

# 木质素过氧化物酶在球型介孔材料上的固定化特性研究

徐龙乾<sup>1</sup>, 文湘华<sup>1\*</sup>, 丁杭军<sup>2</sup>

(1. 清华大学环境科学与工程系, 北京 100084; 2. 北京科技大学材料科学与工程学院, 北京 100083)

**摘要:**在醋酸-醋酸钠缓冲体系 (pH = 3.5) 中以聚乙二醇-聚丙三醇-聚乙二醇三嵌段共聚物 (P123) 为模板, 正硅酸甲酯 (TMOS) 为硅源, 1, 3, 5-三异丙基苯 (TIPB) 为扩孔剂合成了具有规则六方形孔道 (11.6 nm) 的微米级球型颗粒. 以合成的介孔材料为载体, 采用物理吸附法对木质素过氧化物酶 (LiP) 进行固定化, 研究了初始酶量和固定化时间等因素对固定化效果的影响, 以及固定化对 LiP 酶学性质和稳定性的影响. 结果表明, 当初始酶量 ( $E$ ) 与载体量 ( $MS$ ) 比为 76.8 mg/g, 固定化反应 12 h 时, 固定化 LiP 可获得最大蛋白质负载量 (8.87 mg/g) 和最大表观活性 (41.45 U/mg). 与游离酶相比, 固定化 LiP 的最适 pH 和温度均未有明显变化, 但 pH 稳定性和热稳定性都有了不同程度的提高, 在 4℃ 条件下保存 7 周后固定化 LiP 活性几乎没有损失, 且在重复使用 6 次后, 可保留近 30% 的活性.

**关键词:**介孔材料; 固定化; 木质素过氧化物酶; 稳定性

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)10-2493-07

## Immobilization of Lignin Peroxidase on Spherical Mesoporous Material

XU Long-qian<sup>1</sup>, WEN Xiang-hua<sup>1</sup>, DING Hang-jun<sup>2</sup>

(1. Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China; 2. School of Materials Science and Engineering, University of Science & Technology Beijing, Beijing 100083, China)

**Abstract:** The spherical mesoporous particles with two-dimensional (2D) hexagonal mesopores in diameter up to 11.6 nm was fabricated in acetic acid/sodium buffer solution (pH = 3.5) by using tetramethoxysilane (TMOS) as silica source, Pluronic P123 as template and 1,3,5-triisopropylbenzene (TIPB) as swelling agent. Then the mesoporous particles were employed as carriers for the immobilization of lignin peroxidase (LiP). The effect of immobilization time, the amount of added enzyme on the immobilized enzyme amount and activities were investigated. The characteristic and stability of immobilized LiP were also studied. The results showed that, as the mass ratio of enzyme ( $E$ ) and mesoporous material ( $MS$ ) was 76.8 mg/g, immobilizing time was 12 h, the largest immobilized enzyme amount (8.87 mg/g) and highest apparent activity (41.45 U/mg) of immobilization LiP were achieved. Comparing with free LiP, the optimum pH and temperature of the immobilized LiP were almost the same, while whose pH stability and thermal stability were significantly improved. No obvious activity loss was observed for the immobilized LiP after 7 weeks storage at 4℃. After 6 times of usage, almost 30% of the initial activity could still remain.

**Key words:** mesoporous material; immobilization; lignin peroxidase (LiP); stability

木质素过氧化物酶 (lignin peroxidase, LiP, EC1.11.1.14) 是一种含  $Fe^{3+}$ 、卟啉环和血红素 (Heme) 辅基的过氧化物酶<sup>[1]</sup>, 广泛存在于白腐真菌中. 木质素过氧化物酶不仅对木质素及其衍生物有极强的降解能力, 还能非特异性地降解多环芳烃 (PAHs)<sup>[2]</sup>、挥发性有机物<sup>[3]</sup>、酚类化合物<sup>[4, 5]</sup>、合成染料<sup>[6, 7]</sup>等难降解污染物, 在水污染控制、土壤修复等方面具有非常广阔的应用前景<sup>[8-10]</sup>. 但由于游离态木质素过氧化物酶具有仅能一次性使用、难以连续化操作、容易变形失活等缺点, 限制了其大规模实际应用. 酶的固定化技术是解决这一问题的最有效方法之一.

自 1992 年美国 Mobil 公司首次合成了 M41 系列有序介孔分子筛以来<sup>[11]</sup>, 有序介孔材料就因其均

一可调的孔径、大的比表面积、规则的孔道结构、较大的孔容和易于表面修饰等特点<sup>[12, 13]</sup>, 被广泛作为生物大分子的载体材料. 目前已有近百种酶通过各种方法被成功固定到有序介孔材料上<sup>[14, 15]</sup>, 固定化酶的稳定性都有不同程度的提高, 且实现了循环重复使用. 研究表明, 介孔材料的孔径<sup>[16-18]</sup>和形貌结构是影响固定化效果的关键因素, 只有当载体的孔径大于酶分子时, 酶才能顺利进入孔道内部实现负载, 如果孔径太小就会影响固定化速率, 减少酶的负

收稿日期: 2009-12-07; 修订日期: 2010-03-01

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20677033); 国家重点实验室专项基金项目 (08Z01ESPCT)

作者简介: 徐龙乾 (1984 ~ ), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为生物酶的固定化, E-mail: xlg07@mails.tsinghua.edu.cn

\* 通讯联系人, E-mail: xhwen@tsinghua.edu.cn

载量;另一方面,Katiyar 等<sup>[19]</sup>和 Lei 等<sup>[20]</sup>的研究表明,宏观形貌为球状或短棒状的介孔材料的负载速率更快、负载容量更大.因此大孔径的球状介孔材料更适合作为生物大分子的固定化载体.

