

四氧化三铁明胶固定过氧化物酶催化降解五氯酚

宗悦茹¹, 张剑波^{1*}, 王杉霖¹, 杨宇翔^{2,3}, 王维敬¹

(1. 北京大学环境学院环境科学系, 北京 100871; 2. 华东理工大学化学与制药学院, 上海 200237; 3. 南京大学配位化学国家重点实验室, 南京 210093)

摘要: 利用 Fe_3O_4 吸附-明胶包埋-交联法固定辣根过氧化物酶(HRP)催化去除水中的五氯酚(PCP), 探讨了催化反应时间、不同缓冲体系及 pH 值、不同 PCP 初始浓度和 HRP 使用量对催化反应的影响, 确定了固定化 HRP 催化去除 PCP 的最佳反应条件, 并与自由酶的催化反应做对比研究. 结果表明, 用固定化辣根过氧化物酶催化去除五氯酚, 反应在 30 min 后可达到平衡, 催化速度和自由酶相当; pH 值介于 4~6 之间有较明显的去除效果, 固定后催化反应的适宜 pH 范围更为宽泛, 且受不同缓冲体系影响较小, pH 为 5 时有最高催化去除率 41%; 在 0.05 U/mL 的低活性浓度下固定化 HRP 的催化效率高, 与自由酶相比可减少酶用量; PCP 的去除量随其初始浓度的增加而增加, 但催化去除率从 39.68% 下降至 24.4%; 此外, 固定化 HRP 具有良好的催化稳定性, 在酶活性浓度为 0.05 U/mL 时重复使用 7 次后 PCP 的催化去除率仍高于 39%.

关键词: 催化去除; PCP; HRP; 固定化; pH; 缓冲体系

中图分类号: X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)12-2740-05

Removal of Pentachlorophenol Catalyzed by Immobilized Horseradish Peroxidase

ZONG Yue-ru¹, ZHANG Jian-bo¹, WANG Shan-lin¹, YANG Yu-xiang^{2,3}, WANG Wei-jing¹

(1. Department of Environmental Science, College of Environmental Science, Peking University, Beijing 100871, China; 2. College of Chemistry and Pharmaceutics, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 3. State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: The removal of PCP using HRP immobilized by Fe_3O_4 sorption-gelatin embedding-cross linkage method as catalyzer was studied. Reaction conditions including the reacting time, different buffer systems and pH value, PCP initial concentration, HRP dosage were discussed in detail compared with free HRP. The results indicate that the equilibrium time of PCP removal reaction catalyzed by immobilized HRP is about 30 min, which is as fast as free HRP. The optimal pH for PCP removal by immobilized HRP is between 4~6, the proper pH should be more extensive than using free HRP. The highest catalyzing removal percent is 41% at pH 5. Low concentration of immobilized HRP can remove PCP effectively. PCP removal quantity increases but the removal percent decreases with the increase of initial concentration of PCP. The catalyzing removal percent goes down from 39.68% to 24.4%. Immobilized HRP can remove PCP repetitively. The catalyzing removal percent is still above 39% at 0.05 U/mL dosage of HRP when using 7 times repeatedly.

Key words: catalytic removal; PCP; HRP; immobilization; pH; buffer system

五氯酚(pentachlorophenol, PCP)曾被大量生产并应用于木材防腐和血吸虫病防治^[1], 但其在环境中具有持久性有机污染物和内分泌干扰物的特征, 含酚废水被列为当今世界上危害大、污染范围广的工业废水之一, 是环境中水污染的重要来源, 严重危害生态和人类健康^[2].

辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)已被证明可以有效地催化降解 PCP^[3,4], 但在反应中自由酶很容易失活, 无法重复使用^[5,6]. 为解决上述问题, 李勤等^[7]研究了 Fe_3O_4 固定辣根过氧化物酶的吸附特性、贮存稳定性, 并将其用于 4-氯酚和二氯酚的处理; Tatsumi 等^[8]利用磁铁矿粉吸附固定辣根过氧化物酶催化降解苯酚及氯酚类化合物; Kim 等^[9]将 HRP 固定于电极上, 用于催化氧化 PCP, 与传统电化学降解方法相比取得了较好的降解效果. 本研

究采取新的材料 Fe_3O_4 -明胶吸附包埋-交联法固定 HRP, 探讨了固定化酶催化去除水中五氯酚反应的影响条件, 测定了固定化酶对 PCP 的催化去除率和固定酶的重复使用性. 在研究过程中通过对比实验的方法区分了酶载体对酚的吸附去除与酶对酚的催化去除, 前人的研究一般对此没有关注. 研究结果表明固定化酶对五氯酚的催化去除率在 40% 左右, 并可重复使用多次, 为固定酶在含酚废水处理中的应用提供了理论依据, 具有重要的应用价值.

收稿日期: 2007-01-19; 修订日期: 2007-04-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(20577010)

作者简介: 宗悦茹(1982~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境化学, E-mail: zong@pku.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: jbzhang@pku.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

辣根过氧化物酶(上海雪满生物科技有限公司)、过氧化氢(30%,北京化工厂)、藏红 T(95%,Acros Organics)、五氯酚(90%,东京化成工业株式会社)、五氯酚标准品甲醇溶液($1\,015\ \mu\text{g}/\text{mL} \pm 22\ \mu\text{g}/\text{mL}$,国家环境保护总结标准样品研究所)、4-氨基安替比林(北京西中化工厂)、明胶(北京化学试剂公司)、戊二醛(50%,北京益利精细化学品有限公司),以及实验室常用试剂等。

UV757 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);DS-K1 电动定时振荡机(济南第二医疗器械厂);SZ-93 自动双重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂);79.3 型磁力恒温搅拌器(上海市上海县曹行无线电元件厂)等。

1.2 实验方法

1.2.1 固定化 HRP 的制备酶活性测定

称适量的 $2.0\ \text{g}\ \text{Fe}_3\text{O}_4$ 于烧杯中,加入 $2.0\ \text{mL}$ 酶活浓度为 $100\ \text{U}/\text{mL}$ 的 HRP 溶液,常温下静置吸附 $2\ \text{h}$,按 $1:10$ (体积比)加入浓度 10% 的明胶溶液 $20\ \text{mL}$,混匀,注入培养皿中,置于冰箱内冷凝 $1\ \text{h}$,吸附有 HRP 的 Fe_3O_4 粉末被明胶所包埋,将所形成的凝胶切成小块,加入约 $40\ \text{mL}$ 浓度为 0.5% 的戊二醛溶液浸泡交联 $30\ \text{min}$,抽滤,并用去离子水洗涤 6 次以上,抽滤,测定固定化辣根过氧化物酶的活性后将 HRP 封装于冰箱中保存待用。

取 $0.4\ \text{mg}/\text{L}$ HRP 溶液 $0.1\ \text{mL}$, $1.4\ \text{mL}$ 4-氨基安替比林指示剂溶液和 $1.5\ \text{mL}$ 浓度为 $2.252\ \text{mmol}/\text{L}$ 的 H_2O_2 溶液,快速混匀,加入石英比色皿,将比色皿置于紫外可见分光光度计中,于 $510\ \text{nm}$ 处扫描吸光度随时间的变化情况;利用混合液吸光度随时间变化曲线计算自由辣根过氧化物酶活性^[10]。

准确称取适量的固定化 HRP 与 H_2O_2 溶液及指示剂溶液(25°C)混匀,取 $3\ \text{mL}$ 混合液于石英比色皿中,置于紫外可见分光光度计中,在 $510\ \text{nm}$ 下测定吸光度,并记录时间;每隔约 $40\sim 50\ \text{s}$ 再次移液,放入紫外可见分光光度计中测定吸光度,做吸光度随时间变化曲线,计算酶活力,固定化酶酶活力(U/g)为 $1\ \text{g}$ 固定酶(湿重)所具有的酶活力。

