尺寸可控的固定化漆酶-介体凝胶小球微反应器的制备和性能评价

黄文光 孙洪飞 张淑娟*

(污染控制与资源化研究国家重点实验室 南京大学环境学院 南京 210023)

摘要 首次利用漆酶-乙酰丙酮(AA)-过硫酸钾组成的复合引发体系在室温水相中引发丙烯酰胺的聚合,采用滴球法将上述反应液滴入硫酸铜溶液,利用铜离子与壳聚糖的络合交联反应制备得到尺寸可控的核壳结构小球.小球内部发生自由基聚合反应,将漆酶-AA 同步固定于新生成的具有三维网络结构的水凝胶中.微反应器小球的形貌和内部孔道结构通过扫描电镜和氮气吸附实验进行了表征.该固定化漆酶-介体小球微反应器相比于游离漆酶表现出更高的 pH 稳定性和耐热性.得益于固定化 AA 的介导作用,漆酶的可重复使用性能得到显著提升,降解孔雀石绿的有效循环批次较游离漆酶-介体体系延长了 3 倍,为降低漆酶在实际废水处理中的成本、削减游离介体带来的二次污染提供了一条有效途径.

关键词 漆酶;介体;乙酰丙酮;微反应器;孔雀石绿

Facile Synthesis and Evaluation of Size-tunable Immobilized Laccase-mediator Microreactor

Huang, Wenguang Sun, Hongfei Zhang, Shujuan*

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210023)

Abstract A series of immobilized laccase-mediator microreactor (LMMR) was prepared in a one-pot process by simultaneously immobilizing *Trametes versicolor* laccase and acetylacetone (AA) into size-tunable chitosan copper-polyacrylamide hydrogel beads. The polymerization was induced by a laccase-AA-persulfate ternary initiating system and was finished within the chitosan beads at room temperature. The preparation conditions for the LMMR were optimized by an orthogonal array design. The method developed in this work, for the first time, realized the co-immobilization of laccase and mediator in microreactors of tunable size and mechanic strength. Experimental results from scanning electron microscopy and nitrogen adsorption-desorption analysis indicate that the resulting LMMR had a core-shell structure. Chitosan copper served as the mechanical shell, whereas polyacrylamide hydrogel was the core of three-dimensional network. Throughout the hydrogel beads, there were abundant mesopores of size in the range of 2~8 nm. The microreactor beads could endure a 20 N pressure in the axial direction, ensuring the structural integrity in the practical application in wastewater. The loading efficiency of laccase in the microreactor reached up to 93.5%. As compared with the free laccase, the LMMR showed better storage stability and higher tolerance to changes in solution pH and temperature. In the enzymatic conversion of malachite green (MG), benefited from the mediation effect of the immobilized AA, the LMMR still worked after 17 cycling runs (12 h for each cycle), which was 3-fold longer than that of a free laccase-mediator system. The successful recovery of both laccase and mediator is promising to reduce the cost for the application of laccase in wastewater treatment and might be helpful to cut down the secondary pollution from free laccase mediators. These results demonstrate that this novel one-pot synthesis was a useful strategy in the immobilization of laccase. The LMMR has a great potential in large-scale application for dyeing effluent treatment.

Keywords laccase; mediator; acetylacetone; microreactor; malachite green

1 引言

孔雀石绿是一种有毒的三苯甲烷类化合物,既是染料,也是杀菌剂,被广泛应用于纺织印染和水产养殖,具有潜在的致癌、致畸、致突变的作用^[1].因此,开发经济有效的孔雀石绿废水处理具有重要的环境意义.目前针对孔雀石绿废水的处理方法主要有物理法和化学法两大类,如吸附^[1]和化学氧化法^[2~4].然而,这些方

法普遍存在操作条件苛刻或处理效果不理想的问题,甚至会出现二次污染.

漆酶是一种绿色环保的生物催化剂,可有效降解包括孔雀石绿在内的多种人工合成染料^[5,6].然而,由于其良好的水溶性,游离漆酶在实际应用中存在稳定性差和难回收的问题^[7].固定化可有效减少漆酶的损失,同时能提高漆酶的稳定性,包括 pH 稳定性和热稳定性等.

* E-mail: sjzhang@nju.edu.cn

Received March 30, 2016; published May 9, 2016.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 51378254, 21522702).

项目受国家自然科学基金(Nos. 51378254, 21522702)资助.

