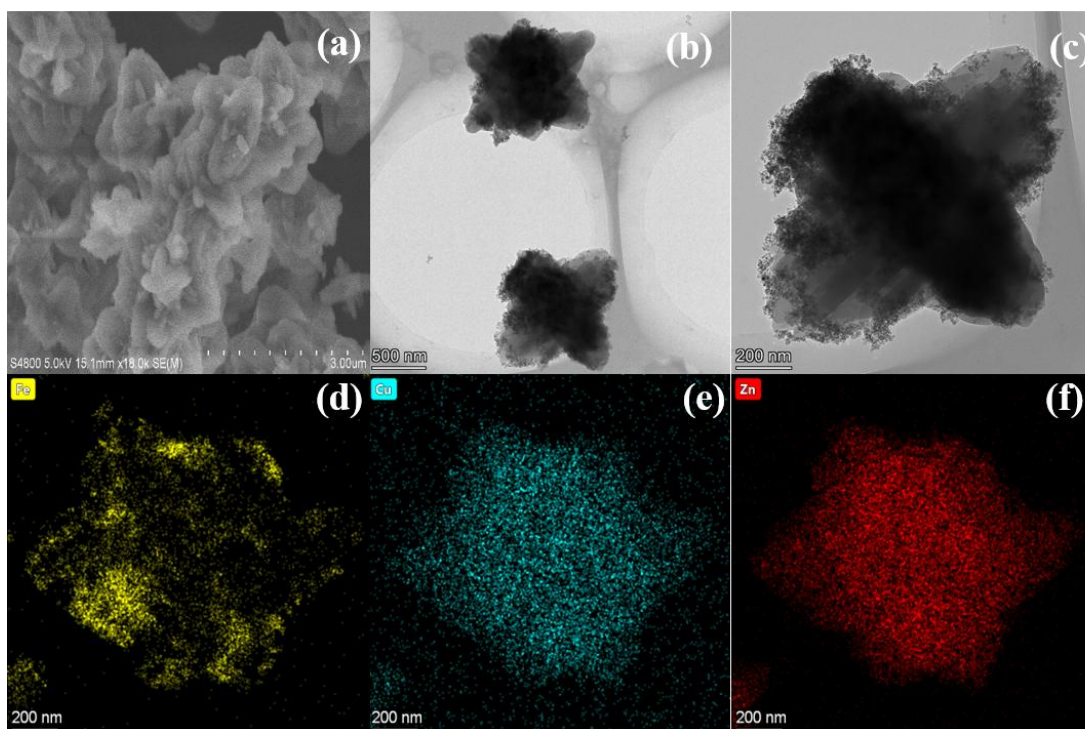
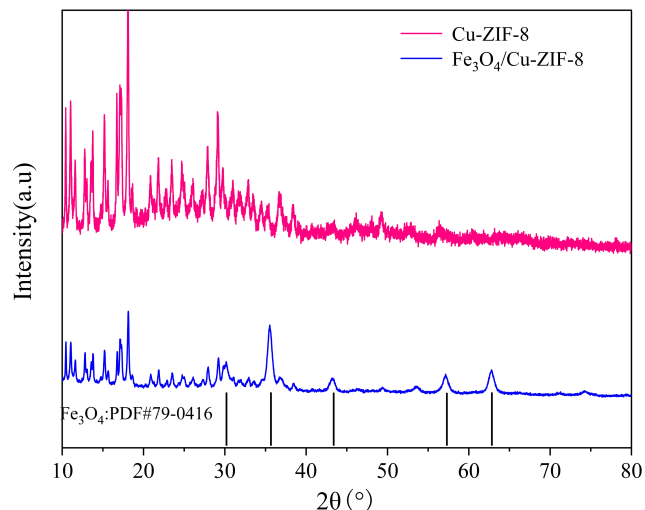


图 4-1 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 的 SEM、TEM、EDS-Mapping 分析图

Figure 4-1 SEM、TEM、EDS-Mapping analysis of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$

4.3.1.2 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 的 XRD 表征与分析

通过 X 射线衍射(XRD)对 Cu-ZIF-8、 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 的晶格结构进行了表征。如图 4-2 所示, Fe_3O_4 的特征峰位于 30.4° 、 35.8° 、 43.4° 、 57.6° 、 62.8° 处, 并且在 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 的 XRD 谱图中也观察到 Fe_3O_4 的特征峰, 与 Fe_3O_4 标准 PDF 卡片(79-0416)相匹配。同时,Cu-ZIF-8 的特征峰在 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 谱图中能够观察到。这表明成功合成 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 复合材料。

图 4-2 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 的 XRD 分析图Figure 4-2 XRD analysis of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$

4.3.1.3 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 的 FT-IR 表征与分析

在 $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ 范围内收集的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-PAM}$ 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 傅里叶变换红外光谱(FTIR)如图 4-3 所示。与图 3-3 相比较可以看出 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 与 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 的 FT-IR 光谱几乎相同。位于 590 cm^{-1} 处的特征峰在 Fe_3O_4 归因于 Fe-O 拉伸振动。在 2922 cm^{-1} 和 3132 cm^{-1} 处观察到的特征峰归因于咪唑环中 C-H 键的弯曲振动。在随后合成的材料的 FT-IR 光谱中也观察到该波段,但它表现出较低的强度和微小的偏移。与 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 相比, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 在该 3600 cm^{-1} 左右区域显示出更强的峰,这与 -OH 基团有关。Cu 掺杂改性后, ZIF-8 的孔结构可能发生变化,因此更多的水分子聚集在 Cu-ZIF-8 的孔中^[131]。 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Laccase}$ 在 1660 cm^{-1} 左右显示出特征性的蛋白质延伸,对应于主要来自 C=O 拉伸模式的酰胺 I。结果表明复合材料中存在漆酶^[132]。

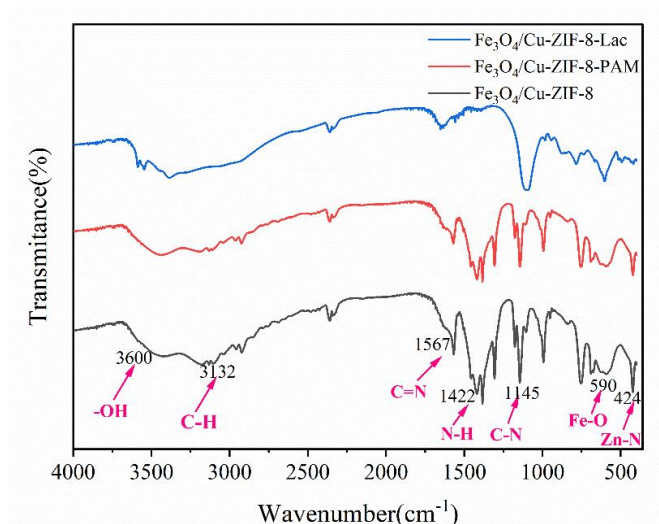


图 4-3 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-PAM}$ 、 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 的 FT-IR 分析图

Figure 4-3 FT-IR analysis of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-PAM}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$

4.3.1.4 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 的 TGA 表征与分析

$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 的相对量是在氮气下使用 TGA 测量的,如图 4-4 所示。温度升高至 510°C 附近后 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 质量不变。 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 在 $25-440^\circ\text{C}$ 范围内质量损失,可分为两个阶段。在 280°C 之前,由于某些溶剂或客体分子的损失,在 280 至 440°C 之间,高温导致 Cu-ZIF-8 的有机框架塌陷和碳化,从而导致质量损失。

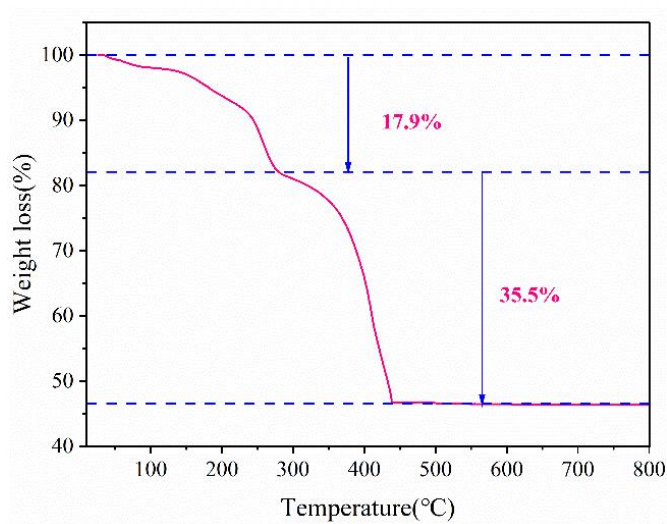


图 4-4 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 的 TGA 分析图

Figure 4-4 TGA analysis of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$

4.3.1.5 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 的 XPS 表征与分析

利用 X 射线光电电子能谱(XPS)对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 的组成进行了表征分析。

