



文章栏目: 水污染防治

DOI 10.12030/j.cjee.202103027

中图分类号 X703.1

文献标识码 A

蔡文婷, 许嘉鑫, 杜克斯, 等. MIL-88B(Fe) 固定辣根过氧化物酶去除双酚 A[J]. 环境工程学报, 2021, 15(7): 2295-2304.
CAI Wenting, XU Jiaxin, DU Kesi, et al. Degradation of bisphenol A using horseradish peroxidase immobilized on MIL-88B(Fe) [J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2021, 15(7): 2295-2304.

MIL-88B(Fe) 固定辣根过氧化物酶去除双酚 A

蔡文婷¹, 许嘉鑫¹, 杜克斯¹, 程建华^{1,2,*}

1. 华南理工大学环境与能源学院, 广州 510006

2. 华南理工大学华南协同创新研究院, 东莞 523808

第一作者: 蔡文婷(1996—), 女, 硕士研究生。研究方向: 水污染控制。E-mail: 673062212@qq.com

*通信作者: 程建华(1976—), 男, 博士, 教授。研究方向: 水污染控制。E-mail: jhcheng@scut.edu.cn

摘要 通过溶剂热合成法制备了水稳定性的铁基金属有机骨架材料 MIL-88B(Fe), 并将辣根过氧化物酶(HRP)以共价固定法负载在 MIL-88B(Fe) 上得到 MIL-88B(Fe)/HRP 复合材料, 并用于降解双酚 A (BPA)。通过 XRD、FTIR、SEM 和 TGA 等手段对材料进行了表征。结果表明, HRP 成功固定在 MIL-88B(Fe) 表面, 没有改变 MIL-88B(Fe) 的形貌和晶体结构; 在添加亲水剂聚乙二醇后, MIL-88B(Fe)/HRP 可高效去除 BPA, 1 h 内 BPA 去除率可达 99.2%。分别考察了 PEG 用量、BPA 初始质量浓度、固定化酶投加量等对降解效率的影响。结果表明, 在 PEG/BPA 质量比 0.4、pH = 7、25 °C、BPA 初始质量浓度 20 mg·L⁻¹、固定化酶投加量为 0.06 g·L⁻¹ 的条件下, 3 h 内可去除 98.4% 的 BPA。此外, MIL-88B(Fe)/HRP 复合材料具有较好的稳定性和可重复使用性, 固定化 HRP 的贮存稳定性、热稳定性均优于游离 HRP, 循环使用 4 次后, 固定化 HRP 的残余活性仍高于 80%。以上研究结果可为新型酶固定材料的开发及其在废水处理中的应用提供参考。

关键词 MIL-88B(Fe); 固定化酶; 辣根过氧化物酶; 双酚 A

双酚 A (bisphenol A, BPA) 是合成塑料的原料, 可以制成各种常见的塑料品, 如水瓶、运动器材、医疗器械等。不合理的使用使其广泛存在于工业废水、地表水、地下水甚至饮用水中^[1]。双酚 A 具有神经毒性、免疫毒性、致癌性和致畸性^[2], 也可影响人和动物的内分泌系统, 导致雄性动物雌性化和生殖能力下降。因此, 去除双酚 A 对生态环境和人类健康有重要意义。

目前, 双酚 A 的脱除方法有物理法、化学法、生物法等。其中, 酶法处理因其速度快、选择性强而得到了广泛的应用^[3]。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)是一种具有铁卟啉活性中心的血红素蛋白, 能在过氧化氢的存在下氧化降解双酚 A。当底物分子被氧化成自由基后, 可以重新排列、偶联形成相应的聚合物以及其他化合物^[4], 这些化合物无毒, 易于从水中去除。然而, 游离的 HRP 存在着热稳定性和存储稳定性差、成本高、难回收且不能重复利用的缺点。一种有效的解决方法是将酶固定在特定载体上^[3], 可显著改善其稳定性, 实现其长期使用。

金属有机骨架(metal organic frameworks, MOFs)是由金属离子和有机配体通过络合作用自组装形成的具有周期性网络结构的晶态多孔材料, 既结合了无机材料的稳定性, 又结合了有机材料的

收稿日期: 2021-03-04; 录用日期: 2021-03-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21976060); 东莞市引进创新团队项目(2020607263005)

