

# 固定化漆酶降解水中酚类污染物研究进展

史开篇, 杨 洋, 汪 娟, 阴 俐, 孔德生, 徐 荧, 李时银

(南京师范大学环境学院, 江苏 南京 210023)

**[摘要]** 酚类化合物污染行为与有效控制一直是污水处理领域研究热点之一。漆酶作为一种氧化还原酶, 对水中酚类污染物具有良好的去除效果, 但游离态漆酶处理水中酚类污染物存在稳定性差、活性损失快、难以重复使用等问题, 也是漆酶在污水处理领域应用的瓶颈问题。因此, 对游离态漆酶进行固定化处理, 已成为漆酶研究领域的热点之一。本文综述了漆酶固定化的方法、载体以及固定化漆酶对水中酚类污染物的去除机制和影响因素, 并对固定化漆酶研究进行了展望。

**[关键词]** 漆酶, 固定化, 载体, 酚类污染物, 去除机制

**[中图分类号]** X522 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-1292(2023)02-0054-08

## Research Progress on Degradation of Phenolic Pollutants by Immobilized Laccase in Water

Shi Kaipian, Yang Yang, Wang Juan, Yin Li, Kong Desheng, Xu Ying, Li Shiyin

(School of Environment, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

**Abstract:** Phenolic compounds pollution behavior and effective control has been one of the research focuses in the field of wastewater treatment. As an oxidoreductase, laccase has a good removal effect on phenolic pollutants in water. However, the free laccase has some problems in the treatment of phenolic pollutants, such as poor stability, rapid loss of activity, and being difficult to reuse. It is also a bottleneck problem in the application of laccase in sewage treatment. Therefore, the immobilization of free laccase has become one of the hotspots in laccase research. In this paper, the methods and carriers of laccase immobilization, as well as the removal mechanism and factors of phenolic pollutants in water by immobilized laccase are reviewed, and the research of immobilized laccase is prospected.

**Key words:** laccase, immobilized, carrier, phenolic contaminants, removal mechanism

酚类化合物是一种常见的有机污染物, 存在于油漆、纸浆、橡胶、塑料、化妆品、木材加工、石化和煤焦油生产等行业的各种废水中<sup>[1]</sup>。酚类化合物不经处理就排放到环境中, 会对生态系统造成严重的危害。由于酚类化合物的高致癌和高毒性, 已被美国国家环境保护局(EPA)和加拿大国家污染物排放清单(NPRI)指定为优先污染物<sup>[2]</sup>。国际监管机构为环境的可持续发展设定了严格的酚类排放限值, 例如, 美国国家环保局已将饮用水中的酚限量设定为小于 1  $\mu\text{g}/\text{L}$ <sup>[3]</sup>; 我国挥发酚最高允许排放浓度为 1.0  $\text{mg}/\text{L}$ , 生活饮用水标准(GB5749—2022)规定挥发酚的含量不得超过 0.002  $\text{mg}/\text{L}$ 。

酚类化合物污染行为与有效控制, 一直是污水处理领域的研究热点之一。水中去除酚类污染物的传统技术包括吸附<sup>[4]</sup>、萃取<sup>[5]</sup>、化学氧化<sup>[6]</sup>、膜生物反应器<sup>[6-7]</sup>、电化学法<sup>[8]</sup>和生物降解<sup>[9]</sup>。但这些传统技术存在明显弊端, 如高能耗(高级氧化)、吸附剂或萃取剂的频繁再生(吸附、萃取)、无法处理高浓度酚类的废水(生物处理)、会生成有毒有害的中间产物(化学氧化), 研发经济、高效、安全的酚类化合物去除技术显得尤为重要。酶催化是一种经济可行的污染物处理方法, 具有低能耗、最终产物无毒、反应条件温和等优点。漆酶作为一种氧化还原酶, 可直接氧化分解酚类化合物, 能够催化氧气还原成水, 是一种环境友好型催化剂, 已受到国内外研究者的关注。但游离态的漆酶稳定性差、活性损失快、回收困难、难以重复使用, 极大地限制了漆酶的实际应用。如何提高漆酶的稳定性和可重复性已成为漆酶应用的首要问题。酶固

收稿日期: 2022-10-09.

基金项目: 国家自然科学基金项目(51979137).

通讯作者: 李时银, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 土/水环境中有毒有机污染物迁移转化过程与控制. E-mail: lishiyin@njnu.edu.cn

定化被认为是提高酶稳定性和可重复性的有效方法之一,其原理是漆酶通过吸附、包埋或共价结合的方式固定在纳米材料上,固定化后的漆酶对 pH 和温度的耐受性提升,对污染物的降解效率提高<sup>[10]</sup>. 漆酶固定化技术对环境的可持续发展具有重要意义. 本文系统总结了漆酶固定化载体材料的发展趋势及固定化漆酶降解酚类污染物的研究现状,分析了目前研究中存在的不足,为后续采用固定化漆酶降解水中酚类污染物的研究提供参考.