$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 结构中 Fe、Cu、O、N、Zn 元素分析如图 3-5 所示。在 710.7 eV、723.7 eV 处的峰分别对应 $\text{Fe } 2p^{3/2}$ 和 $\text{Fe } 2p^{1/2}$ ，证实了 Fe_3O_4 的存在。在 1043.46 eV、1020.45 eV、400.1 eV、952.8 eV 处检测到强峰，归因于 Zn、N、Cu 元素，证实了 Cu-ZIF-8 的存在。N 1s 图谱中，结合能为 398.55 eV、400.1 eV 和 406.22 eV 处的特征峰分别归因于 C-N、Cu-N 或 Zn-N、C=N 基团^[133]。O 1s 图谱中，结合能为 529.7 eV、531.1 eV 和 532.51 eV 处的特征峰分别归因于金属离子基团、N-C=O 和 C=O 基团^[116]。

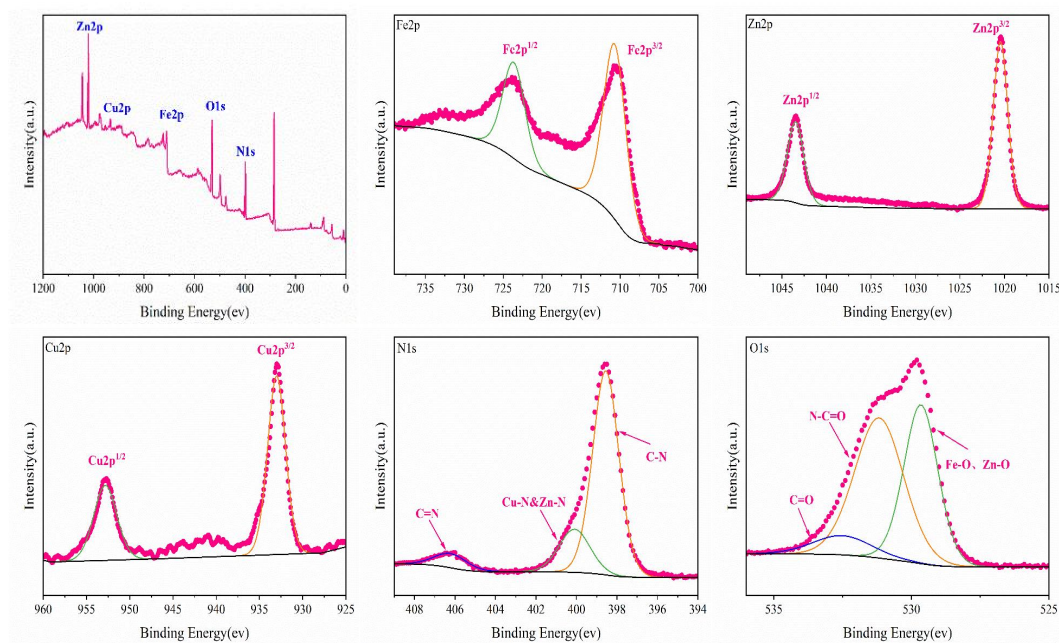
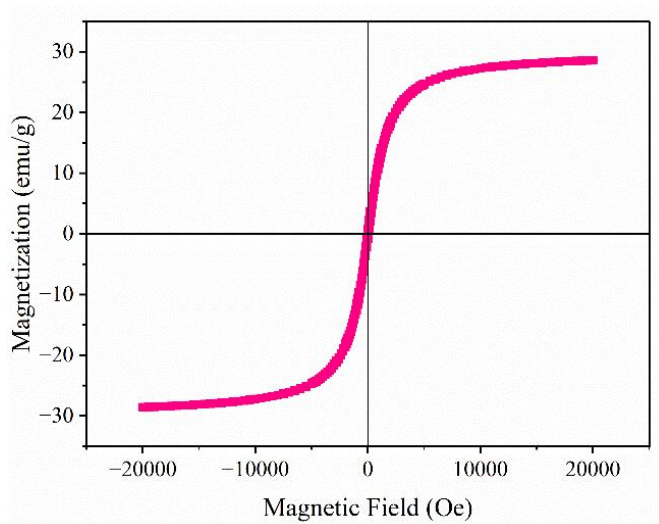


图 4-5 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 的 XPS 分析图

Figure 4-5 XPS analysis of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$

4.3.1.6 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 的磁滞回线表征与分析

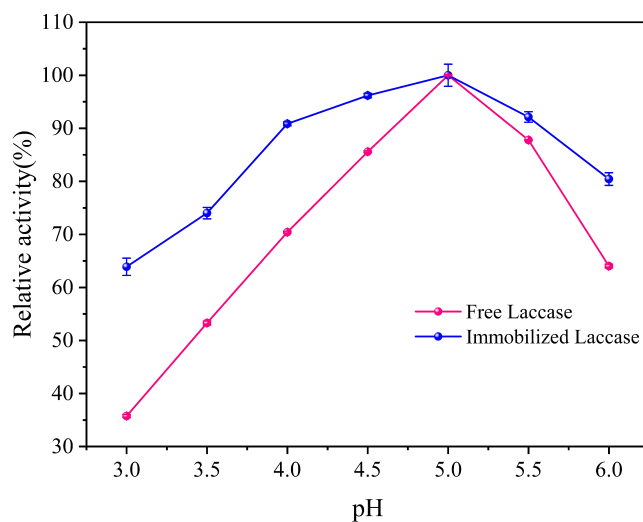
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 的磁滞回线如图 4-6 所示，复合材料表现出超顺磁性。由图可知 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 的饱和磁化强度为 28.6 emu/g。表明 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 仍然表现出足够的磁化强度以进行磁分离。

图 4-6 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 的磁滞回线分析图Figure 4-6 M-H analysis of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$

4.3.2 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 固定化漆酶催化性能研究

4.3.2.1 游离漆酶和固定化漆酶最适 pH 的探究

在 pH 为 3.0-6.0 的范围内, 评估游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 的最适 pH 值, 结果显示最适 pH 均为 5.0, 如图 4-7 所示。当 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 处于 pH=3.0-6.0 反应体系中, 其相对活性高于游离酶。

图 4-7 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 的最适 pHFigure 4-7 Optimum pH for free laccase and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$

4.3.2.2 游离漆酶和固定化漆酶最适温度的探究

将其漆酶置于最适 pH 5.0 环境中, 探究游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 的最适温度。如图 4-8 所示, 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 最适温度均为 50°C 。

各个温度下，固定化漆酶的相对活性高于游离漆酶，表明固定化漆酶具有相对高的耐热性。固定化漆酶耐热性的显著改善可能归因于载体的保护作用^[134]。

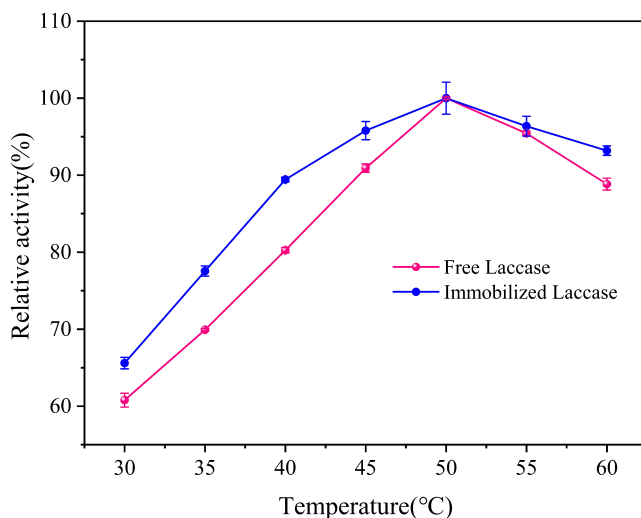


图 4-8 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 的最适温度

Figure 4-8 Optimum temperature for free laccase and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$

4.3.2.3 游离漆酶和固定化漆酶有机物耐受性的探究

将游离酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 置于 THF、IPA、 CHCl_3 、CYH、PY、ACN 溶液中 30°C 静置 2 h，其相对活性如图 4-9 所示。由图可以看出 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 比游离漆酶保留了更高活性。特别是，在 PY 有机试剂中，游离酶损失了大约 30% 的活性，而固定化漆酶仅仅损失了大约 5% 的活性。综上所述， $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 显著提升了漆酶对有机试剂的耐受性。

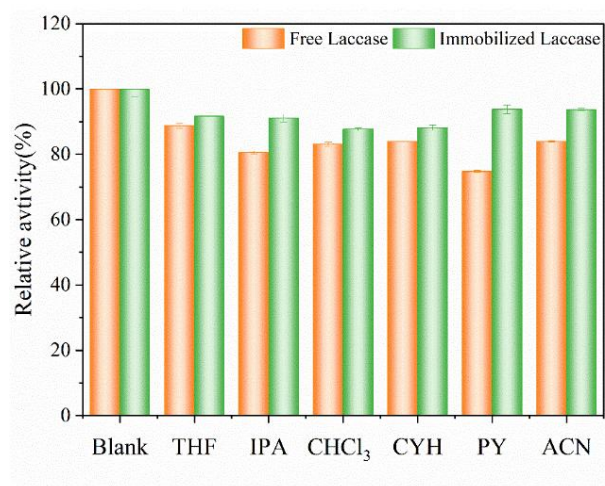


图 4-9 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 的有机物耐受性

Figure 4-9 Organic tolerance of free laccase and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$