然而,迄今鲜有应用介孔材料负载木质素过氧化物酶的研究报道.本课题组之前已系统研究了孔径为 8.4~18.8 nm 的球型介孔材料的合成条件.本实验首先在确定条件下合成了球型大孔有序介孔材料,并对其进行表征分析,确定其理化性质.然后,以介孔材料为载体,采用吸附固定化的方式对木质素过氧化物酶进行固定化,研究了酶量、固定化时间等因素对固定化效果的影响,以及固定化对 LiP 酶学性质和稳定性的影响.

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

聚乙二醇-聚丙三醇-聚乙二醇三嵌段共聚物(P123, Aldrich 公司,美国),正硅酸甲酯(TMOS, J&K Chemical 公司,北京),1,3,5-三异丙基苯(TIPB, Alfa Aesar 公司,美国),藜芦醇(VA, Tokyo Kasei Kogyo 公司,日本),其余均为国产分析纯试剂,试验用水为去离子水.

SR-4 数显恒温磁力、水浴锅(天津市欧诺仪器仪表有限公司),DZF-6020 型真空干燥箱(上海一恒科技有限公司),UV-2550 型紫外可见分光光度计(日本 SHIMADZU 公司),QB-228 型旋转培养器(海门市齐林贝尔仪器制造有限公司),JH-2 马弗炉(上海新诺仪器厂),JSM-7401 扫描电镜(日本 JEOL 公司),JEM-2010 透射电镜(日本 JEOL 公司),12 kW 转靶 X 射线衍射仪(日本理学株式会社),ASAP-2010 型比表面积和孔隙率测定仪(美国 Micromeritics 公司).

### 1.2 木质素过氧化物酶的制备

通过在 Tien & Kirk 培养基<sup>[21]</sup>中培养黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*) BKM-F-1767(ATCC24725)获得 LiP 粗酶液,经超滤浓缩后备用.其中,酶液蛋白质浓度为 0.24 mg/mL, pH = 4.5, LiP 活性为 10.52 U/mL.

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 介孔材料的合成

将 2.0 g P123 和 3.2 g 无水乙醇溶解混合于 60 mL 醋酸-醋酸钠缓冲溶液中(1.5 mol/L, 1.0 mol/L, pH = 3.5),将混合液置于 15℃ 条件下、至完全混合,加入 5.0 mL 的 TMOS 和 0.98 mL 的

TIPB,继续在 15℃ 条件下、24 h,之后将反应体系转移至有聚四氟乙烯内衬的高压反应釜中,在 120℃ 条件下放置 48 h.然后对反应体系进行抽滤处理,得到白色粉末,最后将白色粉末置于马弗炉中,于 550℃ 条件下进行脱模板处理 6 h,即得目的样品.

#### 1.3.2 木质素过氧化物酶的固定化

称取 10 mg 介孔材料置于一定体积的木质素过氧化物酶原酶液中,轻摇混匀后置于 4℃、20 r/min 的旋转培养器中,负载一定时间后在 6 000 r/min 的条件下离心 15 min,并用与原酶液 pH 相同的缓冲溶液进行充分洗涤至上清液中 LiP 活性为 0,最后通过冷冻干燥法制得干粉状固定化 LiP.

#### 1.3.3 木质素过氧化物酶活性的测定

游离 LiP 活性的测定<sup>[21]</sup>:在 30℃ 条件下,利用藜芦醇(VA)为底物,用紫外分光光度计检测 310 nm 处 30 s 内吸光度的变化,从而得知酶反应速率,进而推算活性.定义 1 min 氧化 1 μmol 的 VA 所需酶量为 1 个酶活单位.

固定化 LiP 活性的测定:称取 5 mg 固定化酶,投加到 0.25 mL 的酒石酸-钠缓冲溶液中(pH = 4.5),将其分散均匀按照游离酶方法测定.

#### 1.3.4 固定化蛋白量的计算

以牛血清蛋白为标准物,利用 Bradford 法测定蛋白质的含量.固定化蛋白量为加入前原酶液中的蛋白量与洗涤液中蛋白量的差值.

#### 1.3.5 固定化 LiP 的稳定性

pH 稳定性:将适量的固定化 LiP 和游离 LiP 分别置于不同 pH 的缓冲溶液中,每隔一段时间测定其酶活.

热稳定性:将适量的固定化 LiP 和游离 LiP 分别置于 30、45、60℃ 水浴中温育,每隔一段时间测定其酶活.

重复使用稳定性:每次催化反应结束后,在 3 000 r/min 条件下离心 15 min 后将固定化 LiP 从反应液中回收,用缓冲溶液(pH = 4.5)清洗后重新加入到新的反应体系中,检测其活性.