在众多的固定化方法中,凝胶包埋法由于其固定过程相对温和,对漆酶结构的破坏较小而得到了广泛应用^[8].例如,海藻酸钙凝胶和壳聚糖铜凝胶都已被用于固定漆酶^[9].固定后的漆酶也表现出了良好的化学稳定性.然而,凝胶包埋法也存在一些不足.首先,作为一种经典的后装载包埋方式,它的前提条件是酶分子能够顺利扩散到已经聚合生成的凝胶网络载体的内部^[10].事实上,在扩散过程中,酶活会发生不可避免的损失^[11].除此之外,为了避免包埋进去的酶再次泄露出来,往往需要添加一些交联剂(比如常用的戊二醛^[12])到酶液中形成交联酶或者酶-载体交联物.这种基于共价结合的交联在阻止酶泄露方面确实发挥了作用,但是同时对酶的结构具有负面影响^[13].

一般而言,漆酶只能催化氧化一些还原电势较低的酚类和芳香胺类物质.介体的存在可以拓宽漆酶作用底物的范围^[14].本课题组之前的研究表明:(1)游离乙酰丙酮(AA)可以作为漆酶的介体,促进孔雀石绿的催化氧化^[15];(2)固定于壳聚糖-聚丙烯酰胺凝胶中的AA仍然具备介导漆酶催化氧化的功能^[16].以此为基础,本课题组发明了一种利用漆酶-AA作为引发体系合成固定化漆酶-介体体系的方法^[16].该固定化方法利用漆酶-AA产生的自由基引发聚合反应实现其自身的固定化,有效解决了游离介体成本高、无法重复使用且易导致二次污染的问题.但是,这一固定化方法需要较高的引发温度^[16],在合成过程中容易导致漆酶的热失活,而且所合成的凝胶为块状结构、机械强度低,在实际应用中存在难回收、易破碎的缺点.同时,因为凝胶的粘性较大,降解后的产物易沉积在凝胶表面堵塞凝胶孔道.

针对上述问题,本工作首次利用漆酶-AA-过硫酸钾(KPS)组成的复合引发体系在室温水相中引发丙烯酰胺的聚合.在合成过程中采用滴球法将反应液滴入硫酸铜溶液中,利用铜离子与壳聚糖的络合交联反应制备得到尺寸可控的核壳结构小球.小球内部发生自由基聚合反应,将漆酶-介体同步固定于新生成的具有三维网络结构的水凝胶中.合成完毕的水凝胶小球即完备的漆酶-介体微反应器,可发挥漆酶和介体的协同作用进行污染物的酶促转化.除制备条件的优化外,本工作对漆酶-介体微反应器的结构进行了系统的表征,并以孔雀石绿为模型污染物考察了其酶促催化转化性能.

2 结果与讨论

2.1 漆酶-介体微反应器的制备

相比于传统的先合成固定化材料再将漆酶载入材料中的后固定酶法,本工作采用了同步合成载体和固定漆酶-介体的凝胶包埋法.由于核壳结构的形成,无需另外添加交联剂以防止酶的泄露,从而避免了后交联过程对酶结构的破坏,载酶率^[17]高达93.5%.固定化漆酶-介体微反应器小球(LMMR)的制备过程见图1.

图1 固定化漆酶-介体微反应器的制备示意图

Figure 1 Schematic illustration of the one-pot process for the preparation of laccase-mediator microreactor (LMMR)

从应用的角度考虑,微反应器的外壳需要具备一定的机械强度,同时要保证底物与固定于小球内部的漆酶能够良好接触.此外,AA可以作为配体与铜离子进行络合,所以优化合成过程中壳聚糖、铜离子和AA的浓度分别为:40 g/L, 0.1 mol·L⁻¹, 10 mol·L⁻¹.其他物质,包括引发剂过硫酸钾、交联剂 *N,N*-亚甲基双丙烯酰胺(MBA)、聚合单体丙烯酰胺(AM)以及漆酶量都会影响到最终的酶活回收率,也需要优化.因此,本工作采用四因素、三水平的正交实验对上述参数进行了优化,设计参数见表1.最终根据酶活回收率,选取序号6实验组的各浓度值为最优的微反应器的合成参数.