4.3.2.4 游离漆酶和固定化漆酶金属离子耐受性的探究

水体中含有大量的盐，会影响漆酶与底物的结合，从而影响漆酶的催化效率。本研究将游离酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 置于 Li^+ 、 Mn^{3+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Sm^{3+} 、 V^{4+} 溶液中 30°C 静置 2 h，游离漆酶和固定化漆酶表现出不同的相对活性。特别是 Sm^{3+} 体系中，游离漆酶损失了大约 40% 的活性，而 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 损失了大约 15% 的活性。表明 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 作为载体既起到保护作用，同时也提高了漆酶在金属离子溶液中的稳定性。

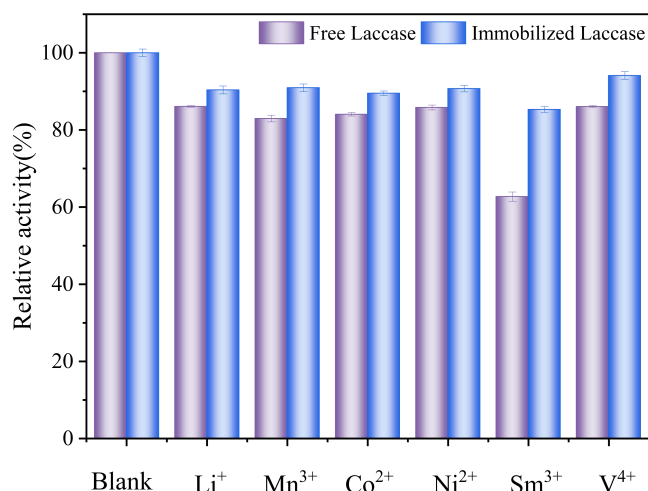
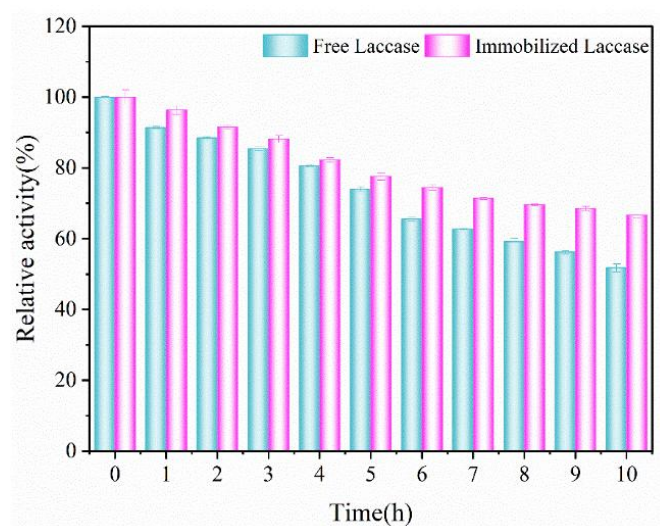


图 4-10 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 的金属离子耐受性

Figure 4-10 Metal ions tolerance of free laccase and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$

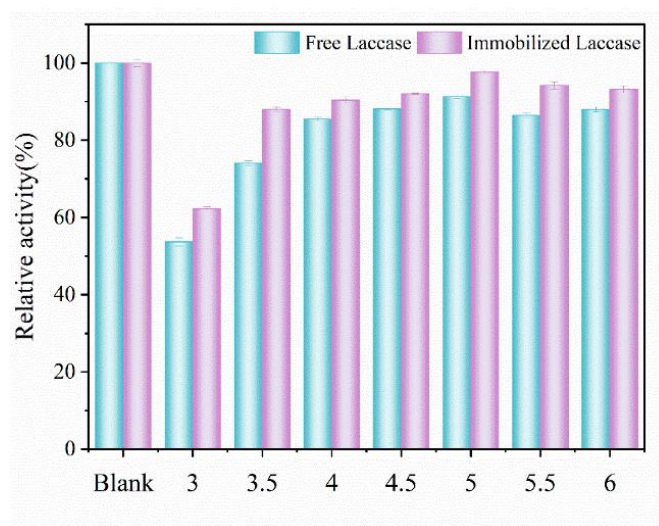
4.3.2.5 游离漆酶和固定化漆酶热稳定的探究

热稳定性是评价漆酶特性重要指标之一。本研究游离酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 置于 60°C 环境中静置 1-10 h 来探究漆酶的热稳定。由图 4-11 可知，静置 10 h 后，游离漆酶损失了大约 50% 的活性，而固定化漆酶损失了大约 30% 的活性。由此可以发现， $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 在高温环境中比游离漆酶更稳定。在高温环境中静置时间过长，极易导致漆酶结构变性。然而，通过 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 载体的保护，加强了整体生物分子结构，从而提高了热稳定性。

图 4-11 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 的热稳定性Figure 4-11 Thermal stability of free laccase and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$

4.3.2.5 游离漆酶和固定化漆酶耐酸性的探究

本研究将游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 置于 pH 3.0-6.0 醋酸缓冲溶液中，实验结果如图 4-12 所示。可以看出，游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 在不同 pH 值的缓冲液中表现出不同的相对活性，因此与游离酶相比，固定化漆酶在酸性条件下活性更高。结果显示 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 为漆酶营造了理想的微环境。

图 4-12 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 的耐酸性Figure 4-12 pH stabilities of free laccase and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$

4.3.2.6 游离漆酶和固定化漆酶抑制剂耐受性的探究

抑制剂能够通过使漆酶结构变性来抑制活性。本研究将游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 置于 Citric acid、Glu、SAS、APS、Triton X-100、TEA 溶液

中 30°C 静置 2 h, 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 的抑制剂耐受性, 结果如图 4-13 所示。由图可以观察到, 在 APS 溶液中, 游离漆酶损失了大约 70% 的活性, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 损失了大约 10%。在 TEA 溶液中, 游离漆酶损失了 85% 的活性, 而固定化漆酶损失了大约 20% 的活性。综上所述, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 具有良好的抑制剂耐受性。

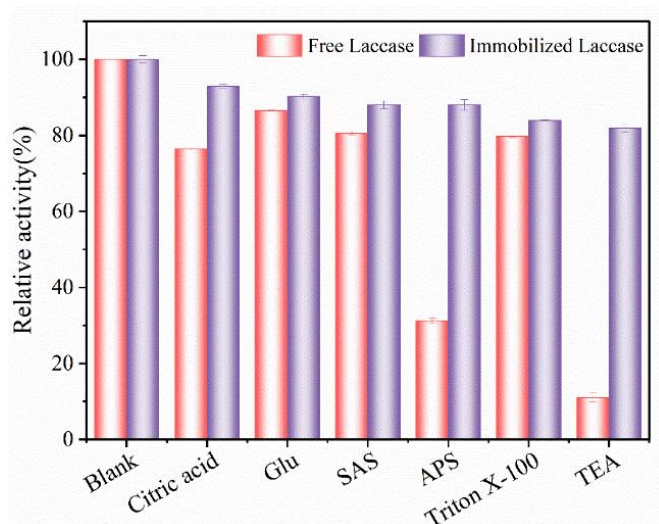


图 4-13 游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 的抑制剂耐受性

Figure 4-13 Inhibitors tolerance of free laccase and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$

4.3.2.7 固定化漆酶的重复使用性的探究

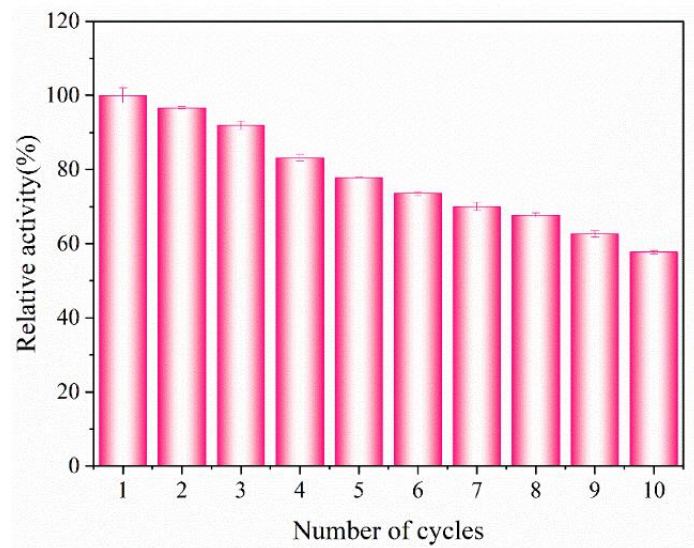


图 4-14 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 的重复使用性

Figure 4-14 Reusability of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$

游离漆酶的主要缺点是它的可重用性差，不能回收利用。固定化有效地克服了游离酶的这一缺点，运行的稳定性对于降低应用成本至关重要，也是固定化的主要目的之一。由图 4-14 可以看出，固定化漆酶的活性随着循环次数的增加而逐渐降低。即使固定化漆酶循环使用 10 次，其相对活性依然保留大约 60% 的相对活性。固定化漆酶活性的降低与重复使用和反复加热过程中的漆酶损失有关。