储存稳定性:将干粉固定化 LiP、分散在缓冲溶液(pH = 4.5)中的固定化 LiP 和游离 LiP 均置于 4℃ 条件下保存,每隔一段时间测定其活性.

所有试验均在 2 mL 的离心管中进行,且均设置 2 个平行样,以酶活的变化为指标考察酶的稳定性.酶活用 2 个平行样的平均值加误差表达.

## 2 结果与讨论

### 2.1 介孔材料表征

采用扫描电镜对合成的介孔材料进行观察,结果如图 1 所示,样品的宏观形貌为  $\mu\text{m}$  级球型颗粒,粒径在  $0.5 \sim 1.5 \mu\text{m}$  之间,材料形貌符合固定化酶的要求.图 2 显示的是样品的小角 X-射线衍射图谱,其中,  $0.96^\circ$  处的主衍射峰和  $2.13^\circ \sim 2.55^\circ$  处的衍射峰分别代表 100、110 和 200 晶面的衍射,这说明介孔材料拥有规则有序的六边形孔道.图 3 所示的透射电镜图片进一步证明了这一点,其中的六方形孔道大小均一且整齐排列.为了进一步掌握介孔材料的平均孔径和孔径分布,对样品进行了氮气吸脱附分析,结果如图 4 所示,  $\text{N}_2$  吸脱附等温线呈典型的 IV 类曲线,说明该样品为典型的介孔材料,在  $p/p_0$  为  $0.7 \sim 0.9$  时,吸附支和脱附支都具有陡峭的升降,且有较大的 H1 型滞后环出现,说明样品具有非常均匀的孔道和较大的孔径<sup>[22]</sup>.图 5 中的孔径分布曲线显示,样品的孔径分布非常均一,平均孔径为  $11.6 \text{ nm}$ ,大于 LiP 各维尺度 ( $5.0 \text{ nm} \times 4.0 \text{ nm} \times 4.0 \text{ nm}$ )<sup>[23]</sup>,完全满足固定化载体的要求.

