

基于磁性纳米粒子固定技术的漆酶传感器用于垃圾堆肥中邻苯二酚的检测

章毅¹, 曾光明^{1*}, 汤琳¹, 郁红艳¹, 李建兵²

(1. 湖南大学环境科学与工程学院, 长沙 410082; 2. Environmental Engineering Program, University of Northern British Columbia, Prince George, British Columbia, V2N 4Z9, Canada)

摘要:以邻苯二酚为检测目标, 研究了一种基于核/壳磁性纳米粒子固定漆酶的邻苯二酚生物传感器制备方法及其在城市生活垃圾堆肥中的应用. 制备 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒, 使用正硅酸乙酯 (TEOS) 和氨丙基三甲氧基硅烷 (APTMS) 将其功能化并利用戊二醛将漆酶共价固定, 借助磁场吸附在磁性碳糊电极上, 检测邻苯二酚. 固定在电极表面的漆酶保持了很好的活性. 该生物传感器的检测线性范围为 $7.5 \times 10^{-7} \sim 2.75 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, 检测下限达到 $7.5 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$, 达到稳态电流 95% 所需时间大概为 70 s. 将该传感器检测堆肥浸出液中酚的含量的结果与高效液相色谱法对比, 两者非常接近.

关键词: Fe_3O_4 磁性纳米颗粒; 漆酶; 邻苯二酚; 堆肥

中图分类号: X830.2 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)10-2320-06

Catechol Biosensor Based on Immobilizing Laccase to Modified Core-shell Magnetic Nanoparticles Supported on Carbon Paste Electrode

ZHANG Yi¹, ZENG Guang-ming¹, TANG Lin¹, YU Hong-yan¹, LI Jian-bing²

(1. College of Environmental Science and Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China; 2. Environmental Engineering Program, University of Northern British Columbia, Prince George, British Columbia, V2N 4Z9, Canada)

Abstract: A catechol biosensor was developed and used to analyze compost extracts based on the immobilization of laccase on the surface of modified magnetic core-shell ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$) nanoparticles. Laccase was covalently immobilized on the magnetic nanoparticles by glutaraldehyde, which were modified with amino groups on its surface. The resulting magnetic bio-nanoparticles were attached to the surface of carbon paste electrode with the help of a permanent magnet to determine catechol. The immobilization matrix provided a good microenvironment for retaining the bioactivity of laccase. The linear range for catechol determination was $7.5 \times 10^{-7} \sim 2.75 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, with a detection limit of $7.5 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$. The detection current reached 95% of the steady-state current within about 70 s. Catechol concentration in compost extracts were determined by laccase biosensor and HPLC, with approximately the same result.

Key words: Fe_3O_4 magnetic nanoparticles; laccase; catechol; compost

酚类物质在环境中广泛存在, 作为公认的有害物质, 对人体健康和环境有很大的影响. 邻苯二酚对中枢系统具有抑制作用, 还可以影响白细胞中 DNA 的合成, 导致染色体畸变. 邻苯二酚是生产多种化工产品和农药的基本原料及中间产物, 在环境中很常见. 堆肥系统中, 除了可能存在的外来酚源, 邻苯二酚还是微生物降解芳香烃类物质过程的中间产物, 因此检测邻苯二酚对于环境监测和堆肥控制都有一定的意义. 目前, 对于酚含量的测定多采用分光光度法、高效液相色谱法 (HPLC)、气相色谱法等方法进行检测^[1-3]. 用分光光度法检测时, 由于对底物浊度的要求和光干扰物质的影响, 限制了其精确性和使用范围; 采用液相和气相色谱法检测, 检测前需要对样品分离, 分离过程通常需要预处理, 比较繁琐和耗时, 此外检测仪器比较昂贵, 且不便携带, 不能进行实时检测.