4.3.2.8 游离漆酶和固定化漆酶米氏常数的探究

动力学参数(K_m , V_{max})是根据其相应的 Lineweaver Burk 图计算得到的，如图 4-15 所示。其中 V 是反应速率， S 是底物浓度， K_m 是米氏常数。 K_m 和 V_{max} 游离酶分别为 0.909 和 2.697， $Fe_3O_4/Cu-ZIF-8-Lac$ 分别为 1.7 和 6.2。显然，与游离酶相比，固定化过程影响了米氏常数的大小，这可能是由分子中发生的一些构象变化。

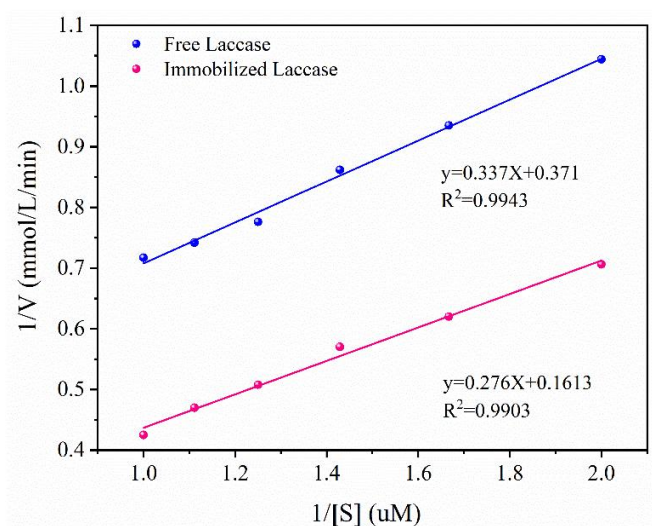


图 4-15 游离漆酶和 $Fe_3O_4/Cu-ZIF-8-Lac$ 的米氏常数方程

Figure 4-15 Michaelis constant of free laccase and $Fe_3O_4/Cu-ZIF-8-Lac$

4.3.3 $Fe_3O_4/Cu-ZIF-8-Lac$ 处理邻氯苯酚的效果研究

4.3.3.1 初始邻氯苯酚浓度对催化降解的影响

在 pH 5.0、1 mmol/L ABTS 和邻氯苯酚初始浓度为 20-200 mg/L 的反应体系内，研究初始浓度对 $Fe_3O_4/Cu-ZIF-8-Lac$ 催化降解邻氯苯酚的影响，如图 4-16 所示。由图可知，当邻氯苯酚浓度为 200 mg/L 时，经过 150 min 催化降解，去除率达到 63%。特别是，当浓度为 50 mg/L 时，在 150 min 时，邻氯苯酚的去

除率达到 95%。然而，当浓度为 20 mg/L 时，邻氯苯酚的去除率下降可能是驱动力低，导致 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 与邻氯苯酚没有更好的接触。

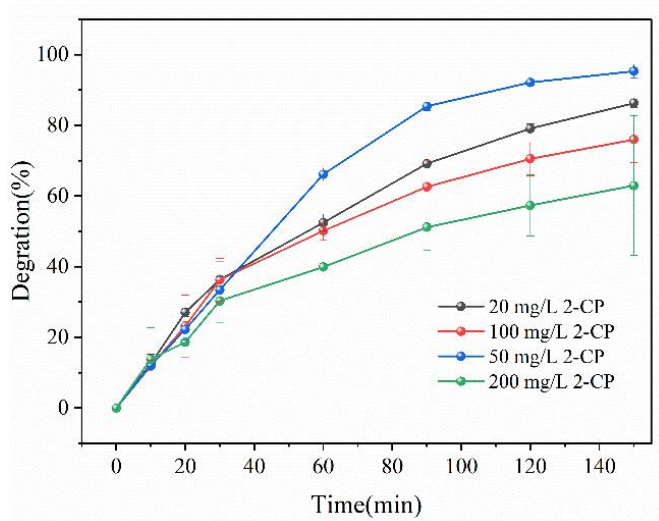


图 4-16 初始 2-CP 浓度对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 催化降解的影响

Figure 4-16 Effect of initial 2-CP concentration on $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ catalytic degradation

4.3.3.2 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 固定化漆酶投加量对催化降解的影响

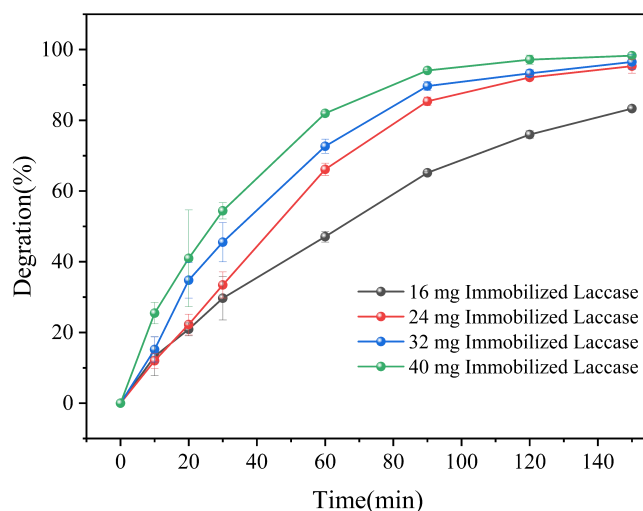


图 4-17 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 投加量对催化降解的影响

Figure 4-17 Effect of the dosage of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ on catalytic degradation

漆酶的浓度是生物催化降解过程的一个重要考虑因素，因为它对双酚 A 的降解有重要影响。在 pH 5.0、1 mmol/L ABTS、50 mg/L 邻氯苯酚和不同质量的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 的反应体系内，研究固定化漆酶投加量对双酚 A 降解的影响，如图 4-17 所示。随着 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 的增加，邻氯苯酚的去除率也随之增加。在 120 min 时间内，随着 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 投加量的增加，邻氯苯酚

的去除率从 76% 增加到 97.2%，可见 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 能够高效去除邻氯苯酚。然而，当 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 的投加量从 24 mg 增加到 40 mg 时，由于加入量过多出现了团聚现象，导致邻氯苯酚的去除率增加幅度较小。

4.3.3.3 ABTS 浓度对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 催化降解的影响

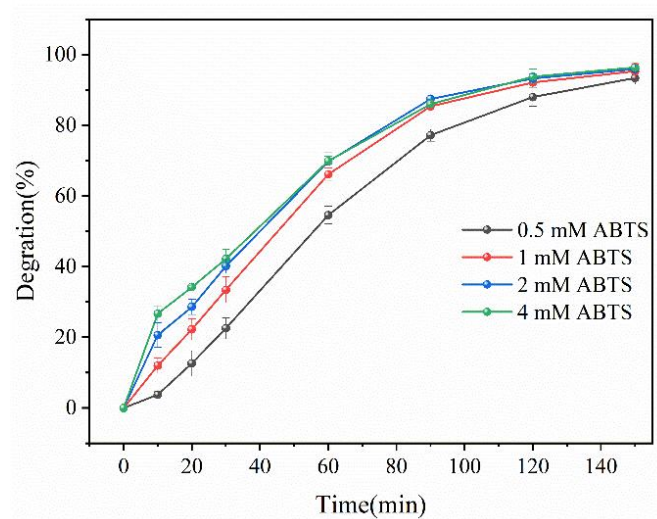


图 4-18 ABTS 浓度对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 催化降解的影响

Figure 4-18 Effect of ABTS concentration on the catalytic degradation of F $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$

ABTS 不仅可以用作底物，还可以用作增强漆酶催化性能的介质。因此，本研究在 24 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 、pH 5.0、50 mg/L 邻氯苯酚和不同浓度的 ABTS 的反应体系内，研究 ABTS 浓度对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 催化降解邻氯苯酚的影响。如图 4-18 所示，随着 ABTS 从 0.5 mmol/L 增加到 4 mmol/L，邻氯苯酚的去除率的变化幅度不明显，但是缩短了降解时间。归因于整个体系的电子转移已达到最大限值，即便继续增加 ABTS 的浓度，也无法进一步推动体系中的电子转移^[120]。

4.3.3.4 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 的重复降解邻氯苯酚

鉴于经济上可行的工业过程，固定化酶的重复使用能力是关键品质之一。本研究在 32 mg $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 、pH 5.0、50 mg/L 邻氯苯酚和 2 mmol/L ABTS 的反应体系内，研究 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 降解邻氯苯酚的重复性。如图 4-19 所示，经过 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 10 次循环使用后，邻氯苯酚的去除率仍然能达到 63.7%。综上所述， $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 在降解邻氯苯酚领域具有出色的可