## 1 漆酶及其固定化载体材料

### 1.1 漆酶简介

漆酶因首次从日本漆树的枝叶中分离而得名. 随着研究的深入,研究人员发现从微生物、植物和动物中都可提取到漆酶,例如,Wang 等<sup>[11]</sup>从灵芝中提取到活性为 4000 U/L 的漆酶,Guo 等<sup>[12]</sup>从杏鲍菇中分离出漆酶并用  $\beta$ -胡萝卜素增加了漆酶的产量. 漆酶是一种含有多个铜离子的氧化酶,其分子具有 3 个铜离子结合位点,根据光学、磁学和氧化还原电势共分为 3 类:使得漆酶显现蓝色的 I 型铜离子、无色的 II 型铜离子及 III 型铜离子. 铜离子从底物吸收电子,底物被氧化形成自由基,而后发生非酶促次级反应,即聚合反应或解聚反应,被吸收的电子随之被运送到三核中心(如图 1 所示),将氧分子还原成水<sup>[13]</sup>. 漆酶可以催化酚类、芳胺类、羧酸及其他富含电子的底物的单电子氧化. 据现有的研究可知,可被漆酶成功催化氧化的底物种类已有 250 余种,随着研究的深入,这个数目还在持续上升中. 漆酶具有来源广泛、pH 适应范围广、催化底物种类众多、催化效率高、无毒害产物产生和成本低等特点,因而被应用于医学、农学和环境学等多种领域.

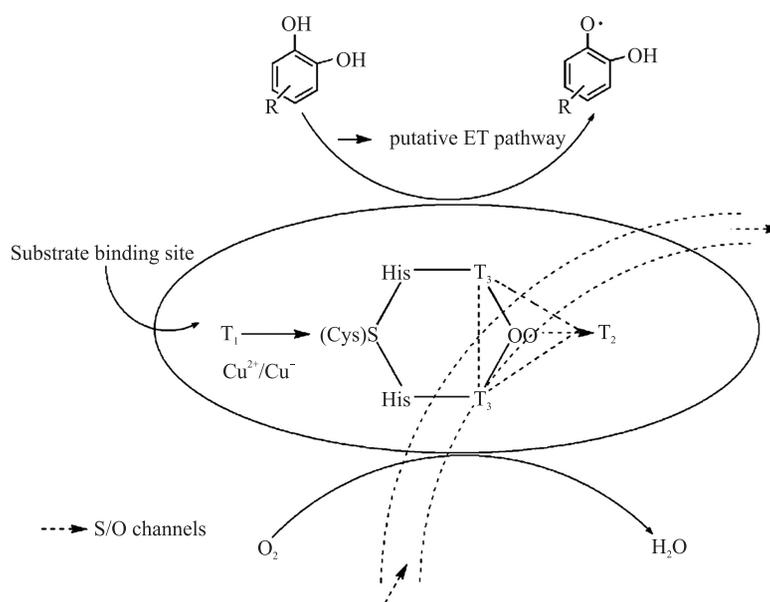


图 1 漆酶内部电子传递图

Fig. 1 Electron transfer diagram of laccase

### 1.2 固定化方法

漆酶作为一种游离的蛋白酶,与其他酶一样,具有稳定性差、活性损失快、回收困难、难以重复使用等缺点,限制了其在实际运用中的价值. 提高酶稳定性和重复利用性是提高酶对污染物降解效率的关键所在. 漆酶固定化技术就是将酶与各种载体相结合,从而提高其稳定性、重复利用性,并使其易于回收. 目前,漆酶常见的固定方法主要可分为物理法和化学法<sup>[14]</sup>.

#### 1.2.1 物理法

物理法主要分为吸附法和包埋法<sup>[10,14]</sup>.

吸附法是通过静电作用、氢键和范德华力等作用力将酶吸附在载体上,高岭石、硅藻土、活性炭、蒙脱石、分子筛、多孔玻璃、膨润土、硅胶和纤维素等有机和无机多孔材料是物理吸附常用的固定化载体. Zhang 等<sup>[15]</sup>把漆酶通过吸附固定在磁性生物炭材料上,漆酶的负载量为 0.027 mg/mg,酶活性为 0.045 U/mg. Skoronski

等<sup>[16]</sup>利用石墨烯纳米片吸附和固定漆酶,在 pH=5 的最适条件下石墨烯纳米片上获得了较大的酶负载量 179.12 mg/g. 吸附法在制备条件、操作、酶活性、重复使用等方面具有优势,但易导致酶脱落,固定化效率低.

包埋法是指将酶包埋在聚合物的微凝胶网格(网状包埋法)或聚合物半透膜(微囊包埋法)中的固定方法,在降解修复污染物的过程中酶自身结构不易遭到破坏,酶的稳定性得到进一步增强. Piao 等<sup>[17]</sup>通过紫外辅助乳液聚合方法将漆酶(Lac)包裹在聚乙二醇水凝胶中,然后用戊二醛交联制备 Lac/颗粒,所获得的 Lac/颗粒为球形和微米级(137-535  $\mu\text{m}$ ),与游离 Lac 相比具有 100%的高酶包封率、18.9%的高活性回收率和在 pH(3~7)下的高稳定性. Li 等<sup>[18]</sup>研究一种金属-有机骨架材料,将沸石咪唑骨架-90(ZIF-90)首次应用于包埋漆酶(Lac)和制备 ZIF-90/Lac 生物复合材料,通过简单的方法将该复合材料与细菌纤维素和羧基化多壁碳纳米管结合,得到一种新型的具有生物催化功能的纤维素膜. 包埋法与载体结合力强,稳定性高,但制备工艺复杂,条件苛刻,易失活.