表1 酶活回收的正交实验设计(壳聚糖:40 g/L, 硫酸铜:0.1 mol·L⁻¹, AA:10 mol·L⁻¹)

Table 1 Orthogonal array design for enzyme recovery (chitosan:40 g/L, copper sulfate:0.1 mol·L⁻¹, AA:10 mol·L⁻¹)

序号	酶浓度/(mg·mL ⁻¹)	KPS/g	MBA/g	AM/g	酶活回收 ^a /%
1	3	0.02	0.1	0.2	1.43
2	3	0.05	0.2	0.6	3.50
3	3	0.08	0.4	1.0	2.53
4	6	0.02	0.2	1.0	5.27
5	6	0.05	0.4	0.2	2.21
6	6	0.08	0.1	0.6	10.51
7	9	0.02	0.4	0.6	5.75
8	9	0.05	0.1	1.0	6.52
9	9	0.08	0.2	0.2	3.59

^a酶活回收定义为固载的酶活占总酶活的百分比.

为克服在聚丙烯酰胺凝胶合成中引发温度对酶活的影响,自由基引发剂最好能够在常温下实现对凝胶的合成^[18].之前有研究报道漆酶与AA可以作为复合引发剂引发丙烯酰胺凝胶的合成,引发机理为氧化态漆酶氧化AA产生乙酰丙酮活性自由基^[19].本工作首次采用KPS-AA作为复合引发剂,在常温甚至低温下(4℃)均能引发单体AM和MBA的聚合与交联.与KPS-AA复合体系相比,常温下同浓度的漆酶-AA所需引发时间长10倍,且合成的凝胶强度过低.通过电子自旋共振实验

证实漆酶-AA 产生的自由基信号较弱, 而 KPS-AA 产生的自由基信号较强(图 2). 通过计算 AA 在 UV 光照下产生的自由基的超精细耦合常数, 并与之前文献中报道的数据^[20]进行对比可知该自由基为乙酰自由基. KPS-AA 所产生的自由基信号与 UV/AA 体系相同. 由此推测过硫酸钾在常温下氧化乙酰丙酮产生乙酰自由基, 自身则分解为硫酸根自由基.

图 2 采用 POBN 为捕获剂所得不同复合引发体系的电子自旋共振图 (POBN: $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, KPS: $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, laccase: 150 mg/mL , AA: $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Figure 2 The electron spin resonance spectra of composite initiators with POBN as the capture agent (POBN: $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, KPS: $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, laccase: 150 mg/mL , AA: $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

2.2 微反应器的结构表征

图 3a~3d 为微反应器的扫描电镜图. 由图 3a 和图 3b 可见, 微反应器内部为三维网络结构的聚丙烯酰胺凝胶且具备丰富的孔道结构. 微反应器的外壳部分为片层状的壳聚糖铜络合物, 层与层之间的距离大约为 $5 \mu\text{m}$ (图 3c), 能够保证底物顺利通过. 没有 AA 参与合成的凝胶网络结构规整性差(图 3d). 进一步的氮气吸附实验表明微反应器的比表面积为 $16.8 \text{ m}^2/\text{g}$, 孔体积为 $0.024 \text{ m}^3/\text{g}$, 孔道主要为 $2 \sim 10 \text{ nm}$ 的介孔(图 3e). 微反应器的实物照片见图 3f. 通过控制滴液时的速度和枪头直径大小, 可获得直径范围在 $1.5 \sim 5.5 \text{ mm}$ 的微反应器小球.

通过测量酸性条件下微反应器的 Zeta 电位(6.8 mV), 得知微反应器表面带正电, 有利于阴离子染料的吸附. 垂直挤压实验证明微反应器小球在轴向上至少能承受 20 N 的力, 意味着在实际废水处理中微反应器能够承受水流的剪切力并保持结构的完整性.

2.3 微反应器的稳定性

微反应器的热稳定性见图 4a. 固定载体往往在空间结构上对酶进行了一定的限制, 所以由热导致的酶构象的改变程度减小, 酶的耐热性能得到提升. 微反应器在 65°C 的高温下存放 2 h 仍然保持了 42.5% 的酶活, 而游离漆酶的酶活只有 16.3% .

由图 4b 可见, 微反应器的最适 pH 较游离漆酶的要高, 更接近中性条件. 强酸性条件下, 微反应器的外壳

图 3 (a, b)内核的扫描电镜图、(c)外壳的电镜图、(d)没有 AA 参与合成的凝胶内部电镜图、(e)微孔道的尺寸分布图及(f)微反应器的实物照片

Figure 3 (a, b) SEM images of the inner part, (c) SEM image of the shell, (d) SEM image of a hydrogel bead without the use of AA in synthesis, (e) the pore size distribution of the LMMR beads and (f) the picture of LMMR

图 4 微反应器的 pH 稳定性(a)和耐热稳定性(b)

Figure 4 (a) pH stability and (b) thermal stability of LMMR

壳聚糖铜会逐渐溶解, 导致部分固定化酶的泄露.