重复使用性。

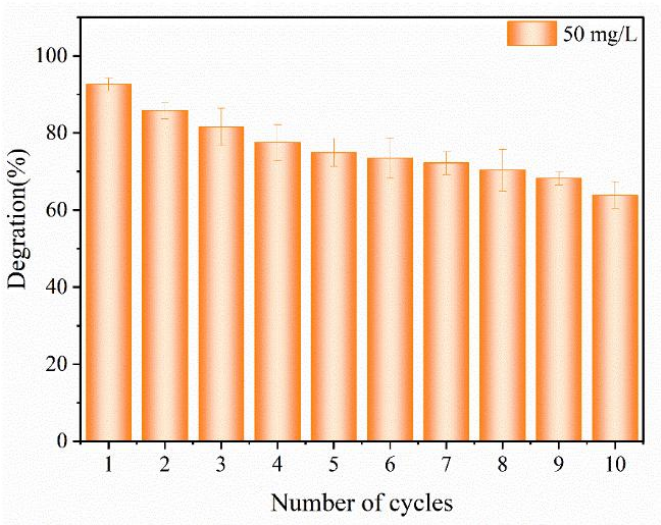


图 4-19 Fe₃O₄/Cu-ZIF-8-Lac 降解邻氯苯酚的重复性

Figure 4-19 The reusability of Fe₃O₄/Cu-ZIF-8-Lac for 2-CP degradation

4.3.4 不同材料降解邻氯苯酚的效果对比

表 4-1 比较了各种催化剂的邻氯苯酚降解效果。结果表明，Fe₃O₄/Cu-ZIF-8-Lac 的降解效果与其他文献报道的结果相当。这一发现表明，Fe₃O₄/Cu-ZIF-8-Lac 对邻氯苯酚具有高效的降解能力和重复性。

表 4-1 邻氯苯酚降解的比较

Table 4-1 Comparison of 2-CP degradation

催化剂种类	邻氯苯酚浓度	去除率	文献
Combined Mycelial Pellets	50 mg/L	92.28%	[135]
Activated Carbon(300°C)	200 ppm	82.2%	[136]
photocatalytic-microbial fuel cell	5 mg/L	76.2%	[137]
BiFeO ₃ /Bi ₂ Fe ₄ O ₉ S-scheme heterojunction	20 mg/L	95%	[138]
Integrated ternary nanocomposite of TiO ₂ /NiO/reduced graphene oxide	100 mg/L	88.4%	[139]
Fe ₃ O ₄ /Cu-ZIF-8-Lac	50 mg/L	95%	This work

4.4 小结

与单金属 MOF 相比，双金属 MOF 具有热力学稳定性强和高化学反应性等特点，可以诱发结构中存在的两种不同金属元素之间的双功能机制或协同效应。鉴于此理论，在第三章的基础上，本章选用 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 为固定化漆酶的载体。具体为：

(1) 采用共沉淀法制备 Fe_3O_4 纳米粒子，然后向其中加入醋酸锌、硝酸铜和二甲基咪唑溶液，成功制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 复合材料。最后，加入聚丙烯酰胺和硫酸铜溶液，采用 Cu^{2+} 螯合的方法固定漆酶，得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 。

(2) 通过各项测试手段对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 材料进行了表征分析，其中包括 SEM、EDS-Mapping、XRD、FT-IR、TGA、TEM、M-H。

(3) 探究了游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 的抑制剂耐受性、耐酸性、有机试剂耐受性、金属离子耐受性和米氏常数等基础性质测试。

(4) 通过氙灯模拟光照对邻氯苯酚的降解动力学做了系统的研究。通过改变初始邻氯苯酚的浓度、固定化漆酶的投加量、ABTS 浓度来探究 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 对邻氯苯酚催化降解的影响。结果显示，经过 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 10 次循环使用后，邻氯苯酚的去除率仍然能达到 63.7%。 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 对邻氯苯酚具有高效的降解能力和重复性。

总结与展望

漆酶是一种广泛使用的酶，因为它能够高效、环保地去除环境中的染料和其他污染物，以及分解各种耐药性芳香族化合物。但因其低稳定性和不可回收性限制了其应用。MOF 是由有机配体和金属离子连接而成的晶体结构，具有良好的可修饰性、高比表面积、可调节的孔径和较大的内部孔体积。由于这些优点，MOF 代表了固定化漆酶载体的新选择。具体的：

(1)首先采用共沉淀法制备出巯基丙酸修饰的 Fe_3O_4 纳米粒子，然后向其中加入硝酸铜和均苯三甲酸溶液，成功制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 材料。随后将其放入管式炉在在氩气气氛中对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 进行热处理。以 $2^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速度升温至 260°C ，保持 6 h，得到加热的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 。然后使用 EDC/NHS 活化表面的羧基，加入漆酶后成功制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 。利用 SEM、XRD、FT-IR、BET、M-H 测试手段表征分析了加热后的 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ 。然后，对游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 进行最适 pH、最适温度和金属离子耐受性等测试。同时，将 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu}_3(\text{BTC})_2\text{-Lac}$ 用于降解染料及染料废水。

(2)采用共沉淀法制备出柠檬酸钠修饰的 Fe_3O_4 纳米粒子，然后向其中加入 $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 2-Melm 溶液，成功制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 材料。加入聚丙烯酰胺和硫酸铜溶液，采用铜离子螯合的方法固定漆酶，得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 固定化漆酶。利用 SEM、TEM、EDS-Mapping、XRD、FT-IR、TGA、M-H 测试手段对 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8}$ 材料进行了表征分析。同时，对游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 进行基本性质(如最适 pH、最适温度、金属离子耐受性等)测试，结果显示， $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 各项性能优于游离漆酶。 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZIF-8-Lac}$ 高效的催化能力，为双酚 A 的降解提供了一种绿色环保的处理方案。

(3)采用共沉淀法制备出柠檬酸钠修饰的 Fe_3O_4 纳米粒子，然后向其中加入醋酸锌、硝酸铜和二甲基咪唑溶液，成功制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 材料。加入聚丙烯酰胺和硫酸铜溶液，铜离子螯合的方法固定漆酶，得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 。利用 SEM、EDS、XRD、FT-IR、TGA 测试手段证明成功制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8}$ 材料。同时，通过对游离漆酶和 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 进行基本性质(如最适 pH、最适温度、有机溶剂耐受性等)测试，评估 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 的催化能力。结

果显示, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 各项性能优于游离漆酶。 $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Cu-ZIF-8-Lac}$ 高效的催化能力, 为邻氯苯酚的降解提供了一种绿色环保的处理方案。

污染物对环境具有巨大的破坏性影响。它们可能会对水生生物、人类健康和环境造成许多急性和长期影响(即内分泌功能中断、免疫毒性、神经系统疾病、癌症等)。本文制备了有效、稳定且可重复使用的漆酶生物催化剂, 在污染物处理方面表现出巨大的潜力。漆酶介导的过程不仅符合绿色化学原则, 还促进了废水处理技术的进步, 为环境保护和公共卫生安全做出巨大贡献。

参考文献

- [1] COPETE, CHANAGá, BARRIUSO, et al. Identification and characterization of laccase-type multicopper oxidases involved in dye-decolorization by the fungus *Leptosphaerulina* sp [J]. BMC Biotechnology, 2015, 15(1).
- [2] YOSHIDA. LXIII.—Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio [J]. J Chem Soc, Trans, 1883, 43(0): 472-86.
- [3] BERTRAND. Sur la presence simultanee de la laccase et de latyrosinase dans le suc de quelques champignons [J]. CR Hebd Seances Acad Sci, 1896, 123: 463-5.
- [4] MAYER. Laccase: new functions for an old enzyme [J]. Phytochemistry, 2002, 60(6): 551-65.
- [5] CLAUS. Laccases and their occurrence in prokaryotes [J]. Archives of Microbiology, 2003, 179(3): 145-50.
- [6] DWIVEDI, SINGH, PANDEY, et al. Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2011, 68(2): 117-28.
- [7] ANDRIANI, AGUSTRIANA, PERWITASARI, et al. High melanin degradation by laccase from a novel isolated white rot fungi *Trametes polyzona* 023 in the presence of phenolic compounds [J]. Bioresource Technology Reports, 2024, 27.
- [8] DESCHENES, LIU, CHENG, et al. Overexpression of a Novel Thermostable and chloride-tolerant laccase from *thermus thermophilus* SG0.5JP17-16 in *Pichia pastoris* and its application in synthetic dye decolorization [J]. Plos One, 2015, 10(3): e0119833.
- [9] MCMAHON, DOYLE, BROOKS, et al. Biochemical characterisation of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium *Pseudomonas putida* F6 [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40(5): 1435-41.
- [10] PEZZELLA, GUARINO, PISCITELLI. How to enjoy laccases [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2015, 72(5): 923-40.
- [11] SHRADDHA, SHEKHER, SEHGAL, et al. Laccase: Microbial Sources,

- Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications [J]. Enzyme Research, 2011, 2011: 1-11.
- [12] JONES, SOLOMON. Electron transfer and reaction mechanism of laccases [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2015, 72(5): 869-83.
- [13] GOCHEV1, KRASTANOV2. Fungal Laccases [J]. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 2007, 13: 75-80.
- [14] PARASCHIV, FERDES, IONESCU, et al. Laccases—Versatile Enzymes Used to Reduce Environmental Pollution [J]. Energies, 2022, 15(5).
- [15] BOURBONNAIS, PAICE. Oxidation of non - phenolic substrates [J]. FEBS Letters, 2001, 267(1): 99-102.
- [16] BA, VINOTH KUMAR. Recent developments in the use of tyrosinase and laccase in environmental applications [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2017, 37(7): 819-32.
- [17] SITARZ, MIKKELSEN, MEYER. Structure, functionality and tuning up of laccases for lignocellulose and other industrial applications [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2015, 36(1): 70-86.
- [18] VALLECILLOS, SADEF, BORRULL, et al. Degradation of synthetic fragrances by laccase-mediated system [J]. Journal of Hazardous Materials, 2017, 334: 233-43.
- [19] MARTIN, MOEDER, DANIEL, et al. Biotransformation of the polycyclic musks HHCB and AHTN and metabolite formation by fungi occurring in freshwater environments [J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41(15): 5395-402.
- [20] HIMANSHU, CHAMOLI, SINGH, et al. Purification and characterization of laccase from ganoderma lucidum and its application in decolorization of malachite green dye [J]. Bioresource Technology Reports, 2023, 21:101368.
- [21] YANG, LI, NG, et al. Laccases: production, expression regulation, and applications in pharmaceutical biodegradation [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8:832.