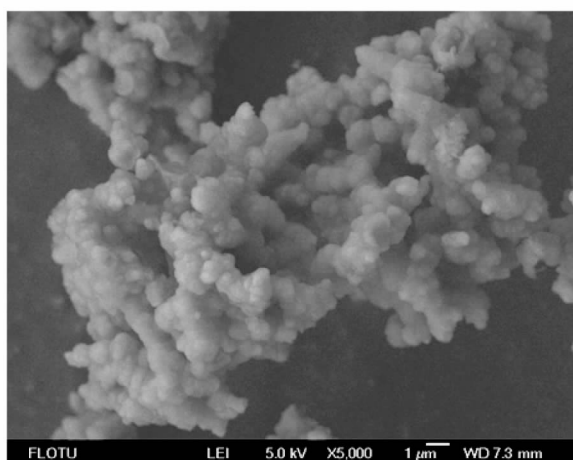


图 1 介孔材料的扫描电镜图片

Fig. 1 SEM micrograph of the mesoporous material

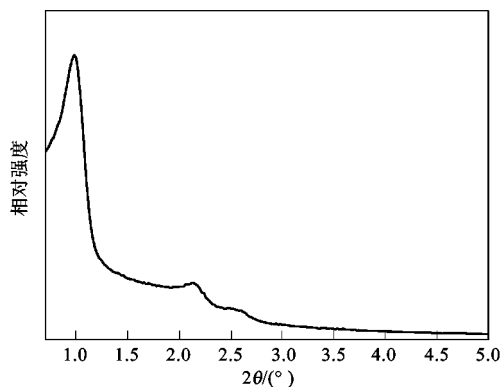


图 2 介孔材料的 X 射线衍射图谱

Fig. 2 XRD pattern of the mesoporous material

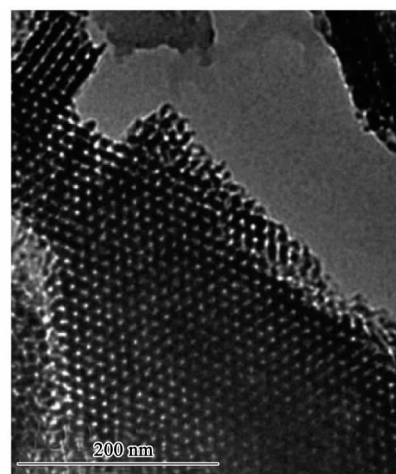


图 3 介孔材料的透射电镜图片

Fig. 3 TEM micrograph of the mesoporous material

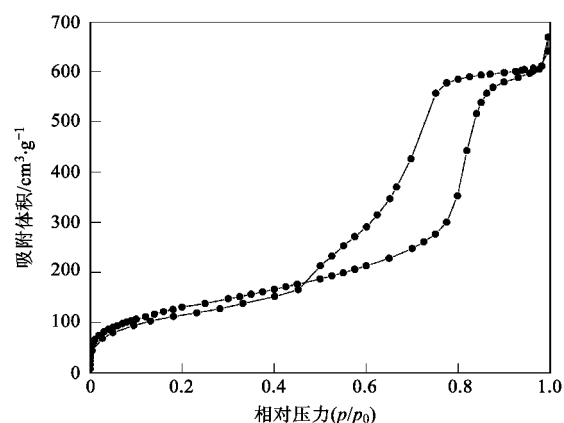
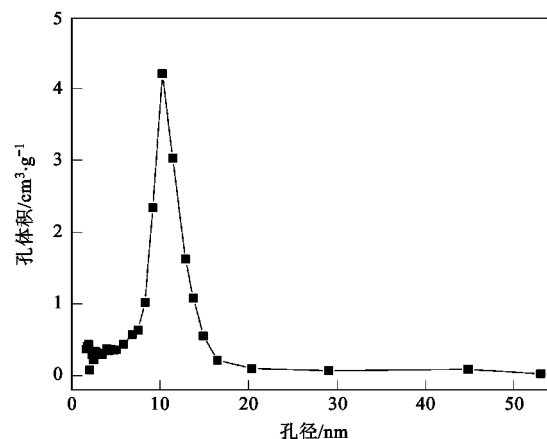
图 4 介孔材料的  $\text{N}_2$  吸附-脱附曲线Fig. 4  $\text{N}_2$  adsorption-desorption isotherm of the mesoporous material

图 5 介孔材料的孔径

Fig. 5 Pore size distribution of mesoporous material

## 2.2 固定化 LiP 的影响因素

### 2.2.1 初始酶量对固定化 LiP 的影响

按 1.3.2 方法,以合成的介孔材料为载体,在不同初始酶量条件下固定化反应 24 h 制备固定化 LiP. 结果如图 6 所示,随着初始酶量的增加,负载到介孔材料上的蛋白质量不断增加,且当酶投加量较少时增加速度较快,但随着初始酶量的继续增加,负载蛋白量的增速趋缓,当投加的初始酶量( $E$ )与载体量( $MS$ )比为 76.8 mg/g 时,蛋白质的固定量达到最大值(8.45 mg/g). 从图 7 中可看出,固定化 LiP 活性与初始酶量有类似的变化趋势,固定化 LiP 活性随初始酶量的增加而急剧上升,当初始酶量与载体量比为 76.8 mg/g 时,固定化 LiP 的活性达到最大值(38.7 U/mg),之后固定化 LiP 活性基本不再随初始酶量的增加而发生变化. 由上可见,当初始酶量与载体量比为 76.8 mg/g 时,介孔材料对 LiP 的吸附达到饱和,同时固定化 LiP 也具备了最大催化活性.

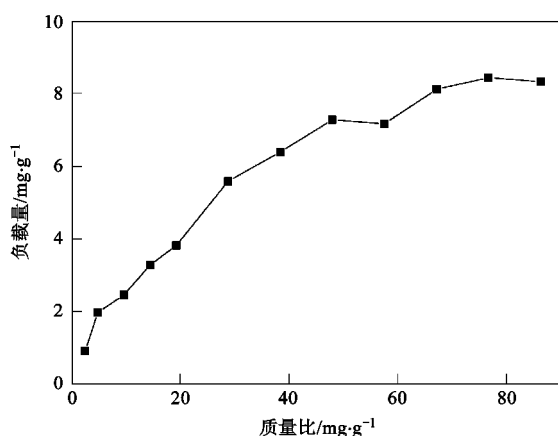


图 6 初始酶量对负载酶量的影响

Fig. 6 Effect of the amount of enzyme on the amount of the immobilized enzyme

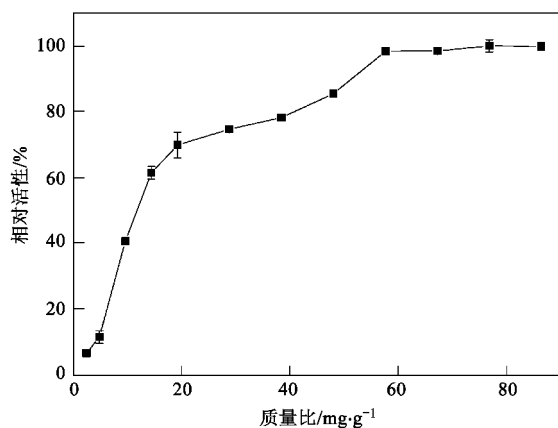


图 7 初始酶量对固定化 LiP 活性的影响

Fig. 7 Effect of the amount enzyme on the activity of the immobilized LiP

## 2.2.2 固定化时间对固定化 LiP 的影响

按 1.3.2 方法,以合成的介孔材料为载体,在不同初始酶量与载体量比为 76.8 mg/g 条件下,选择不同的负载时间制备固定化酶,试验结果如图 8 和图 9 所示,蛋白质的负载量和固定化酶的活性都随着负载时间的增加而增加,当负载时间为 8 h 时,蛋白质的吸附量开始趋于饱和,负载量基本不再随负载时间的增加发生变化,其中检测到的蛋白质最大负载量为 8.46 mg/g. 同样,当负载时间为 12 h 时,固定化 LiP 的活性达到最大值,表观活性为 38.7 U/mg,但随着负载时间的继续增加,固定化 LiP 的活性开始逐渐变小. 这是因为 LiP 酶分子首先会占用载体的外表面,然后缓慢地向载体的内部移动,但移动到孔道内的 LiP 分子的空间构型会受到影响<sup>[24]</sup>,从而导致了活性的损失. 另外,固定在孔道内部的 LiP 酶,由于受