2.4 微反应器对染料的降解性能

2.4.1 降解孔雀石绿

文献报道在没有介体 HBT 和 ABTS 存在的情况下, 漆酶不能有效地降解孔雀石绿^[21]. 由图 5a 知, 在前几个批次的循环中, 有 HBT 作为介体的漆酶组降解速率最快, 在前三个循环中 1 h 内脱色率就达到了 100%. 普遍认为 HBT 在漆酶的氧化作用下产生了高活性的氮自由基, 继而以抽氢的方式氧化目标污染物^[22,23]. 然而, HBT 组的降解速率在后面的循环中急剧下降, 原因在于高度活性的氮自由基与漆酶作用导致酶失活, 而自身转变为苯并三唑等无活性物质^[21].

图 5 游离和固定化漆酶对孔雀石绿的循环降解 (a)去除率, (b)一级动力学常数(酶活均为 1 U, 前 10 个循环中孔雀石绿的浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 此后的循环中孔雀石绿的浓度为 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, HBT 的浓度为 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)

Figure 5 The enzymatic conversion of malachite green (MG) by free and immobilized laccase (1 U)

(a) Removal rate, (b) the first-order kinetic rate constant. The concentration of MG was $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in the former 10 cycles and $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in the next cycles, $[\text{HBT}] = 0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

尽管微反应器的表面带正电, 导致阳离子染料会与微反应器小球表面产生一定的静电排斥作用, 但是在全部批次的降解实验中, 微反应器对染料的去除率都维持在较高的水平. 课题组之前的研究表明^[15,16], 不管是游离态还是固定态 AA 都具有介导漆酶氧化孔雀石绿的作用且提高了孔雀石绿的降解总量. 在本工作的微反应器小球制备实验中, AA 首先作为复合引发剂中的活性组分引发凝胶聚合, 然后被固定到聚丙烯酰胺的聚合链中. 在微反应器小球降解孔雀石绿的实验中与游离漆酶加 AA 的体系类似^[16], 也出现了后期加速的现象, 说明固定化后的 AA 仍然起到了介体的作用. 同时由于对介体和漆酶的双重固定使得漆酶的酶活得以很好的保持, 微反应器在经过 17 个批次的循环实验之后仍能保持 50% 以上的孔雀石绿去除率(每一批次结束之后). 作为对照, 没有 AA 参与引发合成的壳聚糖小球固定化漆酶

(LMR)在经历了四个批次的循环之后几乎失去了降解能力, 进一步证明了 AA 在固定化漆酶催化降解孔雀石绿的过程中发挥了重要作用. 另外值得注意的是固定化漆酶(包括 LMMR 和 LMR)在第一个循环中的降解速率都明显偏低(图 5b), 可能的原因是底物需要一定的时间进入到固定载体中与酶接触.

2.4.2 吸附阴离子染料

阴离子染料酸性橙 7 和茜素红都可以被快速地吸附到微反应器的表面. 染料的脱色符合一级吸附动力学模型, 最大吸附量分别为 15.4 和 25.2 mg/g. 说明该微反应器小球在催化降解中具有良好的预富集作用.

3 结论

通过滴球法合成了具有核壳结构的漆酶-介体微反应器, 完成了对漆酶和介体的双重固定. 相比于传统的凝胶包埋法, 该方法合成步骤简单且固定化过程中酶活损失小. 外层的壳聚糖铜络合物使微反应器小球具备一定的机械强度, 内部丰富的孔道结构使微反应器拥有更高的载酶率. 微反应器中固定酶的热稳定性得到了提高, 但需注意微反应器不能在过酸的环境中使用. 微反应器可循环应用于孔雀石绿溶液的降解, 体现出了漆酶和介体双重固定化的优势.

4 实验部分

4.1 化学试剂

云芝漆酶(*T. versicolor* laccase), 标称酶活大于 10.0 U/mg, 采购自 Sigma-Aldrich 公司. 孔雀石绿、酸性橙 7、茜素红、乙酰丙酮、醋酸钠、过硫酸钾和壳聚糖(80%~95%脱甲基化)均是分析纯, 采购自上海试剂厂. 用于测蛋白质含量的 Bradford reagent 采购自 Sango Biotech 公司. 五水硫酸铜购自南京化学试剂厂. 茜素红购自天津化学试剂厂. 其他的化学试剂包括测量酶活时漆酶的底物 2,2'-联氮-双(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS), 介体 1-羟基-苯并-三氮唑(HBT), 醋酸, 丙烯酰胺, 自由基捕获剂 α -(4-吡啶基-1-氧)-*N*-叔丁基硝基酮(POBN)和交联剂 *N,N*-亚甲基双丙烯酰胺(MBA)均采购自 Sigma-Aldrich 公司.