漆酶是含有 4 个铜离子的多酚氧化酶, 具有相当广泛的底物专一性和较好的稳定性, 可以催化空气中的氧气直接氧化分解酚类、芳胺类和羧酸类等化合物以及它们的衍生物. 因此, 利用漆酶对酚类物质的催化作用可以制备出灵敏稳定的酚传感器, 实现对环境中酚类物质的实时在线测定^[4,5]. 漆酶在传感器上固定化是关键所在, 既要酶固定得牢固, 又要酶长时间保持生物活性, 因此人们引入了大量的方法^[6-12]. 磁性纳米颗粒作为一种新型的生物分子固定载体, 逐渐被人们关注^[13-16]. 本研究利用顺磁性,

收稿日期: 2006-11-16; 修订日期: 2007-01-11

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金项目 (20020532017); 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2004AA649370); 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2005CB724203); 高等学校优秀青年教师教学科研奖励计划项目

作者简介: 章毅 (1980 ~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为生物传感在环境监测中的应用, E-mail: ezhangyi123@yahoo.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: zgming@hnu.cn

将修饰了漆酶的磁性纳米颗粒固定在电极表面,用于城市生活堆肥系统中邻苯二酚的检测,取得了很好的效果.

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

漆酶(laccase, EC 1.10.3.2, 23.3 U/mg)购于Fluka公司.正硅酸乙酯(TEOS)和石墨购于天津市大茂化学试剂厂,氨丙基三甲氧基硅烷(APTMS)购于湖北应城市得邦化工新材料有限公司,戊二醛购于上海生物化学试剂公司.磷酸缓冲溶液(PBS)为1/15 mol/L,其他试剂均为分析纯,水为去离子水.

电化学测定采用上海辰华仪器公司生产的CHI660B 电化学系统与 50mL 电解池中的三电极系统相连接.三电极系统:以修饰了漆酶-Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒交联体的碳糊电极(直径8 mm)作为工作电极(即基底电极),饱和甘汞电极作为参比电极,铂片电极作为对电极.所有工作均在室温(25℃)下完成.

实验用的仪器还包括 Hitach-800 透射电子显微镜,Agilent 1100 高效液相色谱,PHSJ-3F 型实验室 pH 计(上海雷磁仪器厂),Sigma 4K15 实验室离心机和 FD-1 冷冻干燥机(北京博医康技术公司).

1.2 核/壳磁性纳米粒子的制备

氮气保护下,将一定量按 Fe²⁺:Fe³⁺ = 1:2(摩尔比)的 FeCl₂、FeCl₃ 投加入 38 mL 0.4 mol/L 盐酸中溶解后,倒入 375 mL 0.7 mol/L 氨水中,强烈搅拌生成 Fe₃O₄ 胶状沉淀.然后取 0.232 g 沉淀,加入到 200 mL 正丙醇中,超声后再依次加入 5.36 g PEG、20 mL H₂O、10 mL 氨水和 1.2 mL TEOS,搅拌 24 h,分离、清洗、冷冻干燥后,取 0.5 g 悬浮于 10 mL 甲醇中,加入 0.5 mL APTMS,室温搅拌 12 h 完成硅烷化,之后悬浮于 5 mL 2.5% 戊二醛中搅拌,完成功能化,即得到修饰有氨基的 Fe₃O₄ 磁性纳米颗粒.然后在 4℃,将 0.01 g 漆酶和 0.5 g 磁性纳米颗粒加入到 5 mL 缓冲液(pH 7.0)搅拌 12 h,完成交联,用缓冲液清洗 3 次后抽滤干燥,再溶解于 1 mL 缓冲液,4℃贮存备用.

1.3 漆酶传感器的制备

在 PTFE 管中填充由石墨和石蜡混合而成的碳糊,距表面 8mm 处,放入磁体,形成磁性区域.用 0.5 μm Al₂O₃ 粉末进行抛光至电极表面光洁,然后用水冲洗电极表面,再依次用体积比 1:1 的 HNO₃、丙酮、水超声波清洗,最后再用缓冲液冲洗,自然晾干备用.取 60 μL 的漆酶-磁性颗粒交联体滴涂在电极表

面,空气中干燥 1 h,用缓冲液冲洗,去掉未固定的漆酶-磁性颗粒交联体,置于 4℃贮存备用^[17].电极结构见图 1.