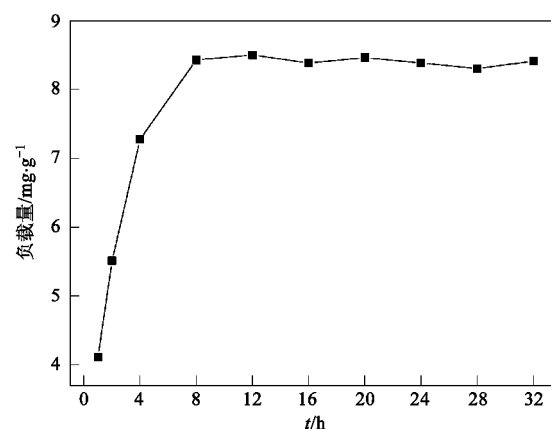


图 8 固定化时间对负载酶量的影响

Fig. 8 Effect of immobilization time on the amount of the immobilized enzyme

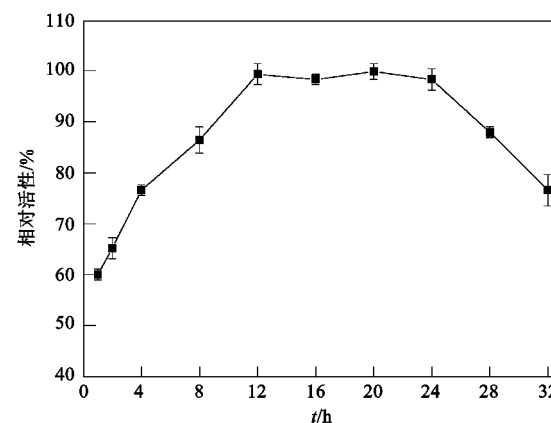


图 9 固定化时间对固定化 LiP 活性的影响

Fig. 9 Effect of immobilization time on the activity of the immobilized LiP

到空间位阻和质量传递的影响, LiP 的活性部位更容易被覆盖, 底物分子的扩散不但受到影响, 而且不易靠近活性中心, 降低了 LiP 的催化活性<sup>[25]</sup>.

综上所述, 采用介孔材料固定木质素过氧化物酶的最适宜条件为: 初始酶量与载体量比为 76.8 mg/g, 固定化反应 12 h. 在此条件下, 固定化 LiP 可获得最大蛋白质负载量 (8.87 mg/g) 和最大表观活性 (41.45 U/mg), 表观活性远大于文献报道的采用碳纳米管<sup>[26]</sup> (38.7 U/g) 和纳米金<sup>[27]</sup> (1.7 U/g) 为载体固定 LiP 时获得的效果. 这首先是因为介孔材料表面的硅羟基提供了有利于 LiP 活性发挥的微环境, 再者是因为本实验采用物理法将 LiP 负载到介孔材料上, 结合力主要为范德华力、氢键和亲水作用等非特异性物理吸附, 这些作用力较好地保护了 LiP 的空间构象、活性区域, 减少了 LiP 的活性损失.

## 2.3 固定化 LiP 的酶学性质

### 2.3.1 固定化 LiP 的最适 pH 及其稳定性

分别在不同的 pH (1.9 ~ 8.6, 30℃) 条件下测定固定化 LiP 和游离 LiP 的活性, 以确定其最适 pH, 结果如图 10 所示. 固定化 LiP 具有与游离 LiP 相似的 pH-活力轮廓图. 其中, 固定化 LiP 和游离 LiP 的最佳反应 pH 都为 3.5, 这表明固定化操作并未影响 LiP 周围离子的静电荷, 因此对 LiP 的三维构象的影响也会较小, 可最大程度地保留 LiP 的活性<sup>[28]</sup>. 而且, 固定化 LiP 在非最佳 pH 条件下的活性都有不同程度地提高, 如固定化 LiP 在 pH 为 1.9 ~ 4.0 之间具有较高的催化活性, 由此可见, 固定化 LiP 对 pH 变化有了更强的适应性. 进一步开展了固定化 LiP 对 pH 稳定性的研究, 将固定化 LiP 和游离 LiP 分别置于 pH 为 1.9、3.0 和 4.5 的 3 种缓冲溶液中, 每隔一段时间测定固定化 LiP 和游离 LiP 活性在不同 pH 下随时间的变化, 结果如图 11 所示, 当 pH 为 3.0 和 4.5 时, 固定化 LiP 和游离 LiP 活性随时间的变化趋势基本相同, 4 h 后仍能保持 98% 左右的活性. 而当 pH 为 1.9 时, 固定化 LiP 比其游离酶具有更强的 pH 稳定性, 4 h 后游离 LiP 仅保持了 62.7% 的活性, 而固定化 LiP 存留了 74.2% 的活性, 说明固定化 LiP 对酸性环境有更强的适应性和耐受性. 这是因为介孔材料表面富含硅羟基, 为 LiP 提供了亲水的微环境, 从而提高了 LiP 对 pH 适应的宽度和对非最佳 pH 的稳定性<sup>[29]</sup>.