1.2.2 最佳反应条件的选择

取 PCP 储备液 $1.0\ \text{mL}$,用缓冲溶液稀释至 $100\ \text{mL}$,取 $2.0\ \text{mL}$ HRP 溶液与 $50\ \text{mL}$ 稀释后的 PCP 溶液混合于磨口锥形瓶中,再加入 H_2O_2 溶液,持续电

磁搅拌进行催化反应,另取固定化 HRP,并使反应体系中酶活性浓度与自由酶实验组相同,在不同反应时间取样测定 PCP 去除率,在固定化酶载体吸附性实验中,以去离子水代替 H_2O_2 溶液,测定载体对 PCP 的吸附率,PCP 总去除率与吸附去除率的差值为固定化酶催化去除 PCP 的值。

改变反应的缓冲液体系、反应体系的 pH 值、酶的用量、PCP 的初始浓度等,测定不同条件下的 PCP 去除率,在降解实验后抽滤回收固定化酶,重新加入新的 PCP 溶液和 H_2O_2 溶液,重复操作 7 次,测定固定酶的重复使用性。

2 结果与讨论

在五氯酚去除过程中,得到的产物多为不溶的二聚物,由于二聚物沉淀析出,不会再进行反应而生成多聚物^[5],Kazunga 等^[4]指出,在 $\text{pH}\ 4\sim 7$ 条件下,主要反应产物是由 2 个五氯酚基团聚合成的 $2,3,4,5,6$ -五氯-4-五氯酚-2,5-环己二烯($2,3,4,5,6$ -pentachloro-4-pentachlorophenoxy-2,5-cyclohexadienone,即 PPCHD),四氯苯醌和其它可溶产物的量基本可以忽略,PPCHD 不可溶,在水溶液中不再进一步发生反应,在本实验过程中也发现,去除反应一段时间之后,反应液呈现混浊,证实确有不溶物生成,在土壤中,以过氧化物为氧化剂催化氧化五氯酚,其矿化度达 13% ^[11]。

2.1 PCP 去除率随时间的变化情况

在 $5,15,30,60$ 和 $120\ \text{min}$ 分别采样,反应体系总体积为 $52.5\ \text{mL}$,自由酶活浓度为 $0.26\ \text{U}/\text{mL}$,PCP 初始浓度为 $13.03\ \text{mg}/\text{L}$;在类似条件下,用固定化 HRP 催化反应实验,反应体系总体积为 $10.1\ \text{mL}$,并进行固定化酶载体吸附 PCP 对比实验,固定化酶实验中 PCP 总去除率减去载体对 PCP 的吸附率即为催化去除率,实验结果见图 1。

结果表明,自由酶催化去除 PCP 的反应在 $30\ \text{min}$ 内达到平衡,固定化 HRP 载体对 PCP 的吸附去除作用在 $15\ \text{min}$ 后基本平衡,固定酶对 PCP 催化反应也是在 $30\ \text{min}$ 后达到平衡,原因一方面是由于随着该催化反应的进行反应物五氯酚和过氧化氢的浓度降低,不利于反应进一步进行;另一方面是在 H_2O_2 存在条件下,HRP 活性在 $30\ \text{min}$ 内可损失 50% 以上^[5],使催化反应难以进一步进行。

2.2 不同缓冲体系和 pH 值对 PCP 去除率的影响

在不同缓冲溶液体系中,HRP 催化活性有所不同,原因在于不同缓冲溶液中盐的静电相互作用和

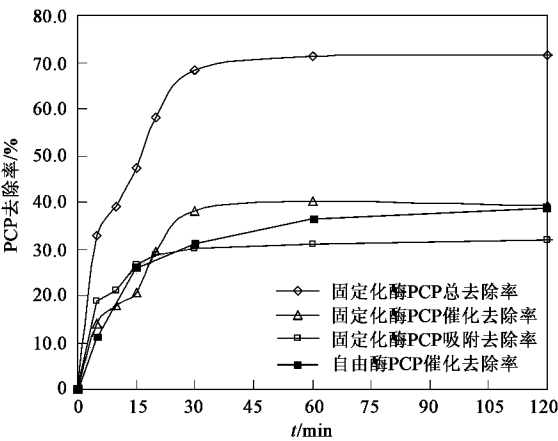


图 1 自由酶和固定化酶对 PCP 的去除率随时间的变化

Fig.1 Variety of PCP removal reaction catalyzed by free and immobilized HRP with reacting time

阴离子特异性对酶动力学造成了不同的影响^[12];但也有学者认为不同盐和 pH 值对酶催化作用的影响不能单独用库仑作用或一定体系中的特定化学反应来单独解释^[13].