### 1.2.2 化学法

化学法包括共价结合法和交联法.

共价结合法通过共价键的形式将载体和酶结合在一起,即通过酶蛋白表面氨基、羧基、酪氨酸的酚基等与载体上的功能基发生化学反应而偶联<sup>[19]</sup>,常见的共价结合方法包括硅烷化、醛亚胺缩合、溴化氢活化和重氮化. Diao 等<sup>[20]</sup>在 pH=3、40  $^{\circ}\text{C}$  的最佳固定化条件下通过活化载体和漆酶氨基之间的胺交换反应的方式将漆酶固定在 N-羟基琥珀酰亚胺活化的羧化聚乙烯醇水溶液中,固定化提高了漆酶的 pH 稳定性和最适 pH.

交联法即酶分子与载体分子之间或者酶分子之间通过某些功能试剂的交联作用形成共价键<sup>[21]</sup>,从而实现酶的固定化操作. 由于共价结合力的作用,酶蛋白与载体的结合力较强,不易脱落. 戊二醛、戊二酸、乙二酸和鞣酸等常作为功能试剂应用于固定化酶的制备中. Wang 等<sup>[22]</sup>以生物炭为载体、戊二醛为交联剂,采用吸附-交联法固定漆酶,在最佳固定化条件下,选择粒径为 30 目的生物炭,发现当戊二醛的体积分数较小时,戊二醛分子不足以与漆酶分子紧密结合,附着在生物炭载体上的漆酶分子不能与戊二醛平行连接. 随着戊二醛体积分数的增加,附着在生物炭载体和戊二醛分子上的漆酶分子“网”形成.“网”越完整,固定化漆酶越稳定,表达越完整. 当戊二醛的体积分数过大时,过量的戊二醛可能发生分子内反应,破坏偶联漆酶和戊二醛分子的“网状”结构,从而降低漆酶活性. 因此,交联法中交联剂含量的选择对于漆酶活性的影响至关重要. Sadeghzadeh 等<sup>[23]</sup>采用共沉淀法合成  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子,然后用(3-氨丙基)三甲氧基硅烷进行表面氨基化,采用 0.25%的戊二醛作为交联剂,将毛栓菌漆酶成功固定在表面修饰的  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子上,活性回收率达到了 27%,且所得的磁性交联漆酶聚集体在 6 个连续循环后可保存其初始活性的 30%以上. 交联法固定漆酶能够提供比其他方法固定漆酶高 10~1 000 倍的活性,具有巨大的商业潜力. 但其反应条件相对苛刻,酶活性损失大,自固定化漆酶体积小,使用不便.

## 1.3 固定化载体

载体是漆酶固定化的关键部分. 与游离态漆酶相比,固定化漆酶减少了酶活性的损失,提高了热稳定性、储存稳定性和操作稳定性. 漆酶的活性会受到载体的形状、表面官能团的影响,且载体本身的扩散限制效应和空间障碍效应也会影响漆酶的降解效率. 合适的载体材料有利于提高酶的催化能力和固定化漆酶的稳定性. 载体材料种类繁多,可分为传统载体和新材料.

### 1.3.1 传统固定化材料

传统材料包括有机和无机多孔材料,如高岭石、硅藻土、活性炭、蒙脱石、分子筛、多孔玻璃、二氧化硅、二氧化钛等,具有化学稳定性好、机械强度高、难降解、来源广、成本低、使用寿命长等优点. Girelli 等<sup>[24]</sup>将云芝漆酶共价固定在二氧化硅-壳聚糖杂化载体上,该复合材料比游离的漆酶具有更高的热稳定性,游离的漆酶在 30  $^{\circ}\text{C}$  具有最大活性,而固定化形式在 50  $^{\circ}\text{C}$  具有最大活性,这表明生物催化剂对更宽的温度范围具有更大的抗性. 与此同时,固定化漆酶比游离态漆酶 pH 耐受性增加. Sanlier 等<sup>[25]</sup>将漆酶固定在海藻酸盐小球中,确定了固定化条件,使用所制备的珠粒对漆酶(25 mg/mL)包封效率大约为 94%. 贮藏 10 d 后,游离漆酶和固定化漆酶的保留率分别约为 8.08%和 80.83%,固定化酶的保存时间得到了提高.