- [22] CAMARERO, IBARRA, MARTÍNEZ, et al. Lignin-Derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(4): 1775-84.
- [23] RAHMAN, ULLAH, SHAH, et al. Harnessing the power of bacterial laccases for xenobiotic degradation in water: A 10-year overview [J]. *Science of The Total Environment*, 2024, 918: 170498.
- [24] GONCALVES, KIECKBUSCH, PERNA, et al. Trends on enzyme immobilization researches based on bibliometric analysis [J]. *Process Biochemistry*, 2019, 76: 95-110.
- [25] ZHU, KASKEL, SHI, et al. Immobilization of trametes versicolor laccase on magnetically separable mesoporous silica spheres [J]. *Chemistry of Materials*, 2007, 19(26): 6408-13.
- [26] SHELDON, VAN PELT. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how [J]. *Chem Soc Rev*, 2013, 42(15): 6223-35.
- [27] LIU, CHEN, SHI. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization [J]. *TRAC Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 102: 332-42.
- [28] GU, YUAN, JIA, et al. Recent developments of a co-immobilized laccase–mediator system: a review [J]. *RSC Advances*, 2021, 11(47): 29498-506.
- [29] ASLAM, ASGHER, KHAN, et al. Immobilization of pleurotus nebrodensis WC 850 laccase on glutaraldehyde cross-linked chitosan beads for enhanced biocatalytic degradation of textile dyes [J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2021, 40:101971.
- [30] YUE, WANG, ZHANG, et al. Construction of immobilized laccase system based on ZnO and degradation of mesotrione [J]. *Toxics*, 2024, 12(6):434.
- [31] MAZUR, KRYSIŃSKI, MICHOTA-KAMIŃSKA, et al. Immobilization of laccase on gold, silver and indium tin oxide by zirconium–phosphonate–carboxylate (ZPC) coordination chemistry [J]. *Bioelectrochemistry*, 2007, 71(1): 15-22.

- [32] LONG, LI, LIU, et al. Immobilization of laccase by alkali-etched bimetallic CoCu-MOF to enhance enzyme loading and congo red degradation [J]. *Langmuir*, 2023, 39(24): 8404-13.
- [33] RATANAPONGLEKA, PUNBUT. Removal of acetaminophen in water by laccase immobilized in barium alginate [J]. *Environmental Technology*, 2017, 39(3): 336-45.
- [34] ZHANG, ZHANG, WANG, et al. Functionalized chitosan and alginate composite hydrogel-immobilized laccase with sustainable biocatalysts for the effective removal of organic pollutant bisphenol A [J]. *Catalysts*, 2024, 14(5):304.
- [35] XIN, ZHANG, YANG, et al. Preparation and electrochemical sensing application of electrospun porous organosilica fibers [J]. *Electrochemistry Communications*, 2014, 48: 123-6.
- [36] SIRO, PLACKETT. Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review [J]. *Cellulose*, 2010, 17(3): 459-94.
- [37] CHEN, ZHOU, LIU, et al. Performance and kinetic of pesticide residues removal by microporous starch immobilized laccase in a combined adsorption and biotransformation process [J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2021, 21: 101235.
- [38] ZDARTA, MEYER, JESIONOWSKI, et al. Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases: A comprehensive review [J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2018, 258: 1-20.
- [39] RATHER, KHAN, WANI, et al. Overview on immobilization of enzymes on synthetic polymeric nanofibers fabricated by electrospinning [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 119(1): 9-33.
- [40] DARONCH, KELBERT, PEREIRA, et al. Elucidating the choice for a precise matrix for laccase immobilization: A review [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2020, 397: 125506.
- [41] ZUCCA, SANJUST. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms [J]. *Molecules*, 2014, 19(9): 14139-94.

-
- [42] WANG, GUO, YANG, et al. Magnetic mesoporous silica nanoparticles: Fabrication and their laccase immobilization performance [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(23): 8931-5.
- [43] AMERI, FARAMARZI, TARIGHI, et al. Removal of dyes by *Trametes versicolor* laccase immobilized on NaY-zeolite [J]. *Chemical Engineering Research and Design*, 2023, 197: 240-53.
- [44] THAPA, LIU, WANG. Nucleic acid-based electrochemical biosensor: Recent advances in probe immobilization and signal amplification strategies [J]. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2021, 14(1): e1765.
- [45] YU, FENG, ABBAS, et al. Enhancing enzymatic catalysis efficiency: Immobilizing laccase on HHSS for synergistic bisphenol A adsorption and biodegradation through optimized external surface utilization [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 278:134586.
- [46] SUMITHA, XAVIER. Recent advances in electrochemical biosensors - A brief review [J]. *Hybrid Advances*, 2023, 2:100023.
- [47] HUANG, ZHANG, GAN, et al. Laccase immobilization with metal-organic frameworks: Current status, remaining challenges and future perspectives [J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2020, 52(8): 1282-324.
- [48] WANG, ASTRUC. State of the Art and Prospects in Metal–Organic Framework (MOF)-Based and MOF-Derived Nanocatalysis [J]. *Chemical Reviews*, 2019, 120(2): 1438-511.
- [49] LI, CAO, ZHANG, et al. Enhanced adsorptive removal of anionic and cationic dyes from single or mixed dye solutions using MOF PCN-222 [J]. *RSC Advances*, 2017, 7(27): 16273-81.
- [50] JANG, YU, LEE, et al. Sonochemical synthesis of rho-ZMOF catalyst for an enhanced CO₂ cycloaddition reaction [J]. *Materials Letters*, 2020, 277: 128387.
- [51] WANG, YU, LU, et al. Facile Synthesis of Metal–Organic Framework ZIF-67 via a multi-inlet vortex mixer using various solvents: MeOH, EtOH, H₂O, and

- Baijiu [J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2022, 61(23): 7952-61.
- [52] CHENG, MAO, GUO, et al. Synergistic and efficient catalysis over brønsted acidic ionic liquid [BSO₃HMIIm][HSO₄]-modified metal-organic framework (IRMOF-3) for microalgal biodiesel production [J]. *Fuel*, 2022, 322:124217.
- [53] LI, YAO, WANG. Incorporating Fe-O cluster in multivariate (MTV) metal-organic frameworks for promoting visible-light photo-fenton degradation of micropollutants from water [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2022, 446:137446.
- [54] DEL RIO, VILLAR, QUESADA, et al. Silver-functionalized UiO-66 metal-organic framework-coated 3D printed device for the removal of radioactive iodine from wastewaters [J]. *Applied Materials Today*, 2021, 24: 101130.
- [55] HUMAYUN, HE, FENG, et al. Enhanced photocatalytic performance of novel MIL53Sr metal-organic framework (MOF) for RhB dye degradation and H₂ evolution by coupling MIL53Fe [J]. *Solar Energy*, 2021, 215: 121-30.
- [56] CUI, ZHAO, YAN, et al. Outstanding drug-loading/release capacity of hollow Fe-Metal-Organic framework-based microcapsules: A potential multifunctional drug-delivery platform [J]. *Inorganic Chemistry*, 2021, 60(3): 1664-71.
- [57] WANG, WU, SUN, et al. A novel pH-responsive Fe-MOF system for enhanced cancer treatment mediated by the fenton reaction [J]. *New Journal of Chemistry*, 2021, 45(6): 3271-9.
- [58] ALSHORIFI, EL DAFRAWY, AHMED. Fe/Co-MOF Nanocatalysts: Greener chemistry approach for the removal of toxic metals and catalytic applications [J]. *ACS Omega*, 2022, 7(27): 23421-44.
- [59] BAI, DOU, XIE, et al. Zr-based metal-organic frameworks: design, synthesis, structure, and applications [J]. *Chemical Society Reviews*, 2016, 45(8): 2327-67.
- [60] GIMENO-FONQUERNIE, LIANG, ALBALAD, et al. Templated synthesis of zirconium(iv)-based metal-organic layers (MOLs) with accessible chelating sites [J]. *Chemical Communications*, 2022, 58(7): 957-60.
- [61] MILAKIN, GUPTA, KOBERA, et al. Effect of a Zr-Based Metal-Organic