分别在 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲溶液反应体系和 HAc-NaAc 缓冲溶液反应体系中,调节不同 pH 值.对自由酶催化反应,PCP 初始浓度均为 8.96 mg/L,反应体系 12.5 mL.在室温下反应 1 h.在磷酸盐体系中自由酶催化去除 PCP 的最适 pH 范围为 4.5~5.5,最高 PCP 去除率(54.98%)出现在 pH 值为 5.0 时;而在醋酸盐体系中最佳 pH 范围为 4.0~5.0,当 pH 为 4.0 时,最高 PCP 去除率为 62.83%,与报道的适宜 pH 范围基本相符^[5, 14, 15].在 pH 值低于 5.0 时, HAc-NaAc 缓冲反应体系中的 PCP 催化去除率高于 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲反应体系,在 pH 值高于 5.0 时,Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲反应体系 PCP 去除效果较好, HAc-NaAc 缓冲反应体系中的 PCP 去除率最大值高于磷酸盐反应体系.这表明受缓冲溶液中盐的阴离子影响,HRP 对 PCP 的催化去除率随 pH 值变化曲线会发生偏移,不同缓冲溶液反应体系中的最佳 pH 值条件有所不同.

在上述体系采用固定化酶进行催化降解实验,结果见表 1.在 2 个体系中,PCP 去除的最佳 pH 值范围均为 4.0~6.0,PCP 催化去除率最高值均出现在 pH 值为 5.0 的时候,均为 41%.与自由酶催化反应相比,固定化 HRP 催化去除 PCP 反应效果受 pH 值变化影响较小,且适宜的 pH 值范围较为宽泛.醋酸盐体系中的载体吸附去除率普遍高于磷酸盐体系.这可能是因为 HRP 固定化后,溶液中不同盐的

库仑作用效果和阴离子特异性对 HRP 催化活性的影响减小,但对载体的吸附作用仍有一定影响.

表 1 不同 pH 值对固定化 HRP 催化反应的影响/%
Table 1 Effect of pH on PCP removal by immobilized HRP/%

项目	指标	pH				
		3.0	4.0	5.0	6.0	7.0
磷酸盐体系	总去除率	58	67	68	43	15
	吸附去除率	28	35	27	12	7
醋酸盐体系	总去除率	61	72	75	55	42
	吸附去除率	42	37	34	21	21
自由酶	催化反应去除率	30	32	41	31	8
	催化反应去除率	19	35	41	34	21

2.3 HRP 用量对催化反应的影响

在醋酸盐体系, pH 值为 5.0、PCP 初始浓度为 13.41 mg/L 的条件下,改变反应体系中 HRP 自由酶用量,测定去除率(见图 2).结果表明,在 HRP 浓度较低的情况下,PCP 催化去除率随自由酶使用量的增加而增加,酶活达到 0.10 U/mL 后 PCP 去除率基本不随 HRP 增加而变化.这是因为当酶量较高时,反应产物会与原酶结合占据酶的活性中心,产生反馈抑制现象,酶易被包裹而从溶液中沉淀出来,从而使酶丧失活性^[16].

在同样条件下,测定固定化 HRP 用量对催化反应的影响,PCP 初始浓度为 13.84 mg/L,实验结果如图 2 所示.