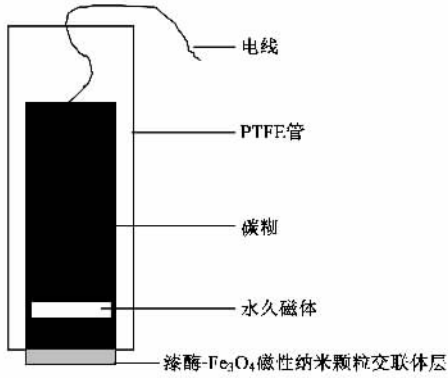


图 1 电极结构

Fig.1 Structure of carbon paste electrode

1.4 邻苯二酚的测定

电化学测定采用三电极系统.用循环伏安法表征电极性对邻苯二酚在缓冲液中的响应,在 -0.6 ~ 0.6 V 的范围内扫描,扫描速度 100 mV/s.计时电流法分析传感器性能,在最佳条件下测定邻苯二酚.

1.5 堆肥浸出液中的应用

分别用高效液相色谱法和漆酶生物传感器测定 3 个含邻苯二酚的堆肥浸出液样品.具体堆料组成如下:土壤 218 g,取样于岳麓山东侧表层以下 1 m 处,稻草 2 600 g,食堂残余物 988 g,麸皮 52 g,含水率 51%.对堆料混合后进行好氧堆肥,环境温度保持在 30℃(水浴恒温),通风量为 0.033 m³/h.取堆肥样 10 g 置于锥形瓶中,加入 200 mL 蒸馏水,在 37℃下振荡 120 min,速度 200 r/min,过滤后将滤液离心 5 min, 10 000 r/min,上清液过滤即得到堆肥浸出液^[18].

用磷酸盐缓冲溶液调节含酚的堆肥浸出液的 pH 值至 5.5,以传感器在还原电位 -0.232 V 下的响应电流变化测定堆肥浸出液中酚含量.将相同的样品用高效液相色谱进行测定,采用 H₂O、乙腈和乙酸(体积比为 88:10:2)作为流动相,流速为 0.7 mL/min,紫外分光光度计在波长 280 nm 处进行检测^[3].

2 结果与讨论

2.1 磁性纳米颗粒的特性

为了表征磁性纳米颗粒材料的实用性,本实验所采用的磁性纳米颗粒用透射电子显微镜(TEM)进行了扫描.电镜扫描的结果如图 2 所示.在图 2(a)

中,可以发现 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ 纳米颗粒呈半球形,其直径为 $14 \sim 18 \text{ nm}$, Fe_3O_4 纳米颗粒外边包被的 SiO_2 的厚度为 $5 \sim 6 \text{ nm}$.在磁性颗粒外边包被 SiO_2 的厚度可通过加入药品的剂量来调节,为了确保磁性纳米颗粒能够被具有外加磁场的电极吸引在电极表面, SiO_2

层不宜过厚.当漆酶通过戊二醛交联到 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2$ 纳米颗粒上后,仍然呈半球状,其直径有所增加,达到 $22 \sim 25 \text{ nm}$,可以从图 2(b)中辨别.本实验所采用的磁性纳米颗粒粒径较小,具有较大的比表面积,在实际检测具有良好的实用性.