### 2.3.2 固定化 LiP 的最适温度和热稳定性

分别在最适 pH, 不同温度 (20 ~ 65℃) 条件温育后, 测定固定化 LiP 和游离 LiP 的活性, 以确定最

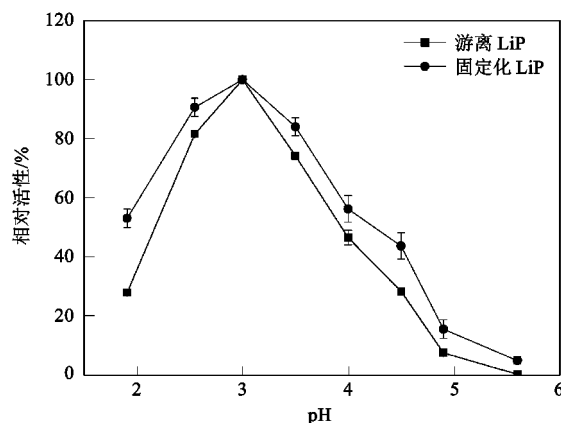


图 10 pH 对 LiP 活性的影响

Fig. 10 Effect of pH on the LiP activity

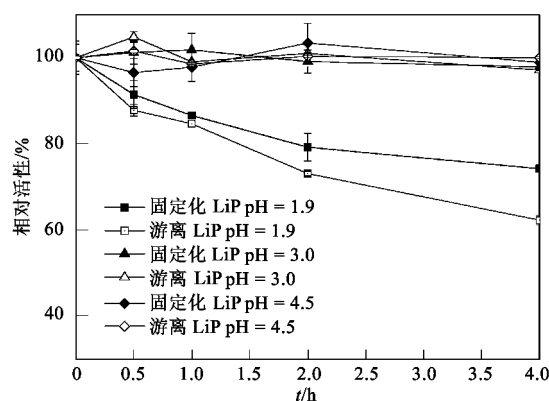


图 11 pH 对 LiP 稳定性的影响

Fig. 11 Effect of pH on the LiP stability

适温度, 结果如图 12 和图 13 所示. 结果显示固定化 LiP 与游离 LiP 具有相似的温度-活力轮廓图. 从图 12 中可看出, 在 25 ~ 45℃ 的温度范围内, 固定化 LiP 和游离 LiP 都具有较高的活性. 继续升高温度会导致游离 LiP 的活性的急剧下降, 而固定化 LiP 表现出对高温有较强的耐受力, 在温度为 60℃ 时, 仍保持了 54.8% 的活性. 另外, 研究中还考察了固定化 LiP 和游离 LiP 在不同温度下活性随时间的变化, 结果如图 13 所示, 当温度为 30、45、60℃ 时, 固定化 LiP 和游离 LiP 活性随时间的变化趋势基本相同, 60 min 后分别能保持大约 99%、91% 和 56% 左右的活性. 由此可知, 经过固定化后, LiP 对高温的适应性有所提高, 这应该是因为 LiP 酶分子被吸附在介孔材料表面或孔道内部后, 其构象比较稳定, 酶分子构象改变的自由度降低, 从而保持了好的高温适应性<sup>[30]</sup>.