### 1.3.2 新型固定化材料

与传统材料相比,新材料具有特殊的结构或性质,如磁性和导电性,因此制备的固定化漆酶具有独特

的优势. 目前, 纳米材料、磁性纳米复合材料和介孔材料均可作为新型载体. 纳米材料包括纳米膜材料、纳米碳材料和纳米复合材料, 具有较大的比表面积和较大的表面结合能, 为漆酶提供了更多的结合位点, 提高了酶的负载量和酶的稳定性. Feng 等<sup>[26]</sup>通过静电纺丝和胺脲改性制备胺脲多芳基脲/蒙脱石(AOPAN/MMT)复合纳米纤维膜, 然后用戊二醛改性纳米纤维膜, 改性 AOPAN/MMT 复合纳米纤维通过吸附交联法应用于漆酶固定. 固定化漆酶在 4°C 下储存 20 d 时保留了其初始活性的 62.6% 以上. 经 10 次重复反应后, 固定化漆酶保留了其初始活性的 64.5%. 磁性复合材料因其本身的磁性性能, 不仅可以提高漆酶的稳定性和活性, 且在实际运用中磁性复合材料更利于酶的回收, 同时超顺磁性避免了粒子的磁诱导自聚集, 在经济上具有较高的可行性. Lin 等<sup>[27]</sup>采用溶剂热还原法成功合成了平均直径为 266 nm 的胺功能化  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @C 纳米粒子用于漆酶固定化, 由于表面积的增加, 粗糙的表面和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @C 纳米颗粒的小尺寸将有利于酶的固定, 固定化漆酶在  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @C 纳米粒子上的负载量约为 195 mg/g. Xia 等<sup>[28]</sup>用聚乙烯亚胺(PEI)作为一种间隔臂聚合物修饰在胺功能化  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子上, 如图 2 所示, PEI 具有高密度的伯、仲、叔氨基官能团, 为漆酶的吸附提供更多的结合位点.  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -NH<sub>2</sub>-PEI-漆酶的最大活力回收率(107.41%) 远高于  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -NH<sub>2</sub>-漆酶(42.75%).  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -NH<sub>2</sub>-PEI-漆酶和  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -NH<sub>2</sub>-漆酶的相应比活力分别是游离漆酶产物的 101.33 倍和 74.45 倍, 两种固定化漆酶的酶学性质都得到了改善, 实现了漆酶的重复利用.

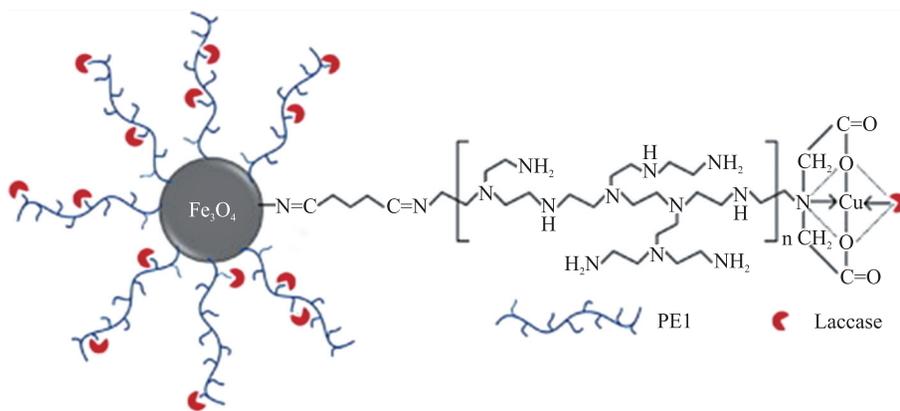


图 2 聚乙烯亚胺修饰  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  纳米粒子的原理图<sup>[28]</sup>

Fig. 2 Schematic diagram of polyethyleneimine modified  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles<sup>[28]</sup>

## 2 固定化漆酶对酚类污染物的去除

固定化漆酶对酚类污染物的去除可通过两种主要机制实现: 酶降解和载体吸附. 表 1 描述了固定化方法和载体的污染物去除机理.

表 1 污染物去除机制

Table 1 Removal mechanism of pollutants

固定化载体	固定化方法	污染物	去除效率	吸附效率	文献
改性生活炭	吸附、交联	2,4-二氯苯酚	97.7%	42.5%	[29]
羧基化生物炭	共价结合	蒽	98%±4.98%	25%	[30]
氧功能化纳米生物炭	共价结合	卡马西平	86%	<30%	[31]
聚丙烯腈-生物炭	共价结合	金霉素	63.3%	<3%	[32]
复合纳米纤维膜		卡马西平	48.6%	<3%	
功能化海藻酸钙微球	共价结合、包埋	吡啶	100%	15.5%	[33]
海藻酸钙珠	包埋	蒽醌染料	90.3%	12%	[34]
壳聚糖微球	包埋	纺织染料	>90%	<10%	[35]
壳聚糖	交联	2,4-二氯苯酚	88.8%	38.8%	[36]

### 2.1 酶降解酚类污染物

漆酶是一种含有多个铜离子的氧化酶, 能够氧化多种化合物, 特别是酚类污染物, 并能将分子氧还原成水. 漆酶在降解苯酚时, 苯酚经过一个电子的氧化作用形成一个自由基, 这种活性的氧基团进一步被氧化生成苯醌, 苯醌再进行聚合成为自由基的氧化产物, 从而实现对苯酚的降解(如图 3 所示).