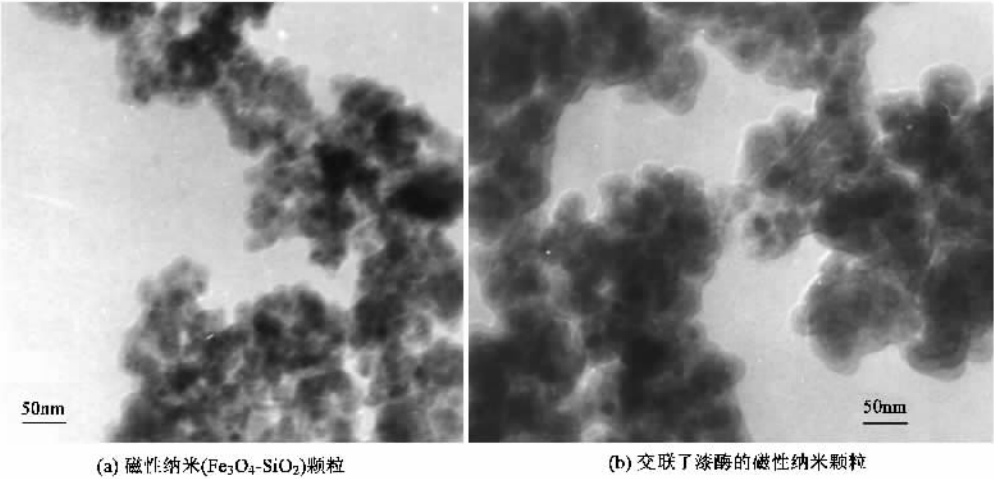


图 2 TEM 扫描图
Fig.2 TEM images

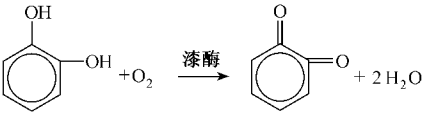
2.2 漆酶的固定

漆酶与 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒交联,通过戊二醛上的 2 个醛基,分别与用 APTMS 完成功能化的 Fe_3O_4 磁性颗粒上的氨基以及漆酶上的氨基反应,共价结合生成席夫碱,完成交联,达到固定化酶的效果,增强酶的稳定性,延长酶电极使用寿命.共价结合方法相对于其他的固定方法,得到的固定化漆酶活性为游离酶的 90%,而且这种固定化酶的动力学常数没有受到大的影响.在长期的应用过程中,这种固定化酶显示了非常好的稳定性^[19].利用顺磁性,将漆酶- Fe_3O_4 磁性纳米颗粒吸附到碳糊电极表面上,便于分离和再生,而且操作简单.因为存在外加的磁场,修饰有漆酶的磁性纳米颗粒被紧紧地吸引在电极的磁性区域表面,用大量的缓冲液洗去未固定的部分之后,剩余的部分在外加磁场力和纳米颗粒间的磁力作用下,在电极表面形成很稳定均匀的漆酶- Fe_3O_4 磁性纳米颗粒交联体层,有利于电化学检测时的稳态测定.另外,有别于其他固定方法在电极表面获得单层的漆酶,在外加磁场力和磁性纳米颗粒之间的磁力共同作用下,能在电极表面得到多重漆酶.在电极表面的吸附的漆酶- Fe_3O_4 磁性纳米颗粒交联体层厚为 0.04 mm ,漆酶- Fe_3O_4 磁性纳米颗粒单体的直径仅 $22 \sim 25 \text{ nm}$,所以在电极表面上的

漆酶是多重重叠的,这样使得吸附在电极表面上的漆酶比单层吸附的大得多,使电极的灵敏度更好,增大了酚类物质检测范围,提高了线性检测范围.

2.3 传感器催化反应原理

漆酶可以催化空气中的氧气,直接氧化分解各种酚类染料、取代酚、氯酚、硫酚、双酚、芳香胺等^[20].酚类物质在传感器表面的氧化还原机制,漆酶以 O_2 和酚为底物,将酚催化氧化.酚的氧化物在电极上还原成为酚,并产生电流信号,从而可以特异性地检测出样品中酚的浓度.漆酶使邻苯二酚上的 1 个羟基失去 H^+ ,变成双键的羰基,产生可识别的信号.漆酶与邻苯二酚的反应方程式为:



2.4 循环伏安法特征

如图 3 所示,在 $1/15 \text{ mol/L}$ PBS($\text{pH } 5.5$)中,酶电极的循环伏安曲线.没有加入邻苯二酚的条件下,背景电流很小,是一个很平稳的闭合曲线.当在缓冲液中加入邻苯二酚,由于固定在电极表面上漆酶的催化作用,生成了醌类物质,使得循环伏安曲线上出现明显的催化还原曲线.