- p>framework structure on the properties of its composite with polyaniline [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2023, 15(19): 23813-23.
- [62] WU, LI, WANG, et al. Highly stable Ni-MOF comprising triphenylamine moieties as a high-performance redox indicator for sensitive aptasensor construction [J]. Analytica Chimica Acta, 2019, 1049: 74-81.
- [63] SHEKHAH, HIRAI, WANG, et al. MOF-on-MOF heteroepitaxy: Perfectly oriented $[Zn_2(ndc)_2(dabco)]_n$ grown on $[Cu_2(ndc)_2(dabco)]_n$ thin films [J]. Dalton Transactions, 2011, 40(18): 4954-4958.
- [64] LI, CHEN, WANG, et al. Hierarchically engineered mesoporous metal-organic frameworks toward cell-free immobilized enzyme systems [J]. Chem, 2018, 4(5): 1022-34.
- [65] SU, YAO, WANG, et al. Metal-organic frameworks for removing emerging organic pollutants: A review [J]. Journal of water process engineering, 2025, 70: 107096.
- [66] YANG, YUAN, ZOU, et al. One-step synthesis of hybrid core - shell metal - organic frameworks [J]. Angewandte Chemie, 2018, 130(15): 3991-6.
- [67] CAO, XIAO, LIU, et al. Synthesis of Yolk/Shell heterostructures MOF@MOF as biomimetic sensing platform for catechol detection [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2021, 329: 129133.
- [68] WANG, TANG, YE, et al. Laccase immobilization and its degradation of emerging pollutants: A comprehensive review [J]. Journal of Environmental Management, 2024, 359: 120984.
- [69] ZHANG, YUWEN, PENG, et al. Parameters affecting the performance of immobilized enzyme [J]. Journal of Chemistry, 2013, 2013(1): 946248.
- [70] TALBERT, GODDARD. Enzymes on material surfaces [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2012, 93: 8-19.
- [71] JIA, CHEN, LUO, et al. Immobilization of laccase onto meso-MIL-53(Al) via physical adsorption for the catalytic conversion of triclosan [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 184:109670.

- [72] RODRIGUES, BERENGUER-MURCIA, CARBALLARES, et al. Stabilization of enzymes via immobilization: Multipoint covalent attachment and other stabilization strategies [J]. *Biotechnology Advances*, 2021, 52:107821.
- [73] LIANG, WU, XIONG, et al. Metal-organic frameworks as novel matrices for efficient enzyme immobilization: An update review [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2020, 406:213149.
- [74] QIU, CHEN, WANG, et al. Recent advances in the rational synthesis and sensing applications of metal-organic framework biocomposites [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2019, 387: 60-78.
- [75] LI, SHI, DONG, et al. Co-Immobilization of laccase and mediator into Fe-Doped ZIF-8 significantly enhances the degradation of organic pollutants [J]. *Molecules*, 2024, 29(2):307.
- [76] YE, KOU, SHEN, et al. Metal-Organic Frameworks: A new platform for enzyme immobilization [J]. *ChemBioChem*, 2020, 21(18): 2585-90.
- [77] YANG, CHEN, WANG, et al. Co-immobilizing laccase-mediator system by in-situ synthesis of MOF in PVA hydrogels for enhanced laccase stability and dye decolorization efficiency [J]. *Journal of Environmental Management*, 2024, 353:120114.
- [78] LEE, LIN, MOU. Mesoporous materials for encapsulating enzymes [J]. *Nano Today*, 2009, 4(2): 165-79.
- [79] CUI, REN, SUN, et al. Optimization protocols and improved strategies for metal-organic frameworks for immobilizing enzymes: Current development and future challenges [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2018, 370: 22-41.
- [80] YANG, ZHAO, CAVACO-PAULO, et al. Encapsulated laccase in bimetallic Cu/Zn ZIFs as stable and reusable biocatalyst for decolorization of dye wastewater [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 233:123410.
- [81] KUANG, WANG, BILAL, et al. Metal-Organic Frameworks: A potential platform from enzyme immobilization to mimetic enzyme [J]. *Aggregate*,

2024,6(3): e724.

- [82] FENG, ZHAO, GE. Impact of the size effect on enzymatic electrochemical detection based on metal-organic frameworks [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1149:238191.
- [83] XU, JIAO, WU, et al. Metal–Organic frameworks enhance biomimetic cascade catalysis for biosensing [J]. *Advanced Materials*, 2021, 33(22):2005172.
- [84] HAN, FAN, YU, et al. Metal-organic frameworks (MOFs): A novel platform for laccase immobilization and application [J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2022, 10(6):108795.
- [85] TKACZYK, MITROWSKA, POSYNIAK. Synthetic organic dyes as contaminants of the aquatic environment and their implications for ecosystems: A review [J]. *Science of The Total Environment*, 2020, 717:137222.
- [86] JIANG, REN, WANG, et al. Improved stability and promoted activity of laccase by One-pot encapsulation with Cu (PABA) nanoarchitectonics and its application for removal of azo dyes [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2022, 234:113366.
- [87] ZHANG, LI, LIN, et al. Cell-free hemoglobin and hemin catalyzing triclosan oxidative coupling in plasma: A novel exogenous phenolic pollutants coupling pathway [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2024, 282:116708.
- [88] CHEN, OH, YAP. Recent advances in the utilization of immobilized laccase for the degradation of phenolic compounds in aqueous solutions: A review [J]. *Chemosphere*, 2022, 307:135824.
- [89] WANG, JIN, LI, et al. A green biocatalyst fabricated by fungal laccase immobilized onto Fe₃O₄@polyaniline-chitosan nanofibrous composites for the removal of phenolic compounds [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2025, 507:160486.
- [90] RODRÍGUEZ-DELGADO, ALEMÁN-NAVA, RODRÍGUEZ-DELGADO, et al. Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2015, 74: 21-45.

-
- [91] ALVARADO-RAMÍREZ, ROSTRO-ALANIS, RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, et al. Enzyme (Single and Multiple) and Nanozyme Biosensors: Recent developments and their novel applications in the Water-Food-Health nexus [J]. *Biosensors*, 2021, 11(11):410.
- [92] RABIEE. Wearable MOF biosensors: A new frontier in real-time health monitoring [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2025, 184: 118156.
- [93] MALINOWSKI, WARDAK, WARDAK. Effect of modification of a laccase-based electrochemical biosensor with carbon nanotubes on signal separation of dihydroxybenzene Isomers [J]. *Langmuir*, 2024,40(7): 3472-3485.
- [94] AHMAD, PAL, WASEEM, et al. Catalytic insights into laccase for sustainable remediation of multifaceted pharmaceutically active micropollutants from water matrices: A state-of-art review [J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2025, 70: 106901.
- [95] BILAL, RASHEED, NABEEL, et al. Hazardous contaminants in the environment and their laccase-assisted degradation – A review [J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 234: 253-64.
- [96] LITWIŃSKA. Characterization of recombinant laccase from *Trametes versicolor* synthesized by *Arxula adeninivorans* and its application in the degradation of pharmaceuticals [J]. *AMB Expr* 9, 2019: 102.
- [97] KUNAMNENI, CAMARERO, GARCÍA-BURGOS, et al. Engineering and applications of fungal laccases for organic synthesis [J]. *Microbial Cell Factories*, 2008, 7(1):1-17.
- [98] FABRIZI DE BIANI, CORSINI, POGNI, et al. Practical applications of copper-based enzymes: synthesis of sulfonated polyaniline through laccase-catalyzed oxidation [J]. *Frontiers in Chemistry*, 2024, 12: 1412242.
- [99] VARADHARAJ, RAMESH, KUMAR, 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): 9525-36.

- [100] BHATTACHARJEE, SHAIKH, AHN. Heterogeneous Aza-Michael Addition Reaction by the Copper-Based Metal–Organic Framework (CuBTC) [J]. Catalysis Letters, 2020, 151(7): 2011-8.
- [101] LI, CHEN, ZHANG, et al. Water stability and competition effects toward CO₂ adsorption on metal organic frameworks [J]. Separation & Purification Reviews, 2014, 44(1): 19-27.
- [102] SUN, MA, TANG, et al. Graphene modified Cu-BTC with high stability in water and controllable selective adsorption of various gases [J]. Journal of Alloys and Compounds, 2019, 808: 151721.
- [103] MA, LIU, SRINIVASAKANNAN, et al. Synthesis of magnetic Fe₃O₄-HKUST-1 nanocomposites for azo dye adsorption [J]. Arabian Journal of Chemistry, 2023, 16(6): 104767.
- [104] LUO, HAN, HU, et al. Synthesis of dual function Fe₃O₄@MnO₂@HKUST-1 magnetic micromotors for efficient colorimetric detection and degradation of hydroquinone [J]. New Journal of Chemistry, 2023, 47(3): 1094-104.
- [105] LI, NANDGAONKAR, WANG, et al. Laccase-immobilized bacterial cellulose/TiO₂ functionalized composite membranes: Evaluation for photo-and bio-catalytic dye degradation [J]. Journal of membrane science, 2017, 525: 89-98.
- [106] MA, MENG, CUI, 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: 664-76.
- [107] ANTANASKOVIĆ, LOPIČIĆ, DIMITRIJEVIĆ-BRANKOVIĆ, et al. Biochar as an enzyme immobilization support and its application for dye degradation [J]. Processes, 2024, 12(11): 2418.
- [108] ORABY, VILLALONGA, HASSAN, et al. Immobilization of laccase on Fe₃O₄@ SiO₂ core@ shell magnetic nanoparticles for methylene blue biodegradation [J]. Process Biochemistry, 2025, 148: 10-6.
- [109] AMARI, ALZHRANI, ALSAIARI, et al. Magnetic metal organic framework