### 2.3.3 固定化 LiP 的储存稳定性

游离状态的木质素过氧化物酶在放置一段时间

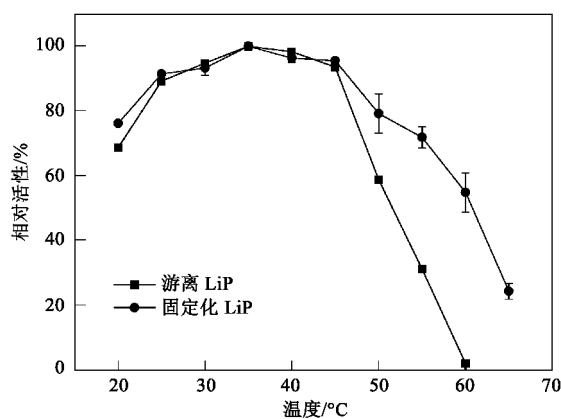


图 12 温度对 LiP 活性的影响

Fig. 12 Effect of temperature on the LiP activity

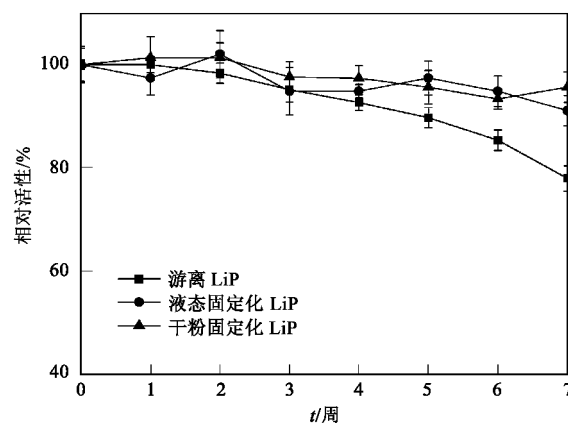


图 14 LiP 的储存稳定性

Fig. 14 Storage stability of LiP

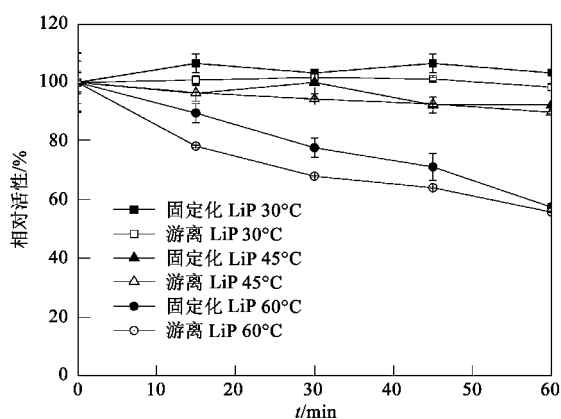


图 13 温度对 LiP 稳定性的影响

Fig. 13 Effect of temperature on the LiP stability

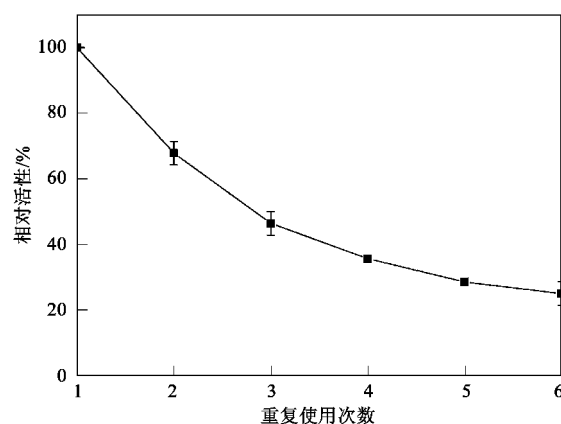


图 15 固定化 LiP 的重复使用稳定性

Fig. 15 Operational stability of immobilized LiP

后其酶活会有很大损失,对其进行固定化处理后有望提高其储存稳定性.把干粉固定化 LiP、溶液固定化 LiP 和游离 LiP 放置在4℃条件下考察其储存稳定性,结果如图 14 所示,从中可看到,干粉固定化 LiP 和溶液固定化 LiP 具有更强的稳定性,在放置 7 周后,仍保持了 97% 左右的活性,而游离 LiP 则仅剩 78% 的活性;因此,固定化操作大大提高了木质素过氧化物酶的储存稳定性.推测这是多种因素综合作用的结果,例如固定化载体对微环境的改进、载体形貌促进了 LiP 空间构象的维持,结合力对酶分子的束缚等因素.

### 2.3.4 固定化 LiP 的重复使用稳定性

固定化酶的一个显著优点是易于回收,可以重复使用,从而方便操作,降低使用成本.按 1.3.5 方法考察固定化 LiP 的重复使用稳定性,结果如图 15 所示,在重复使用 6 次后,固定化 LiP 仍能保持 30% 左右的活性,说明该方法制得的固定化酶有较好的

重复使用性.固定化 LiP 重复使用后酶活性的降低是因为介孔材料和 LiP 结合主要是依靠非共价键结合力,如范德华力、静电作用、氢键作用和亲水作用等,而这些作用力都相对较弱,在循环使用过程中容易被破坏,从而导致 LiP 从载体中泄露出来.

## 3 结论

(1)在醋酸-醋酸钠缓冲体系(pH = 3.5)中以聚乙二醇-聚丙三醇-聚乙二醇三嵌段共聚物(P123)为模板,正硅酸甲酯(TMOS)为硅源,1,3,5-三异丙基苯(TIPB)为扩孔剂合成了具有规则六方形孔道的 $\mu\text{m}$ 级球状颗粒,颗粒的粒径在0.5~1.5 $\mu\text{m}$ 之间,且六方形孔道排列整齐,大小均一,平均孔径为11.6 nm.为木质素过氧化物酶(5.0 nm × 4.0 nm × 4.0 nm)的优良载体.

(2)当初始酶量与载体量比为76.8 mg/g、固定

化反应 12 h 时,固定化 LiP 获得最大蛋白质负载量 (8.87 mg/g) 和最大表观活性 (41.45 U/mg)。与游离 LiP 相比,固定化 LiP 的 pH 稳定性、热稳定性都有了不同程度的提高,在 4℃ 条件下储存 7 周后,仍可保存 97% 的活性。而且固定化 LiP 具有可重复使用性,循环使用 6 次后,仍可保留近 30% 的活性。