2.5 实验条件优化

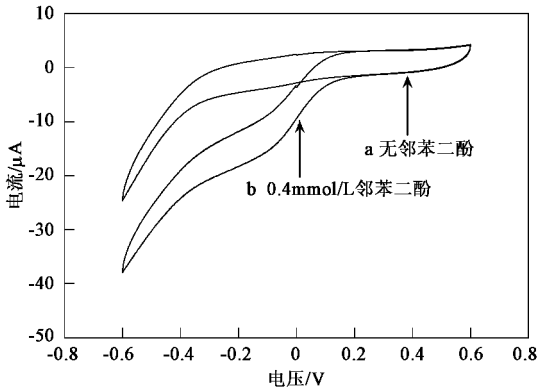


图 3 循环伏安扫描图

Fig.3 Cyclic voltammograms of the electrode at a scan rate of 100 mV·s⁻¹

在加入了 10 μmol/L 邻苯二酚的 1/15 mol/L PBS 的条件下,研究了从 4~7 的 pH 值对电极的影响.如图 4 所示,尽管 pH 在 5.0~6.0 和 4.0~4.6 区间都出现了比较高的峰值,由于 4.0~4.6 区间的 pH 值是用酒石酸缓冲液调节,而且实际检测中发现,电极在酒石酸缓冲液中的电流响应相对不如在 PBS 中稳定,所以响应电流的最佳 pH 条件为 5.0~6.0 区间.为了获得最大的灵敏度,在随后的实验中 pH 5.5 被选作最佳条件.

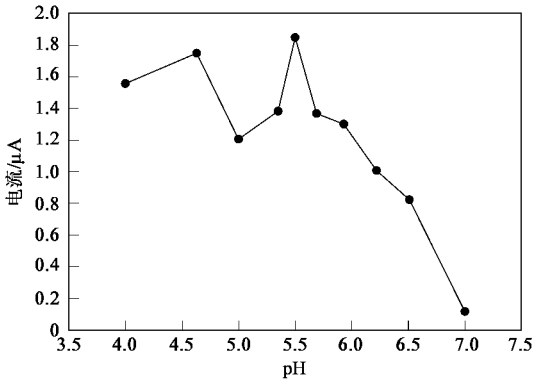


图 4 pH 值对邻苯二酚传感器响应电流的影响

Fig.4 Effect of pH on the enzyme electrode response studied by amperometric method

采用计时电流法考察传感器的最佳工作电位.被考察的应用电位范围为 -0.250 ~ -0.100 V,如图 5 所示,响应电流与背景电流最大的差值出现在 -0.232 V,因此, -0.232 V 被选作最佳的工作电位.

2.6 传感器响应性能

图 6 是用计时电流法测定缓冲溶液中加入邻苯二酚后电流变化,在最佳条件下,分别加入一定浓度

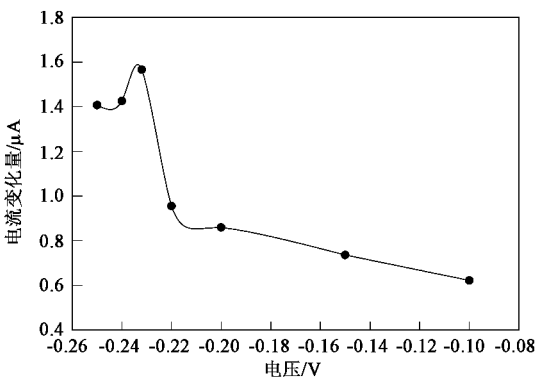


图 5 不同的工作电压下在 1/15 mol/L 的 PBS 中用计时电流法检测传感器对邻苯二酚的电流响应

Fig.5 Current change-potential curves of the biosensor examined by amperometric method under conditions 1/15 mol/L PBS (pH 5.5) with catechol under stirring