4.2 微反应器的制备

首先确定合适的壳聚糖、AA 和硫酸铜的浓度来合成具备一定机械强度的壳聚糖铜小球. 经过几次初步尝试, 确定壳聚糖醋酸溶液(1 wt%)的浓度为 40 g/L, 硫酸铜的浓度为 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, AA 的浓度为 $10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 采用四因素、三水平的正交实验设计获得其他物质最佳的合成浓度.

具体的合成步骤如下: 首先将 0.6 g AM 和 0.1 g MBA 溶解在 15 mL 的壳聚糖溶液. 然后, 将 5 mL 漆酶溶液(3 mg/mL), 100 μL AA 和 0.08 g KPS 加入到壳聚糖

溶液中. 对混合液进行曝氮气和磁力搅拌 10 min, 得到最终的混合液. 接下来用注射器吸取混合液滴入到 100 mL 浓度为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸铜溶液中, 形成壳聚糖铜小球. 静置 0.5 h, 待小球内部的聚丙烯酰胺凝胶完全形成后(可通过观察小球的颜色变化, 小球中心完全变白时说明凝胶完全形成), 将小球反应器从硫酸铜溶液中取出, 用超纯水多次冲洗, 得到最终的漆酶-介体微反应器(laccase-mediator-microreactor, LMMR). 最后, 将微反应器小球置于超纯水中保存, 也可冷冻干燥后于保鲜袋中保存. 作为对照, 采用同样的合成方法和实验参数制备了不含介体 AA 的壳聚糖铜固定化酶小球(laccase-microreactor, LMR).

4.3 载酶率的测量

载酶率定义为载入固定化材料中的酶占总酶的百分比. 当聚丙烯酰胺凝胶彻底形成取出后, 收集硫酸铜络合液测量载酶率.

载酶率测量之前需绘制不同酶浓度(125~750 $\mu\text{g/mL}$)的标准曲线. 利用考马斯亮蓝与酶蛋白作用显色的原理, 用日本岛津公司的 UV-2700 紫外可见分光光度计测定 595 nm 处的吸光度值在 5 min 内的变化. 酶活的测量以 ABTS 为作用底物, 控制 ABTS 浓度为 $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 监测初始 2 min 内 420 nm 吸光度值的变化.

4.4 酶稳定性的测量

在 pH (2.6~6.0) 范围内 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液中对微反应器小球和游离酶的 pH 稳定性, 游离酶的浓度控制在 20 mg/L.

分别将游离酶和微反应器小球置于 65 $^{\circ}\text{C}$, pH 4.0 醋酸溶液中, 通过检测不同时间段的剩余酶活来表征酶的耐热性能. 控制游离酶的浓度为 20 mg/L, 微反应器小球的浓度 1.5 mg/L. 漆酶样品每 30 min 取出一次进行酶活的测量.

4.5 微反应器的表征

对微反应器小球内部微观形貌表征采用的是日立株式会社の S-3400N II 扫描电镜. 微反应器小球的比表面积、孔容和孔径分布分别采用多点 Brunauer-Emmett-Teller (BET), Barret-Joyner-Halenda (BJH) 脱附模型和密度泛函理论(DFT)拟合由美国 Quantochrome 公司的 Autosorb-iQ 全自动氮气吸附仪所测氮气吸附等温线获得. 取适量微反应器小球研磨成粉末, 超声震荡 1 h 后用 Malvern Zetasizer Nano ZS90 电位仪测量小球表面的 Zeta 电位. 将微反应器小球置于分析天平上, 在小球垂直方向向下施加一定的压力, 直到小球发生破裂, 记录所需的外力, 重复 30 次, 测算小球的轴向力学性能.

4.6 孔雀石绿染料的降解实验

对孔雀石绿的降解采用批次循环实验进行. 一共设计三组实验, 将含 0.5 U 酶活的微反应器小球、游离酶和游离酶-0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HBT 混合液分别一次性加入到 50

mL 浓度为 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的孔雀石绿溶液中(pH 4.0 的醋酸溶液). 脱色率用一定时间内 617 nm 吸光度值的变化来表征. 当吸光度值不变时, 加入下一批次的孔雀石绿储备液到三种酶催化体系, 使孔雀石绿的浓度达 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 在循环降解过程中不分离回收催化剂, 也不再添加额外的催化剂, 整个反应过程不考虑催化剂的损失.