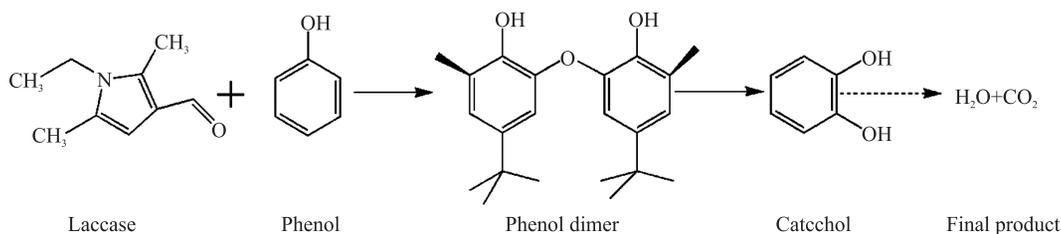


图 3 漆酶降解苯酚原理图

Fig. 3 Schematic diagram of phenol degradation by laccase

研究酶的催化效率时,米氏方程是一个重要手段. 米氏常数( $K_m$ )是酶的一个特征性物理量,其含义是酶促反应达最大速度( $V_{max}$ )一半时的底物(S)的浓度,大小与酶的性质有关,反映了漆酶对底物的亲和力. Wu 等<sup>[37]</sup>用氨基功能化磁性金属有机框架固定漆酶去除酚类化合物,游离和固定化漆酶的  $K_m$  值分别为 0.174 mmol/L 和 0.771 mmol/L,固定化后, $K_m$  增加了 4.4 倍. Isanapong 等<sup>[38]</sup>用氧化锌纳米阵列固定化漆酶去除叔丁醇(TBA),固定化后漆酶的  $V_{max}$  高于游离漆酶( $(2.25 \pm 0.542)$  mg TBA/h·U 与  $(1.47 \pm 0.185)$  mg TBA/h·U),固定化酶的  $K_m$  高于游离漆酶( $(67.9 \pm 20.5)$  mg TBA/L 与  $(33.5 \pm 7.10)$  mg TBA/L). 这表明固定化的漆酶在酚类污染物去除中表现更好,但漆酶和底物之间的亲和力降低, $K_m$  增加的原因可能是漆酶与固定化材料之间的稳定结构限制了漆酶分子的空间自由度. 固定化后漆酶的空间位阻和底物的扩散限制均形成,导致漆酶与反应底物的亲和力显著下降. 此外,固定化引入的漆酶结构变化也可能导致  $K_m$  值的增加. 酶的固定化可提高酶对污染物的降解性能,同时还可通过  $K_m$  和  $V_{max}$  值得到降解一定量酚类污染物所需最少的漆酶含量,有利于固定化酶在运用过程中的经济性. 在酶降解过程中,一些顽固的污染物比漆酶表现出更高的氧化还原电位,导致降解效率降低<sup>[39]</sup>. 为了增强酶催化效率,通常将一些低分子量介质(如丁香醛、羟基苯并三唑(HBT)和 2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐(ABTS))加入到漆酶氧化系统中,以产生高活性自由基,提高漆酶对污染物的氧化能力. Xue 等<sup>[33]</sup>用功能化的海藻酸钠固定化漆酶催化降解吡啶,发现加入 ABTS 介体后,催化降解 30 mg/L 吡啶水溶液 8 h,吡啶的降解率可达 100%. 与此同时,这些低分子量介质还可充当漆酶与污染物之间的电子传递器,从而增加漆酶与污染物之间的电子传递效率,进一步减少空间位阻的负面影响.

## 2.2 载体吸附酚类污染物

对于固定化漆酶而言,除了漆酶本身对污染物的降解效果,载体本身的吸附也是去除污染物的方法之一. Liu 等<sup>[40]</sup>在研究磁性介孔碳固定化漆酶去除酚类污染物时发现,漆酶可以降解 60% 的酚类污染物,磁性介孔碳由于其优异的吸附性质也可去除 40% 的酚类污染物. 相关研究表明,漆酶固定在固定化载体表面,对载体本身的吸附效果影响很小. Nguyen 等<sup>[41]</sup>在用活性炭(GAC)作为载体固定漆酶时发现,GAC 和固定化漆酶的 GAC 对微污染物的去除效果相当(部分/全饱和),漆酶固定化后,GAC 表面的大部分(65%)仍然可用,说明固定化漆酶对 GAC 的微污染物吸附没有影响.

固定化载体还可以提高酶降解酚类污染物的效率. 与游离漆酶相比,固定化漆酶对微量污染物的降解效率更高,这可能是因为漆酶与底物分子吸附到固定化载体表面后,电子传递更好. Zhang 等<sup>[42]</sup>在用丝瓜和海绵制备磁性碳纳米载体(MLC-1)固定化漆酶降解双酚 A 时发现,MLC-1 对双酚 A 的去除率为 18.76%,游离酶对双酚 A 的降解率达到 62.72%,漆酶@MLC-1 对双酚 A 的去除率接近 100%,进一步证明了固定化载体可以提高酶降解酚类污染物的效率. 由于某些载体特定的结构(孔、球形)和官能团的静电效应,使得污染物容易吸附在载体表面,从而导致材料表面吸附高浓度的污染物. 固定化漆酶表面吸附的酚类污染物浓度越高,漆酶对酚类污染物的降解效率越高,这也是固定化漆酶的降解率高于游离漆酶的主要原因之一. 通常可利用一级和二级动力学模型得到的一级速率和二级速率( $K$ )、50% 基质生物降解时间( $t_{1/2}$ )和污染物去除率( $R$ )来估算载体的吸附行为. Wang 等<sup>[29]</sup>制备改性生物炭固定化漆酶去除二氯苯酚(2,4-DCP),在最佳条件下,生物炭在 2,4-DCP 上的吸附率为 42.5%,吸附容量为 85.13 mg/g,生物炭对 2,4-DCP 的吸附符合准二级模型和 Langmuir 吸附等温线模型. 漆酶固定化后,由于载体的加入提高了吸附效率,降低了扩散阻力,增加了漆酶与污染物的接触,使漆酶固定化后的  $K$  和  $R$  升高, $t_{1/2}$  降低,从而缩短了酶催化反应时间.