- immobilized laccase for wastewater decolorization [J]. *Processes*, 2021, 9(5): 774.
- [110] ZHENG, CHENG, FANG, et al. Surfactant-free synthesis of a $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{ZIF-8}$ core-shell heterostructure for adsorption of methylene blue [J]. *CrystEngComm*, 2014, 16(19): 3960-3964.
- [111] YU, WU. High adsorption for ofloxacin and reusability by the use of ZIF-8 for wastewater treatment [J]. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2020, 308:110494.
- [112] SHAHMIRZAEI, HEMMATI-SARAPARDEH, HUSEIN, et al. Development of a powerful zeolitic imidazolate framework (ZIF-8)/carbon fiber nanocomposite for separation of hydrocarbons and crude oil from wastewater [J]. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2020, 307:110463.
- [113] WU, YANG, GE, et al. Polydopamine tethered enzyme/metal-organic framework composites with high stability and reusability [J]. *Nanoscale*, 2015, 7(45): 18883-6.
- [114] CHAKRABORTY, NANDI, KUMAR, et al. Investigation on the drug release efficacy of the ibuprofen-loaded ZIF-8/ Fe_3O_4 NPs nanocarrier [J]. *ACS Omega*, 2024, 9(30): 32418-32428.
- [115] SUN, LI, LEI, et al. Enhanced degradation of carbamazepine in water over $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{ZIF-8}$ nanocomposites with persulfate or peroxymonosulfate as activator [J]. *Catalysis Today*, 2024, 435:113733.
- [116] CAI, ZHANG, CHEN. Magnetic $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{ZIF-8}$ nanoparticles as a drug release vehicle: pH-sensitive release of norfloxacin and its antibacterial activity [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2023, 223:113170.
- [117] OLAJUYIGBE, ADETUYI, FATOKUN. Characterization of free and immobilized laccase from *Cyberlindnera fabianii* and application in degradation of bisphenol A [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 125: 856-64.
- [118] DAS, BHATTACHARYA, PANCHANAN, et al. Production, characterization and congo red dye decolourizing efficiency of a laccase from *Pleurotus ostreatus*

- MTCC 142 cultivated on co-substrates of paddy straw and corn husk [J]. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2016, 14(2): 281-8.
- [119] MUNTATHIR ALSHABIB. Enzymatic remediation of bisphenol A from wastewaters: Effects of biosurfactant, anionic, cationic, nonionic, and polymeric additives. [J]. *Water Air Soil Pollut*, 2020, 231, 428.
- [120] LI, YANG, SHI, et al. Removal of bisphenol A by integrated adsorption and biodegradation using immobilized laccase onto defective PCN-224 [J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2023, 11(3): 110166.
- [121] PATEL, KALIA, LEE. Laccase immobilization on copper-magnetic nanoparticles for efficient bisphenol degradation [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2022, 33(1): 127.
- [122] TAGHIZADEH, TALEBIAN-KIAKALAIEH, JAHANDAR, et al. Biodegradation of bisphenol A by the immobilized laccase on some synthesized and modified forms of zeolite Y [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 386: 121950.
- [123] LATIF, MAQBOOL, SUN, et al. Immobilization of *Trametes Versicolor* laccase on Cu-alginate beads for biocatalytic degradation of bisphenol A in water: Optimized immobilization, degradation and toxicity assessment [J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2022, 10(1): 107089.
- [124] LASSOUANE, AÏT-AMAR, AMRANI, et al. A promising laccase immobilization approach for bisphenol A removal from aqueous solutions [J]. *Bioresource technology*, 2019, 271: 360-7.
- [125] YU, FENG, ABBAS, et al. Enhancing enzymatic catalysis efficiency: Immobilizing laccase on HHSS for synergistic bisphenol A adsorption and biodegradation through optimized external surface utilization [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 278: 134586.
- [126] WANG, XING, ZHU, et al. Synergistic degradation of o-chlorophenol in aerobic microbial fuel cells with a coupled photocatalytic-bioelectrochemical anode [J]. *Journal of Power Sources*, 2022, 543: 231830.
- [127] WU, LI, LUO, et al. Designed synthesis of compartmented bienzyme biocatalys

- ts based on core-shell zeolitic imidazole framework nanostructures [J]. *Small*, 2022, 19(7):2206066.
- [128] ASSOUALAYE, TOM, DJONGYANG. Monte carlo study of hydrogen adsorption by MOF-5 doped with cobalt at ambient temperature and pressure [J]. *SN Applied Sciences*, 2020, 2(11):1-10.
- [129] JIN, WU, WANG, et al. Highly efficient capture of benzothiophene with a novel water-resistant-bimetallic Cu-ZIF-8 material [J]. *Inorganica Chimica Acta*, 2020, 503:119412.
- [130] ZHANG, LIU. Enhanced adsorption of doxycycline hydrochloride (DCH) from water on zeolitic imidazolate framework-8 modified by Cu^{2+} (Cu-ZIF-8) [J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2020, 231(2):91.
- [131] SHAKEEL, ARIF, YASIN, et al. Layered by layered Ni-Mn-LDH/g- C_3N_4 nanohybrid for multi-purpose photo/electrocatalysis: Morphology controlled strategy for effective charge carriers separation [J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2019, 242: 485-98.
- [132] WANG, YU, FENG, et al. Simultaneous purification and immobilization of laccase on magnetic zeolitic imidazolate frameworks: Recyclable biocatalysts with enhanced stability for dye decolorization [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2019, 150:107285.
- [133] XU, LI, QI, et al. Sensitive electrochemical sensor for dihydroxybenzene isomers based on single-atom Cu catalyst derived from Cu-ZIF-8 [J]. *Research on Chemical Intermediates*, 2024, 51(2): 939-52.
- [134] ZHANG, ZHANG, WANG, et al. An enzyme immobilization platform for biosensor designs of direct electrochemistry using flower-like ZnO crystals and nano-sized gold particles [J]. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2009, 627(1-2): 9-14.
- [135] DONG, LI, HU, et al. Optimization of o-chlorophenol biodegradation by combined mycelial pellets using response surface methodology [J]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2017, 228: 1-13.

- [136] ZHENG, GUO, LUO, et al. Catalytic degradation of ortho-chlorophenol using activated carbon modified by different methods [J]. *Catalysts*, 2018, 8(1): 37.
- [137] WANG, WU, ZHU, et al. Synergistic degradation for o-chlorophenol and enhancement of power generation by a coupled photocatalytic-microbial fuel cell system [J]. *Chemosphere*, 2022, 293: 133517.
- [138] WANG, TANG, SUN, et al. BiFeO₃/Bi₂Fe₄O₉ S-scheme heterojunction hollow nanospheres for high-efficiency photocatalytic o-chlorophenol degradation [J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2022, 319: 121893.
- [139] SHARMA, LEE. Integrated ternary nanocomposite of TiO₂/NiO/reduced graphene oxide as a visible light photocatalyst for efficient degradation of o-chlorophenol [J]. *Journal of environmental management*, 2016, 181: 563-73.

攻读学位期间发表的学术论文目录

文章:

谢围围, 朱庆鹏, 宋娇娇, 陈志明. 磁性固定化漆酶的制备及高效降解染料研究 [J]. 纺织学报. DOI:10.13475/j.fzxb.202504013.

Yuhang Wei, **Weiwei Xie**, Xinyue Wang, et al. Photothermal degradation of triphenylmethane dye wastewater by Fe₃O₄@C-laccase [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 282, 137053.

专利:

陈志明, 谢围围, 崇庆阳, 尹心悦, 刘莉, 李现府, 汪春梅. 采用 Fe₃O₄/ZIF-8 材料固定化漆酶的制备及在双酚 A 降解中的应用. 申请号: 2025105751236.

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. 专利号: ZL 2023105532051.

致 谢

致谢不是论文的终点，而是硕士学业生涯的告辞。始于 2022 年初秋，终于 2025 年盛夏，这三年有喜悦，有悲伤，有遗憾，有收获，酸甜苦辣各有滋味。

落其实者思其树，学其成时念吾师。首先感谢我的论文指导老师陈志明教授。在实验、论文撰写、数据处理等方面，陈老师都及时地给予帮助。在生活方面，让我学会以沉着冷静的心态直面挑战。此外，还要感谢辅导员张帆老师，在科研之余，给予我们生活方面的关怀。最后感谢测试中心和化环学院的全体老师提供的支持与帮助。祝愿各位老师桃李满天下。

父母在，不远游，游必有方。感谢我的爸爸妈妈用爱浇灌我成长，做我最坚实的靠山。祝愿他们身体健康，平安顺遂。感谢我的室友兼同门汪新月，在科研和生活方面互相帮助。感谢我的室友许若倩、朱亚婷，互相陪伴安慰鼓励。感谢师姐刘肇菲、张莉莉，师兄卫雨航，师弟崇庆阳，师妹尹心悦，让实验室充满欢声笑语。祝愿大家前程似锦，一路繁花相送。

于各道努力，千里自同风。在此由衷地感谢遇见的每一个人。

作者：谢围围

2025 年 3 月 20 日