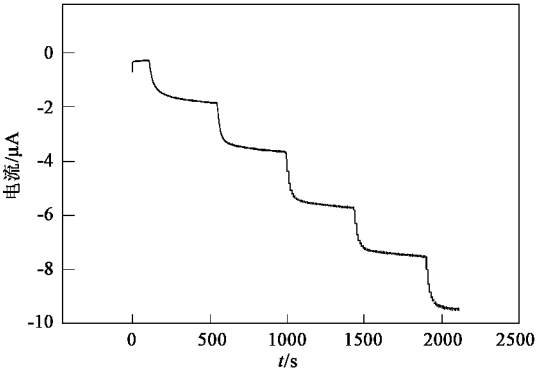


图 6 最佳条件下每次加入 10 μmol/L 邻苯二酚的计时电流法检测

Fig.6 Current-time response curve of the enzyme electrode on increasing the catechol concentration by 10 μmol/L in each step

的邻苯二酚,根据响应电流变化即可计算出测定池中邻苯二酚的浓度.

用线性回归方程计算酚类物质含量.邻苯二酚含量与电流变化关系的线性回归方程为:

$$y = (0.1563 \pm 0.0030)x + (1.0618 \pm 0.3730)$$
式中, y 是电流变化的值(μA), x 是加入邻苯二酚浓度($\mu mol/L$).邻苯二酚的线性范围为 $7.5 \times 10^{-7} \sim 2.75 \times 10^{-4} mol/L$,检测下限达到 $7.5 \times 10^{-7} mol/L$ ($S/N=3$), r^2 为 0.9945.回归曲线见图 7.相比于其他的漆酶传感器,邻苯二酚的线性检测范围增大,检测下限降低^[11,21,22].

2.7 传感器的重复性和稳定性

用该传感器当日连续 5 次检测 10 μmol/L 的邻苯二酚,相对标准偏差为 1.74%.在潮湿条件下, 4℃ 存放 20 d,电极响应变化很小,基本保持不变;

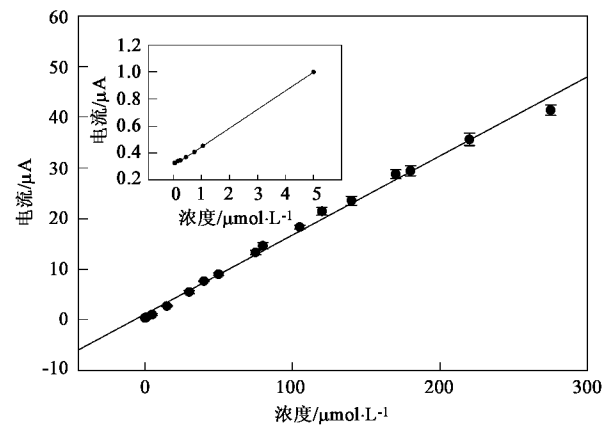


图7 最佳条件下酶传感器检测邻苯二酚的标定曲线

Fig.7 Steady-state calibration plot of the enzyme electrode for catechol in 1/15 mol/L PBS (pH 5.5) at an applied potential of -0.232 V vs. SCE (Inset). The plot of current response vs. catechol between $0.05\text{ }\mu\text{mol/L}$ to $5\text{ }\mu\text{mol/L}$

40 d左右,降到初始响应电流的 70%,可见本法制得的生物传感器具有良好的稳定性和较长的使用寿命.从计时安培曲线可以看出,70 s左右达到稳定电流的 95%.