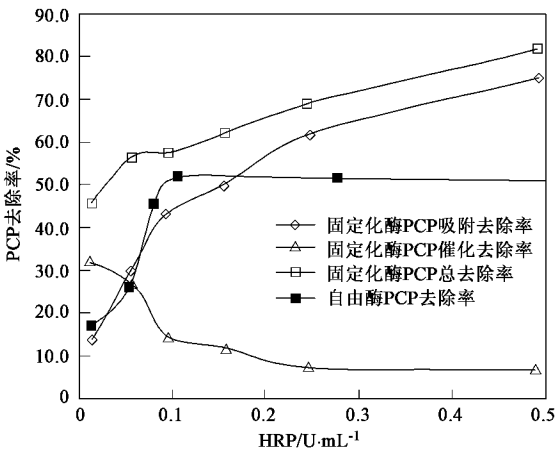


图 2 自由酶和固定化 HRP 催化反应随酶用量的变化情况

Fig.2 Effect of HRP quantity on PCP removal by free and immobilized HRP

结果表明,随固定酶使用量的增加,PCP 总去除率不断增加.但是,在固定酶使用量较低(0.01~

0.05 U/mL)时,催化降解反应是 PCP 从水中被去除的主要途径,随固定酶使用量逐渐增加,PCP 总去除率迅速提高,当固定化 HRP 使用量高于 0.05 U/mL 时,固定酶载体的吸附作用对 PCP 去除过程影响较大,此时难以准确考察催化氧化作用的 PCP 去除效果.在 0.01 U/mL 酶活性下,自由酶催化反应的 PCP 去除率为 17.13%,而固定酶催化反应的 PCP 去除率为 31.94%,明显高于自由酶.

2.4 PCP 初始浓度对催化反应的影响

过氧化氢和自由过氧化物酶的初始浓度分别为 0.032 mmol/L 和 0.1 U/mL,用醋酸盐为缓冲液,反应体系体积为 14.0 mL, PCP 的初始浓度分别为 1.48、2.96、4.94、6.91、9.87 和 14.00 mg/L,室温下反应 1 h,结果见图 3.

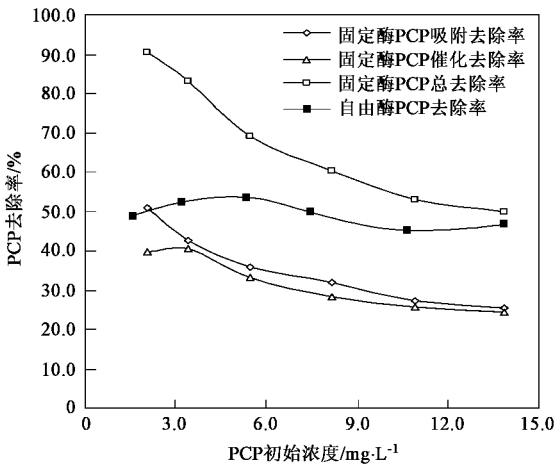


图 3 PCP 初始浓度对自由酶和固定化 HRP 催化反应的影响

Fig.3 Effect of original concentration of PCP on removal reaction catalyzed by free and immobilized HRP

自由酶催化反应的 PCP 去除量随其初始浓度增加而逐渐增加,在 PCP 浓度介于 3 ~ 7 mg/L 之间时,可获得较高的 PCP 去除率,这是由于 PCP 较低时,随其初始浓度的增加,反应体系中可生成更多的苯氧自由基,促进反应的正向进行,当 PCP 浓度进一步增加,过氧化氢浓度和 HRP 初始活性浓度相对较低,限制了反应的进行,因此,随着 PCP 初始浓度的增加,虽然 PCP 去除量随之增加,但 PCP 去除率下降.最高 PCP 去除率为 54%.同样条件下,采用固定化酶进行催化反应,测定 PCP 初始浓度对去除率的影响;同时进行固定化酶载体吸附实验.结果见图 3.随着 PCP 初始浓度从 2.04 mg/L 增加到 13.84 mg/L, PCP 催化去除量从 0.81 mg/L 逐渐增加到 3.38 mg/L,催化去除率从 39.68% 逐渐下降至 24.4%,

PCP 总去除率从 90.51% 逐渐下降至 49.97%.

这一变化规律与自由酶催化反应不同,一方面可能是由于 HRP 固定化后催化能力提高,在 PCP 浓度较低时仍可保持一定的去除率,另一方面可能是由于载体的吸附作用使一部分 PCP 附着于固定酶表面,影响了催化反应的进行.具体原因仍有待进一步研究.