### 3 固定化漆酶去除酚类污染物的影响因素

#### 3.1 载体的比表面积

载体的比表面积是决定其吸附容量和吸附速率的重要因素。一般来说,具有更大比表面积可以提供更多的活性位点和官能团,载体的表面积越大也意味着可以拥有更多的吸附位点,这些吸附位点会在短时间内产生污染物浓度梯度,从而增大其扩散速率。此外,较大的表面积提高了酶负载量,促进了污染物降解。对于具有孔结构的固定化载体,孔容也是影响吸附容量和吸附速率的关键要素。Li 等<sup>[43]</sup>成功制备了具有介孔结构的磁性介孔  $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$  空心微球,该复合微球具有高表面积( $772 \text{ m}^2/\text{g}$ )和大孔体积( $0.83 \text{ cm}^3/\text{g}$ )。同时,该复合微球对漆酶固定化率高达  $689 \text{ mg/g}$ 。小孔径限制了大的反应物分子进入孔内,限制了扩散,与此同时小的孔容导致包埋酶的动力学降低,酶催化反应时间延长,因此与小孔径相比大孔径的固定化载体具有较高的吸附效率。固定化载体的形态会影响固定化效率和固定化酶活性,从而影响固定化漆酶对酚类污染物的去除效率。Kuo 等<sup>[44]</sup>用介孔二氧化硅固定化漆酶,发现在介孔二氧化硅薄膜、介孔泡沫和棒状 SBA-15 三种不同介孔二氧化硅中的固定化效率和固定化酶的活性各不相同,固定在不同介孔二氧化硅载体上的酶的活性顺序为:介孔二氧化硅薄膜>介孔泡沫>棒状 SBA-15。

#### 3.2 pH

pH 是影响漆酶活性的关键因素之一。游离的漆酶最适 pH 为  $4.5 \sim 5$ ,漆酶活性在达到最适 pH 值之前呈增加趋势,然后随 pH 值升高而降低<sup>[45]</sup>。在强酸或强碱的情况下,固定化漆酶活性受到抑制,酚类污染物去除率非常低。值得注意的是,一些载体在酸性条件下表现出很好的处理效率,是因为载体上的羟基和羧基可以为污染物提供质子,减少排斥性静电相互作用并加强吸附。Zhang 等<sup>[36]</sup>在用壳聚糖固定化漆酶去除 2,4-二氯苯酚时,发现游离漆酶的最适 pH 为 5.0,固定化酶的最适 pH 为 4.5,阳离子载体表面含有游离  $-\text{NH}_2$  基团,为固定化漆酶提供了碱性微环境。当漆酶与聚合阳离子载体结合时,漆酶的碱性离子增加,导致固定化漆酶周围的 pH 升高,这可能是游离漆酶和固定化漆酶之间最适 pH 值变化的原因。

#### 3.3 温度

温度同样制约着固定化漆酶的活性,固定化漆酶对污染物的降解随温度的升高而改善。低温条件下,酶催化活性受到强烈抑制,对污染物去除率较低<sup>[46]</sup>。在最适温度之后,污染物降解效率随着温度升高而下降。高温也不利于漆酶的氧化效率<sup>[47]</sup>,漆酶结构构象的改变导致其热变性,降低了降解效率<sup>[48]</sup>。此外,温度对载体的吸附性能也有影响。降解时间也影响着漆酶的催化活性,漆酶对污染物的去除效率呈现出随时间增加直至趋于平稳的趋势<sup>[43]</sup>。造成这种现象的原因可能是降解产物积累引起的酶促降解抑制及载体的吸附达到饱和<sup>[49]</sup>,以及降解过程中随着降解时间增长导致的漆酶失活。

## 4 结论与展望

漆酶具有来源广泛、催化底物种类繁多、无毒害产物产生和成本低等特点,但单一漆酶在降解酚类污染物过程中存在着重复利用率低、受环境影响较大等缺点,可通过吸附法、包埋法、化学法和交联法使用不同的固定化材料对漆酶进行固定,固定化方法和材料是制约漆酶固定化程度的关键因素。由于固定化载体的吸附作用及固定化作用对漆酶性能的提升,固定化后的漆酶对酚类污染物具有更高的降解效率、循环利用率,对周围环境的耐受性也进一步得到提高。然而,成本高和漆酶活力下降是限制其实际应用的两个主要问题。今后的研究应着力于以下两个方面:(1)降低漆酶生产成本:开发新技术或优化现有工艺降低漆酶生产成本;(2)提高漆酶的稳定性和可持续性:利用创新的固定化方法和有前途的载体材料,提高漆酶在长期运行过程中的活力。

#### [参考文献] (References)

- [1] GODIYA C B, PARK B J. Removal of bisphenol A from wastewater by physical, chemical and biological remediation techniques. A review[J]. Environmental Chemistry Letters, 2022, 20(3): 1801-1837.
- [2] BERTHIAUME A, ARNOT J A, TOOSE L. Risk-based prioritization of organic substances in the Canadian National Pollutant Release Inventory using an evaluative regional-scale multimedia mass balance model[J]. Integrated Environmental Assessment