多样可修饰性。MOFs材料由于具有较大的比表面积、可调节的多孔形态和良好的生物相容性,在生物传感、催化、药物缓释等领域取得了重大突破^[5]。已有研究证明金属有机骨架可以用于酶的共价固定化。SHIN等^[6]通过二环己基碳二亚胺使胰蛋白酶接枝到MIL-88B-NH₂(Cr)上,并用于牛血清蛋白降解。DOHERTY等^[7]利用戊二醛将 β -葡萄糖苷酶固定在NH₂-MIL-53(A1)上用于催化水解D-水杨苷转化成葡萄糖。据报道,MIL-88B(Fe)是一种高稳定性、高生物相容性的铁基MOF^[8]。基于此,本研究中,利用MIL-88B(Fe)富含官能团的优势,采用EDC/NHS作为交联剂,将HRP负载于MIL-88B(Fe)上,并考察了固定化酶降解双酚A的影响因素,探究了固定化酶的稳定性和可重复使用性。

1 材料与方法

1.1 实验原料

HRP(>160 U·mg⁻¹,冻干粉,RZ>2),双酚A(BPA),三氯化铁(FeCl₃·6H₂O),对苯二甲酸(H₂BDC),1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC),N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),N,N-二甲基甲酰胺(DMF),乙醇(C₂H₅OH)和苯酚购自阿拉丁试剂有限公司(中国上海)。4-氨基安替比林(4-AAP)、过氧化氢(H₂O₂,质量分数为30%)、聚乙二醇(PEG)购自国药化学试剂有限公司(中国上海)。

1.2 表征

采用X射线衍射仪(XRD, Bruker D8)对MIL-88B(Fe)和MIL-88B(Fe)/HRP材料进行表征。采用傅里叶变换红外光谱仪(FTIR, Thermo-Nicole, 美国)对材料表面的官能团进行测定。采用扫描电子显微镜(SEM, Carl Zeiss显微镜, 德国)观察样品的形貌。采用热重分析仪(TGA, EXSTAR, 日本)测定热稳定性。

1.3 MIL-88B(Fe)的制备

MIL-88B(Fe)材料根据文献[9]报道的方法进行制备:将0.756 g (2.770 mmol)三氯化铁和0.231 g (1.385 mmol)对苯二甲酸溶解在60 mL的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中。在室温下搅拌30 min后,将溶液转移到高压反应釜中,置于150 °C的烘箱中恒温加热反应2 h。反应结束后自然冷却至室温,将所得固体用离心分离并用乙醇洗涤数次,最后在真空干燥箱中60 °C干燥12 h后,得到MIL-88B(Fe)粉末材料。

1.4 MIL-88B(Fe)/HRP的制备

将10 mg MIL-88B(Fe)材料、40 mg的EDC和20 mg的NHS加入到10 mL质量浓度为0.04 mg·mL⁻¹的酶溶液中,在室温下搅拌4 h,反应结束后,所得混合物用去离子水清洗以去除未固定的游离酶。收集含残留酶的上清液,采用Bradford法,用紫外分光光度计在波长为595 nm处测定蛋白含量^[10],以计算得出酶的负载量。将MIL-88B(Fe)/HRP分散在去离子水中,并在4 °C的冰箱中保存。

1.5 酶活性的测定

以苯酚、4-AAP和H₂O₂为底物,采用比色法测定酶的活性^[11]。通过记录在510 nm处的吸光度变化来监测催化反应。1个活性单位被定义为在上述条件下每分钟水解1×10⁻⁶ mol的H₂O₂所需HRP的量。

1.6 降解实验

降解实验在锥形瓶(150 mL)中进行。试剂按如下顺序添加:双酚A(10~100 mg·L⁻¹)溶液、2.5 mL磷酸盐缓冲液(pH=7, 200 mmol·L⁻¹)、1 mg·mL⁻¹ PEG(0.1~0.8 mL)、H₂O₂和MIL-88B(Fe)/HRP材料(0.02~0.10 g·L⁻¹)。将混合溶液用磁力搅拌器搅拌,并在预定的时间用注射器取出上清液,用0.22 μ m过滤器过滤以备后续测定。所有实验均进行3次,数据取平均值。

采用分光光度法($\lambda=510$ nm)测定双酚A的质量浓度。在铁氰化钾存在下,双酚A与4-氨基安替比林在pH为10.0±0.2时反应生成橙色染料,吸光度值与双酚A的浓度成正比^[3]。

1.7 回收实验

每次反应结束后,用离心分离法分离出所使用的 MIL-88B(Fe)/HRP,并用去离子水清洗,以去除物料内残留的反应溶液。之后,在上述实验条件下,催化剂在新的反应介质中重复使用。每一轮降解在 25 ℃ 进行,并测定保留活性。所有实验均进行 3 次,取平均值。