2.8 干扰实验

为了检测传感器的选择性,考虑了垃圾堆肥系统中较为常见的酚类物质及其衍生物,在检测邻苯二酚的最佳条件下,分别检测与邻苯二酚结构相似的苯酚、香兰素、愈创木酚、3,5-二硝基水杨酸和 *N,N*-二甲基苯胺对传感器的响应情况,检测结果见表 1.在底物中加入一定量的碳酸盐、氯化物、溴化物和碘化物,均未对检测产生显著的影响.可见在本实验条件下,传感器对邻苯二酚具有很好的选择性.

表 1 不同底物对传感器的电流响应 ¹⁾		
Table 1 Biosensor response to various substrate		
底物	相对响应电流/ μA	底物对传感器的响应/%
邻苯二酚	1.565 4	100
苯酚	0.048 8	3.12
香兰素	0.008	0.51
愈创木酚	0.056	3.58
3,5-二硝基水杨酸	0.000 5	0.03
<i>N,N</i> -二甲基苯胺	0.046 8	3.00

1) 参比邻苯二酚的电流变化值计算

2.9 堆肥浸出液中的应用

分别用高效液相色谱法和漆酶生物传感器测定 3 个含邻苯二酚的堆肥浸出液样品.在最佳条件下,经传感器采用计时电流法测定得到的酚浓度值,与用高效液相色谱法测得的相应的值很接近.将 2 种

方法检测得到的酚含量结果列表比较(表 2).比较这 2 种检测方法,在得到很相近的检测结果的情况下,生物传感器检测比高效液相色谱法操作更快速、简便;另外,对于待测样品,高效液相色谱法受到样品中浊度和光干扰物质影响,当邻苯二酚浓度为 $2\times 10^{-6}\text{ mol/L}$ 时,无法读取数据,而传感器的选择性好,不受浊度和光干扰物质的影响,灵敏度更高,可测得 $7.5\times 10^{-7}\text{ mol/L}$ 的邻苯二酚.

表 2 漆酶生物传感器和 HPLC 检测堆肥浸出液中的邻苯二酚/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$			
Table 2 Catechol concentration in compost extracts determined by laccase biosensor and HPLC/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$			
样品	漆酶生物传感器	HPLC	相对信号偏差/%
1	20.76	21.17	1.94
2	29.77	29.57	0.07
3	53.27	52.40	1.66

3 结论

邻苯二酚的检测下限为 $7.5\times 10^{-7}\text{ mol/L}$,线性范围是 $7.5\times 10^{-7}\sim 2.75\times 10^{-4}\text{ mol/L}$,可以很好地应用到堆肥及其它环境样品中邻苯二酚的检测.这种传感器不仅测定结果与高效液相色谱法非常相近而且操作快速、简便,灵敏度高,选择性好,而且还能克服分光光度法所不能克服的复杂系统中浊度和光干扰物质的干扰问题,为快速、低成本在线检测酚含量提供了技术支持.

参考文献:

[1] Poerschmann J, Zhang Z, Kopinke F D, *et al.* Solid phase microextraction for determining the distribution of chemicals in aqueous matrices [J]. *Anal Chem*, 1997, **69**(4): 597 ~ 600.

[2] Graovac M, Todorovic M, Trtanj M I, *et al.* Broadly applicable polysiloxane-based chiral stationary phase for high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography [J]. *J Chrom A*, 1995, **705**(2): 313 ~ 317.

[3] Chapuis-Lardy L, Contour-Ansel D, Bernhard-Reversat F. High-performance liquid chromatography of water-soluble phenolics in leaf litter of three Eucalyptus hybrids (Congo) [J]. *Plant Science*, 2002, **163**(2): 217 ~ 222.

[4] Vianello F, Ragusa S, Cambria M T, *et al.* A high sensitivity amperometric biosensor using laccase as biorecognition element [J]. *Biosens Bioelectron*, 2006, **21**(11): 2155 ~ 2160.