- and Management, 2022, 18(6):1722–1732.
- [3] CAO X T, WANG K A, FENG X S. Removal of phenolic contaminants from water by pervaporation[J]. Journal of Membrane Science, 2021, 623:119043.
- [4] DEHMANI Y, LAMHASNI T, MOHSINE A, et al. Adsorption removal of phenol by oak wood charcoal activated carbon[J/OL]. Biomass Conversion and Biorefinery, 2022. [2022-07-19]. <http://doi.org/10.1007/S13399-022-03036-5>.
- [5] GAI H J, QIAO L, ZHONG C Y, et al. A solvent based separation method for phenolic compounds from low-temperature coal tar[J]. Journal of Cleaner Production, 2019, 223:1–11.
- [6] DENG Z H, LI N, JIANG H L, et al. Pretreatment techniques and analytical methods for phenolic endocrine disrupting chemicals in food and environmental samples[J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2019, 119:115592.
- [7] ZHENG M Q, HAN Y X, HAN H J, et al. Synergistic degradation on phenolic compounds of coal pyrolysis wastewater(CPW) by lignite activated coke-active sludge(LAC-AS) process; Insights into succession of microbial community under selective pressure[J]. Bioresource Technology, 2019, 281:126–134.
- [8] ZHANG M, ZHANG Z, LIU S C, et al. Ultrasound-assisted electrochemical treatment for phenolic wastewater[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 65:105058.
- [9] LASSOUANE F, AIT-AMAR H, AMRANI S, et al. A promising laccase immobilization approach for Bisphenol A removal from aqueous solutions[J]. Bioresource Technology, 2019, 271:360–367.
- [10] ZHOU W T, ZHANG W X, CAI Y P. Laccase immobilization for water purification: A comprehensive review[J]. Chemical Engineering Journal, 2021, 403:126272.
- [11] WANG H L, TANG C Z, YU G L, et al. A novel membrane-surface liquid co-culture to improve the production of laccase from *Ganoderma lucidum*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2013, 80:27–36.
- [12] GUO C L, ZHAO L T, WANG F, et al.  $\beta$ -carotene from yeasts enhances laccase production of *pleurotus eryngii* var. *ferulae* in co-culture[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8:1101.
- [13] TORRES J, SVISTUNENKO D, KARLSSON B, et al. Fast reduction of a copper center in laccase by nitric oxide and formation of a peroxide intermediate[J]. Journal of the American Chemical Society, 2002, 124(6):963–967.
- [14] DATTA S, VEENA R, SAMUEL M S, et al. Immobilization of laccases and applications for the detection and remediation of pollutants: a review[J]. Environmental Chemistry Letters, 2021, 19(1):521–538.
- [15] ZHANG Y, PIAO M Y, HE L Z, et al. Immobilization of laccase on magnetically separable biochar for highly efficient removal of bisphenol A in water[J]. RSC Advances, 2020, 10(8):4795–4804.
- [16] SKORONSKI E, SOUZA D H, ELY C, et al. Immobilization of laccase from *Aspergillus oryzae* on graphene nanosheets[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 99:121–127.
- [17] PIAO M Y, ZOU D L, YANG Y S, et al. Multi-functional laccase immobilized hydrogel microparticles for efficient removal of bisphenol A[J]. Materials, 2019, 12(5):704.
- [18] LI D W, CHENG Y, ZUO H, et al. Dual-functional biocatalytic membrane containing laccase-embedded metal-organic frameworks for detection and degradation of phenolic pollutant[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2021, 603:771–782.
- [19] HONG C S, LAU C C Y, LEONG C Y, et al. A comparison of entrapped and covalently bonded laccase: Study of its leakage, reusability, and the catalytic efficiency in TEMPO-mediated glycerol oxidation[J]. Biocatalysis and Biotransformation, 2018, 36(5):352–361.
- [20] DIAO Y H, WANG Q L, FU S Y. Laccase stabilization by covalent binding immobilization on activated polyvinyl alcohol carrier[J]. Letters in Applied Microbiology, 2002, 35(6):451–456.
- [21] DATTA S, CHRISTENA L R, RAJARAM Y R S. Enzyme immobilization: An overview on techniques and support materials[J]. 3 Biotech, 2013, 3(1):1–9.
- [22] WANG Z B, REN D J, ZHAO Y S, et al. Remediation and improvement of 2,4-dichlorophenol contaminated soil by biochar-immobilized laccase[J]. Environmental Technology, 2021, 42(11):1679–1692.
- [23] SADEGHZADEH S, NEJAD Z G, GHASEMI S, et al. Removal of bisphenol A in aqueous solution using magnetic cross-linked laccase aggregates from *Trametes hirsuta*[J]. Bioresource Technology, 2020, 306:123169.
- [24] GIRELLI A M, QUATTROCCHI L, SCUTO F R. Silica-chitosan hybrid support for laccase immobilization[J]. Journal of Biotechnology, 2020, 318:45–50.
- [25] SANLIER S H, GIDER S, KOPRULU A. Immobilization of laccase for biotechnology applications[J]. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, 2013, 41(4):259–263.
- [26] FENG Q, WU D S, HUAN S, et al. Study on the preparation of the AOPAN/MMT composite nanofibers and their application for laccase immobilization[J]. Journal of Engineered Fiber and Fabrics, 2016, 11(3):155892501601100.
- [27] LIN J H, WEN Q L, CHEN S, et al. Synthesis of amine-functionalized  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @C nanoparticles for laccase immobilization[J].