#### 参考文献:

- [1] 李慧蓉. 白腐真菌生物学和生物技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 26-30.
- [2] Joshi D K, Gold M H. Oxidation of dimethoxylated aromatic compounds by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Eur J Biochem, 1996, **237**(1): 45-57.
- [3] Qi B, Moe W M, Kinney K A. Biodegradation of volatile organic compounds by five fungal species [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, **58**(5): 684-689.
- [4] Rubilar O, Diez M C, Gianfreda L. Transformation of chlorinated phenolic compounds by white rot fungi [J]. Crit Rev Env Sci Technol, 2008, **38**(4): 227-268.
- [5] Zouari H, Labat M, Sayadi S. Degradation of 4-chlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in free and immobilized cultures [J]. Bioresour Technol, 2002, **84**(2): 145-150.
- [6] Verma P, Madamwar D. Decolorization of synthetic textile dyes by lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Folia Microbiol, 2002, **47**(3): 283-286.
- [7] 吴叶明. 木素过氧化物酶的生产固定化及其在染料降解中应用[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2008.
- [8] Sedarati M R, Keshavarz T, Leontievsky A A, et al. Transformation of high concentrations of chlorophenols by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor* immobilized on nylon mesh [J]. Electron J Biotechnol, 2003, **6**(2): 104-114.
- [9] Peralta-Zamora P, De Moraes S G, Esposito E, et al. Decolorization of pulp mill effluents with immobilized lignin and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Environ Technol, 1998, **19**(5): 521-528.
- [10] Sayadi S, Ellouz R. Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill wastewaters [J]. Appl Envir Microbiol, 1995, **61**(3): 1098-1103.
- [11] Kresge C T, Leonowicz M E, Roth W J, et al. Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism [J]. Nature, 1992, **359**(6397): 710-712.
- [12] Yang Q H, Liu J, Zhong H, et al. Progress in the periodic mesoporous organosilicas [J]. J Inorg Mater, 2009, **24**(4): 641-649.
- [13] Zhao D Y, Feng J L, Huo Q S, et al. Triblock copolymer syntheses of mesoporous silica with periodic 50 to 300 angstrom pores [J]. Science, 1998, **279**(5350): 548-552.
- [14] Hudson S, Cooney J, Magner E. Proteins in mesoporous silicates [J]. Angew Chem Int Ed, 2008, **47**(45): 8582-8594.
- [15] 卢冠忠, 吕勇军, 李佩晋, 等. 酶在有序介孔材料上的固定化 [J]. 化学进展, 2008, **20**(7/8): 1171-1179.
- [16] Zhou L H, Tao Y H, Hu J, et al. Effect of pore structure of SBA-15 on immobilization of hemoglobin [J]. J Porous Mater, 2008, **15**(6): 653-659.
- [17] Miyahara M, Vinu A, Ariga K. Adsorption myoglobin over mesoporous silica molecular sieves: Pore size effect and pore-filling model [J]. Mater Sci Eng C, 2007, **27**(2): 232-236.
- [18] Deere J, Magner E, Wall J G, et al. Adsorption and activity of proteins onto mesoporous silica [J]. Catal Lett, 2003, **85**(1-2): 19-23.
- [19] Katiyar A, Yadav S, Smirniotis P G, et al. Synthesis of ordered large pore SBA-15 spherical particles for adsorption of biomolecules [J]. J Chromatogr A, 2006, **1122**(1-2): 13-20.
- [20] Lei J, Fan J, Yu C Z, et al. Immobilization of enzymes in mesoporous materials: controlling the entrance to nanospace [J]. Microporous Mesoporous Mater, 2004, **73**(3): 121-128.
- [21] Tien M, Kirk T K. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Methods Enzymol, 1988, **161**: 238-249.
- [22] 徐如人, 庞文琴, 于吉红, 等. 分子筛与多孔材料化学 [M]. 北京: 科学出版社, 2004. 145-155.
- [23] Choinowski T, Blodig W, Winterhalter K H, et al. The crystal structure of lignin peroxidase at 1.70 angstrom resolution reveals a hydroxy group on the C-beta of tryptophan 171: A novel radical site formed during the redox cycle [J]. J Mol Biol, 1999, **286**(3): 809-827.
- [24] Alduri B, Robinson E, Mcnerlan S, et al. Hydrolysis of edible oils by lipases immobilized on hydrophobic supports: Effects of internal support structure [J]. J Am Oil Chem Soc, 1995, **72**(11): 1351-1359.
- [25] Matoba S, Tsuneda S, Saito K, et al. Highly efficient enzyme recovery using a porous membrane with immobilized tentacle polymer chains [J]. Biochemistry, 1995, **13**(8): 795-797.
- [26] 李佳喜. 基于碳纳米管的木质素降解酶固定化研究[D]. 北京: 清华大学, 2007.
- [27] Qiu H, Li Y, Ji G, et al. Immobilization of lignin peroxidase on nanoporous gold: Enzymatic properties and in situ release of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by co-immobilized glucose oxidase [J]. Bioresour Technol, 2009, **100**(17): 3837-3842.
- [28] Matsuyama H, Yamamoto T, Furuyoshi S, et al. Spectral changes of lysozyme adsorbed on ultrafine silica particles [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1993, **57**(6): 992-993.
- [29] Bale M D, Danielson S J, Daiss J L, et al. Influence of copolymer composition on protein adsorption and structural rearrangements at the polymer surface [J]. J Colloid Interface Sci, 1989, **132**(1): 176-187.
- [30] Schwarz A, Goedel C, Minani A, et al. Trehalose phosphorylase from *Pleurotus ostreatus*: Characterization and stabilization by covalent modification, and application for the synthesis of alpha, alpha-trehalose [J]. J Biochem, 2007, **129**(1): 140-150.