[5] Vianello F, Cambria A, Ragusa S, *et al.* A high sensitivity amperometric biosensor using a monomolecular layer of laccase as biorecognition element [J]. *Biosens Bioelectron*, 2004, **20**(2): 315 ~ 321.

[6] 汤琳,曾光明,黄国和,等.免疫传感器用于环境中痕量有害

- 物质检测的研究进展[J].环境科学,2004, **25**(4): 170~176.
- [7] Carralero V, Mena M L, Gonzalez-Cortés A, *et al.* Development of a high analytical performance-tyrosinase biosensor based on a composite graphite-Teflon electrode modified with gold nanoparticles [J]. Biosens Bioelectron, 2006, **22**(5): 30~736.
- [8] Liu Y, Qu X H, Guo H W, *et al.* Facile preparation of amperometric laccase biosensor with multifunction based on the matrix of carbon nanotubes-chitosan composite [J]. Biosens Bioelectron, 2006, **21**(12): 2195~2201.
- [9] Li J, Chia L S, Goh N K, *et al.* Silica sol-gel immobilized amperometric biosensor for the determination of phenolic compounds [J]. Anal Chim Acta, 1998, **362**: 203~211.
- [10] Peralta-Zamora P, Pereira C M, Tiburtius E R L, *et al.* Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase [J]. Appl Catal B: Env, 2003, **42**(2): 131~144.
- [11] Roy J J, Abraham T E, Abhijith K S, *et al.* Biosensor for the determination of phenols based on Cross-Linked Enzyme Crystals (CLEC) of laccase [J]. Biosens Bioelectron, 2005, **21**: 206~211.
- [12] Timur S, Pazarlioglu N, Pilloton R, *et al.* Thick film sensors based on laccases from different sources immobilized in polyaniline matrix [J]. Sensor Actua B: Chem, 2004, **97**(11): 132~136.
- [13] Megens M, Prins M. Magnetic biochips: a new option for sensitive diagnostics [J]. J Magn Magn Mater, 2005, **293**(1): 702~708.
- [14] Khin Y W, Si-Shen F. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs [J]. Biomaterials, 2005, **26**(15): 2713~2722.
- [15] Romanus E, Hüchel M, Groß C, *et al.* Magnetic nanoparticle relaxation measurement as a novel tool for in vivo diagnostics [J]. J Magn Magn Mater, 2002, **252**: 387~389.
- [16] Tsang S C, Qiu J S, Harris P J F, *et al.* Synthesis of fullerene nanocapsules from bio-molecule carbonization [J]. Chem Phys Lett, 2000, **322**(6): 553~560.
- [17] Liu Z M, Liu Y L, Yang H F, *et al.* A pheol biosensor based on immobilizing tyrosinase to modified core-shell magnetic nanoparticles supported at a carbon electrode [J]. Anal Chim Acta, 2005, **533**(1): 3~9.
- [18] Zeng G M, Tang L, Shen G L, *et al.* Determination of trace chromium(VI) by an inhibition-based enzyme biosensor incorporating an electropolymerized aniline membrane and ferrocene as electron transfer mediator [J]. Intern J Environ Anal Chem, 2004, **84**(10): 761~774.
- [19] Leonowicz A, Sarkar J M, Bollag J M. Improvement in stability of an immobilized fungal laccase [J]. Appl Microbiol, 1988, **29**(2~3): 129~135.
- [20] Yaropolov A I, Skorobogat'ko O V, Vartanov S S. Laccase: properties, catalytic mechanism, and applicability [J]. Appl Biochem Biotechnol, 1994, **49**(3): 257~280.
- [21] Jarosz-Wilkolazka A, Ruzgas T, Gorton L. Amperometric detection of mono- and diphenols at Cerrena unicolor laccase-modified graphite electrode: correlation between sensitivity and substrate structure [J]. Talanta, 2005, **66**(5): 1219~1224.
- [22] Freire R S, Duran N, Kubota L T. Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds [J]. Talanta, 2001, **54**(4): 681~686.