- International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 96:377–383.
- [28] XIA T T, LIU C Z, HU J H, et al. Improved performance of immobilized laccase on amine-functionalized magnetic  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles modified with polyethylenimine[J]. Chemical Engineering Journal, 2016, 295:201–206.
- [29] WANG Z, REN D, WU J, et al. Study on adsorption-degradation of 2, 4-dichlorophenol by modified biochar immobilized laccase[J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2022, 19(3):1393–1406.
- [30] IMAM A, SUMAN S K, SINGH R, et al. Application of laccase immobilized rice straw biochar for anthracene degradation[J]. Environmental Pollution, 2021, 268:115827.
- [31] NAGHDI M, TAHERAN M, BRAR S K, et al. Immobilized laccase on oxygen functionalized nanobiochars through mineral acids treatment for removal of carbamazepine[J]. Science of the Total Environment, 2017, 584/585:393–401.
- [32] TAHERAN M, NAGHDI M, BRAR S K, et al. Covalent immobilization of laccase onto nanofibrous membrane for degradation of pharmaceutical residues in water[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2017, 5(11):10430–10438.
- [33] XUE P, LIU X P, GU Y H, et al. Laccase-mediator system assembling co-immobilized onto functionalized calcium alginate beads and its high-efficiency catalytic degradation for acridine[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2020, 196:111348.
- [34] DAASSI D, RODRIGUEZ-COUTO S, NASRI M, et al. Biodegradation of textile dyes by immobilized laccase from *coriolopsis gallica* into Ca-alginate beads[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2014, 90:71–78.
- [35] ASGHER M, NOREEN S, BILAL M. Enhancing catalytic functionality of *trametes versicolor* IBL-04 laccase by immobilization on chitosan microspheres[J]. Chemical Engineering Research and Design, 2017, 119:1–11.
- [36] ZHANG J B, XU Z Q, CHEN H, et al. Removal of 2,4-dichlorophenol by chitosan-immobilized laccase from *coriolus versicolor*[J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, 45(1):54–59.
- [37] WU E H, LI Y X, HUANG Q, et al. Laccase immobilization on amino-functionalized magnetic metal organic framework for phenolic compound removal[J]. Chemosphere, 2019, 233:327–335.
- [38] ISANAPONG J, PORNWONGTHONG P. Immobilized laccase on zinc oxide nanoarray for catalytic degradation of tertiary butyl alcohol[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 411:125104.
- [39] AL-ADHAMI A J H, BRYJAK J, GREB-MARKIEWICZ B, et al. Immobilization of wood-rotting fungi laccases on modified cellulose and acrylic carriers[J]. Process Biochemistry, 2002, 37(12):1387–1394.
- [40] LIU Y Y, ZENG Z T, ZENG G M, et al. Immobilization of laccase on magnetic bimodal mesoporous carbon and the application in the removal of phenolic compounds[J]. Bioresource Technology, 2012, 115:21–26.
- [41] NGUYEN L N, HAI F I, DOSSETO A, et al. Continuous adsorption and biotransformation of micropollutants by granular activated carbon-bound laccase in a packed-bed enzyme reactor[J]. Bioresource Technology, 2016, 210:108–116.
- [42] ZHANG C Y, YOU S P, LIU Y D, et al. Construction of luffa sponge-based magnetic carbon nanocarriers for laccase immobilization and its application in the removal of bisphenol A[J]. Bioresource Technology, 2020, 305:123085.
- [43] LI Q Y, WANG P Y, ZHOU Y L, et al. A magnetic mesoporous  $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4$  hollow microsphere with a novel network-like composite shell: synthesis and application on laccase immobilization[J]. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2016, 78(3):523–530.
- [44] KUO P C, LIN Z X, WU T Y, et al. Effects of morphology and pore size of mesoporous silicas on the efficiency of an immobilized enzyme[J]. RSC Advances, 2021, 11(17):10010–10017.
- [45] TOUAHAR I E, HAROUNE I, BA S, et al. Characterization of combined cross-linked enzyme aggregates from laccase, versatile peroxidase and glucose oxidase, and their utilization for the elimination of pharmaceuticals [J]. Science of the Total Environment, 2014, 481:90–99.
- [46] DAI Y R, YAO J, SONG Y H, et al. Enhanced performance of immobilized laccase in electrospun fibrous membranes by carbon nanotubes modification and its application for bisphenol A removal from water[J]. Journal of Hazardous Materials, 2016, 317:485–493.
- [47] XU R, SI Y F, WU X T, et al. Triclosan removal by laccase immobilized on mesoporous nanofibers: strong adsorption and efficient degradation[J]. Chemical Engineering Journal, 2014, 255:63–70.
- [48] ZDARTA J, ANTECKA K, FRANKOWSKI R, et al. The effect of operational parameters on the biodegradation of bisphenols by *trametes versicolor* laccase immobilized on *Hippospongia communis* spongin scaffolds[J]. Science of the Total Environment, 2018, 615:784–795.
- [49] DENG J B, WANG H F, ZHAN H S, et al. Catalyzed degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by recoverable magnetic chitosan immobilized laccase from *Trametes versicolor*[J]. Chemosphere, 2022, 301:134753.

[责任编辑:严海琳]