4.7 酸性橙 7 和茜素红的吸附脱色

取 0.5 U 酶活的微反应器小球分别加入到 50 mL 浓度为 $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的酸性橙 7 和茜素红溶液中进行吸附, 分别用 484 和 423 nm 的吸光度值计算其脱色率.

致谢

感谢阳花同学在实验中提供的帮助.

References

- [1] Rahman, I. A.; Saad, B.; Shaidan, S.; Rizal, E. S. S. *Bioresour. Technol.* **2005**, *96*, 1578.
- [2] Berberidou, C.; Poullos, I.; Xekoukoulotakis, N. P.; Mantzavinos, D. *Appl. Catal., B* **2007**, *74*, 63.
- [3] Chen, C. C.; Lu, C. S.; Chung, Y. C.; Jan, J. L. *J. Hazard. Mater.* **2007**, *141*, 520.
- [4] Song, X. J.; Wu, B. D.; Zhang, S. J. *Acta Chim. Sinica* **2014**, *72*, 461. (宋孝杰, 吴兵党, 张淑娟, 化学学报, **2014**, *72*, 461.)
- [5] Pandey, A.; Singh, P.; Iyengar, L. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2007**, *59*, 73.
- [6] Michniewicz, A.; Ledakowicz, S.; Ullrich, R.; Hofrichter, M. *Dyes Pigm.* **2008**, *77*, 295.
- [7] Huang, J.; Zhou, J. Y.; Xiao, H. Y.; Long, S. Y.; Wang, J. T. *Acta Chim. Sinica* **2005**, *63*, 1343. (黄俊, 周菊英, 肖海燕, 龙胜亚, 王军涛, 化学学报, **2005**, *63*, 1343.)
- [8] Durán, N.; Rosa, M. A.; D'Annibale, A.; Gianfreda, L. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31*, 907.
- [9] Cetinus, S. A.; Sahin, E.; Saraydin, D. *Food Chem.* **2009**, *114*, 962.
- [10] Rosevear, A.; Kent, C. A.; Thomson, A. R.; Bucke, C. In *Enzyme Engineering*, Vol. 4, Eds.: Broun, G.; Manecke, G.; Wingard, L., Jr., Springer, US, **1978**, p. 415.
- [11] Tanaka, H.; Kurosawa, H.; Kokufuta, E.; Veliky, I. A. *Biotechnol. Bioeng.* **1984**, *26*, 1393.
- [12] de Alteriis, E.; Parascandola, P.; Pecorella, M.; Scardi, V. *Biotechnol. Tech.* **1988**, *2*, 205.
- [13] Dealteriis, E.; Parascandola, P.; Salvatore, S.; Scardi, V. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1985**, *35*, 60.
- [14] Zouari-Mechichi, H.; Mechichi, T.; Dhoub, A.; Sayadi, S.; Martínez, A. T.; Martínez, M. J. *Enzyme Microb. Technol.* **2006**, *39*, 141.
- [15] Yang, H.; Sun, H. F.; Zhang, S. J.; Wu, B. D.; Pan, B. C. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 10882.
- [16] Sun, H. F.; Huang, W. G.; Yang, H.; Zhang, S. J. *J. Colloid Interface Sci.* **2016**, *471*, 20.
- [17] Daassi, D.; Rodríguez-Couto, S.; Nasri, M.; Mechichi, T. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2014**, *90*, 71.
- [18] Sun, H.; Yang, H.; Huang, W.; Zhang, S. J. *Colloid Interface Sci.* **2015**, *450*, 353.
- [19] Ikeda, R.; Tanaka, H.; Uyama, H.; Kobayashi, S. *Macromol. Rapid Commun.* **1998**, *19*, 423.
- [20] Nakao, L. S.; Kadiiska, M. B.; Mason, R. P.; Grijalba, M. T.; Augusto, O. *Free Radical Biol. Med.* **2000**, *29*, 721.
- [21] Camarero, S.; Ibarra, D.; Martínez, M. J.; Martínez, A. T. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 1775.
- [22] Xu, F.; Kulys, J. J.; Duke, K.; Li, K. C.; Krikstopaitis, K.; Deussen, H. J. W.; Abbate, E.; Galinyte, V.; Schneider, P. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 2052.
- [23] Fabbrini, M.; Galli, C.; Gentili, P. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, *16*, 231.

(Zhao, C.)