2.5 固定化 HRP 的重复使用实验

改变初始条件,测定固定化 HRP 催化能力在重复使用过程中的变化情况.本实验选择 12.21 mg/L 和 6.11 mg/L 2 种 PCP 初始浓度,分别采用 0.05 U/mL 和 0.15 U/mL 固定酶用量,每种条件下固定酶重复使用 7 次,结果见表 2.

由表 2 可见,无论在较高 PCP 初始浓度条件下,还是在较低 PCP 初始浓度条件下,固定化 HRP 均可以保持稳定的催化活性.7 次重复使用过程中,2 组的 PCP 去除率变化规律相似:随固定化 HRP 重复使用次数增加,PCP 吸附去除率逐渐降低,催化去除率基本不变或逐渐增加,PCP 总去除率随 HRP 使用次数的增加而略有降低,总体均保持在约 40% 以上.

酶用量为 0.15 U/mL 2 组实验中,PCP 的吸附去除率随固定酶使用次数增加而逐渐下降,催化去除率则明显增加.这可能由于在固定化 HRP 去除 PCP 的过程中,催化氧化作用与载体吸附作用之间存在一定竞争关系,在固定酶与 PCP 溶液混合的初始阶段,载体吸附速度较快,在短时间内 PCP 以吸附去除为主,此时,PCP 被吸附在载体表面上,与酶的接触受到限制,PCP 的催化去除率较低.当载体吸附逐渐饱和后,不再影响其它 PCP 分子在溶液中的活动,底物与酶可以较自由的接触,此时 PCP 的主要去除途径为催化氧化,催化去除率逐渐上升.

此外,酶用量为 0.05 U/mL 的 2 组重复使用实验中,固定酶重复使用 7 次后 PCP 的催化去除率仍高于 39%.而 0.05 U/mL 自由酶用量 PCP 催化去除率仅为 23%.这说明辣根过氧化物酶经固定化后催化能力确实得到了提高,在实际使用中可降低所需酶用量.结果表明,该固定化酶具有稳定的催化活性,对于 PCP 污染程度不同的水体均可以有效地进行处理,且在废水处理中所需酶用量低于自由酶,具有良好的实际应用前景.

3 结论

(1)用固定化辣根过氧化物酶催化去除五氯酚,反应在 30 min 后可达到平衡,pH 值介于 4 ~ 6 之间

表 2 固定酶催化活性在重复使用过程中的变化情况/%
Table 2 Repetition of immobilized HRP in catalyzing reaction/%

条件	指标	重复次数						
		1	2	3	4	5	6	7
PCP 初始浓度为 12.21 mg/L, 酶用量为 0.05 U/mL	总去除率	63.68	53.94	53.06	49.96	47.75	43.99	40.22
	吸附去除率	26.51	7.48	10.13	9.25	7.26	2.39	1.28
	催化去除率	37.17	46.46	42.92	40.71	40.49	41.60	38.94
PCP 初始浓度为 12.21 mg/L, 酶用量为 0.15 U/mL	总去除率	67.66	60.14	55.05	58.37	53.06	57.70	49.30
	吸附去除率	38.01	23.85	20.09	15.67	12.57	14.34	4.38
	催化去除率	29.65	36.29	34.96	42.70	40.49	43.37	44.91
PCP 初始浓度为 6.11 mg/L, 酶用量为 0.05 U/mL	总去除率	72.05	67.18	60.54	61.43	57.44	57.89	57.00
	吸附去除率	34.88	21.16	14.96	13.64	11.87	11.42	7.44
	催化去除率	37.17	46.02	45.58	47.79	45.58	46.46	49.56
PCP 初始浓度为 6.11 mg/L, 酶用量为 0.15 U/mL	总去除率	77.80	70.28	64.97	68.06	63.20	61.66	60.10
	吸附去除率	51.25	29.57	21.60	18.50	17.62	14.96	15.41
	催化去除率	26.55	40.71	43.37	49.56	45.58	46.70	44.69

有较明显的去除效果,与自由酶相比(磷酸盐体系中适宜 pH 值为 4.5 ~ 5.5, 醋酸盐体系中为 4.0 ~ 5.0),固定化 HRP 催化反应的适宜 pH 范围更为宽泛,且受不同缓冲体系影响较小;最佳 pH 值在 5.0 左右,此时五氯酚的催化去除率为 41%。

(2)在 0.05 U/mL 的低活性浓度下固定化 HRP 可有效地催化去除 PCP,与自由酶相比可减少酶用量.HRP 催化去除反应中,PCP 的去除量随着其初始浓度的增加而增加,但催化去除率从 39.68% 下降至 24.4%。

(3)固定化 HRP 具有良好的催化稳定性,可重复用于 PCP 的催化去除.在酶用量为 0.05 U/mL 时重复使用 7 次后,PCP 的催化去除率仍高于 39%,虽然固定酶载体对 PCP 的吸附去除明显下降。

参考文献:

[1] USEPA. Treatment technology performance and cost data for remediation of wood preserving sites [R]. United States : Environmental Protection Agency, 1997. 2 ~ 5.

[2] 刘相伟. 工业含酚废水处理技术的现状与发展[J].工业水处理,1998,18(2):4 ~ 7.

[3] Samokyszyn V M, Freeman J P, Maddipati K R, *et al.* Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Pentachlorophenol[J]. Chem Res Toxicol, 1995,8:349 ~ 355.

[4] Kazunga C, Aitken M D, Gold A. Primary product of the horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of pentachlorophenol[J]. Environ Sci Technol, 1999, 33: 1408 ~ 1412.

[5] Zhang G, Nicell J A. Treatment of Aqueous Pentachlorophenol by

Horseradish Peroxidase and Hydrogen Peroxide [J]. Wat Res, 2000, 34(5): 1629 ~ 1637.

[6] 叶鹏. 中国杀虫剂类 POPs 替代技术评估与废水中五氯酚的酶催化去除[D]. 北京:北京大学, 2004.

[7] 李勤,张彤,张莉,等. 有机氯化物的固定化酶处理技术研究[J]. 华东理工大学学报,1999,(5):502 ~ 505.

[8] Tatsumi K, Wada S, Ichikawa H. Removal of chlorophenols from Wastewater by Immobilized Horseradish Peroxidase [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1996,51: 126 ~ 130.

[9] Kim G Y, Moon S H. Degradation of pentachlorophenol by an electroenzymatic method using immobilized peroxidase enzyme[J]. Korean J Chem Engin, 2005, 22 (1): 52 ~ 60.

[10] 施特尔马赫 B [德]著,钱嘉渊译. 酶的测定方法[M].北京:中国轻工业出版社, 1992. 276 ~ 278.

[11] Chen S T, Stevens D K, Kang G Y. Pentachlorophenol and crystal violet degradation in water and soils using heme and hydrogen peroxide[J]. Wat Res, 1999,33(17):3657 ~ 3665.

[12] Park C, Raines R T. Quantitative analysis of the effect of salt concentration on enzymatic catalysis[J]. J Am Chem Soc, 2001, 123 (46): 11472 ~ 11479.

[13] Bauduin P, Nohmie F, Touraud D, *et al.* Hofmeister specific-ion effects on enzyme activity and buffer pH: Horseradish peroxidase in citrate buffer[J]. J Molecular Liquids, 2006, 123(1): 14 ~ 19.

[14] Song H Y, Liu J Z, Xiong Y H, *et al.* Treatment of aqueous chlorophenol by phthalic anhydride-modified horseradish peroxidase [J].J Molecular Catalysis B: Enzymatic,2003,22(1-2):37 ~ 44.

[15] 叶鹏,张剑波,陈嵩,等. 固定化辣根过氧化物酶催化去除五氯酚[J].北京大学学报(自然科学版), 2005, 41(6):918 ~ 925.

[16] 马秀玲,陈盛,黄丽梅,等. 磁性固定化酶处理含酚废水的研究[J]. 广州化学,2003,(1):17 ~ 22.