2 结果与讨论

2.1 材料表征

1) SEM 分析。由图 1(a)可以看出, MIL-88(Fe)的形态为纺锤状。EDS 能谱分析表明了 MIL-88B(Fe)中 Fe、C、O 元素的存在和均匀分布。通过 EDC/NHS 将 HRP 共价固定在 MIL-88(Fe) 上后, Fe-MOF 的形态保持不变(图 1(b))。

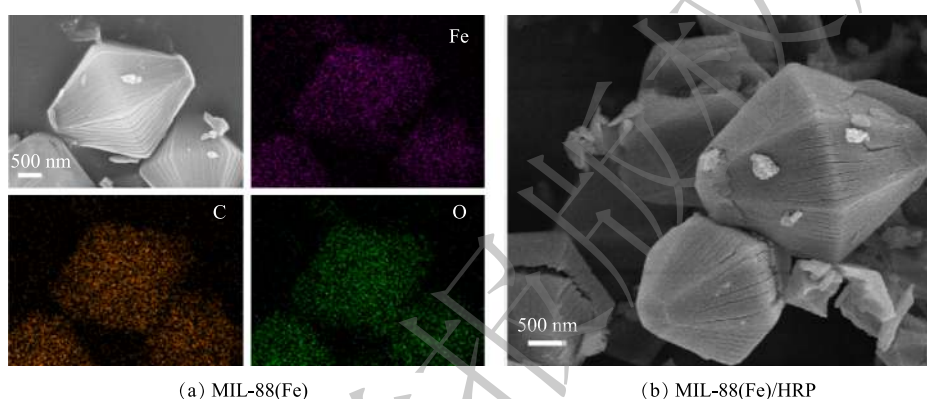


图 1 MIL-88(Fe) 和 MIL-88(Fe)/HRP 的 SEM 图谱

Fig. 1 SEM images of (a) MIL-88(Fe), (b) MIL-88(Fe)/HRP

2) XRD 分析。合成的 MIL-88B(Fe)的 XRD 图谱如图 2 所示。衍射峰与之前报道 MIL-88B(Fe)的相应峰 [002]、[101]、[103]、[202] 和 [211] 匹配良好^[12], 并且衍射峰强度高, 说明 MIL-88(Fe) 结晶良好。MIL-88B(Fe)/HRP 的特征峰与 MIL-88B(Fe) 基本一致, 表明在 HRP 存在下, MIL-88B(Fe) 的结构完整性和结晶形态得以保留, 且结合过程中没有导致相变。峰强变弱表明酶成功负载在 MIL-88B(Fe) 上。

3) FTIR 分析。为了进一步分析 MIL-88B(Fe)样品的分子结构和官能团, 对其进行了 FTIR 光谱表征, 结果如图 3 所示。分别在 552、1 394 和 1 548 cm^{-1} 处观察到 MIL-88B(Fe) 的特征吸收峰, 这

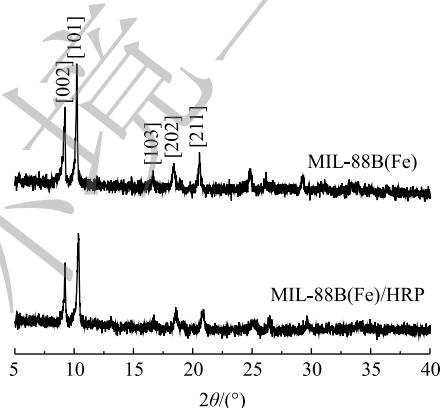


图 2 MIL-88(Fe) 和 MIL-88(Fe)/HRP 的 XRD 图谱

Fig. 2 XRD patterns of MIL-88B(Fe) and MIL-88B(Fe)/HRP

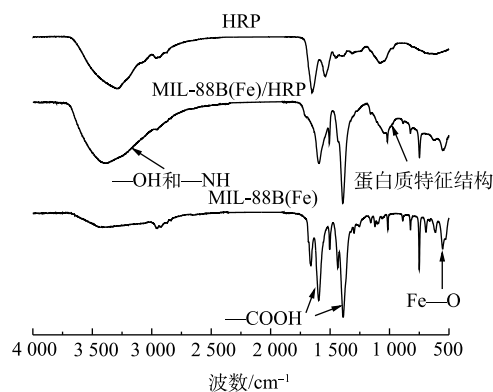


图 3 HRP、MIL-88(Fe) 和 MIL-88(Fe)/HRP 的 FTIR 图谱

Fig. 3 FTIR spectra of HRP, MIL-88B(Fe) and MIL-88B(Fe)/HRP

与文献 [13] 中报道的结果相同。在 552 cm^{-1} 处的强波段为 Fe—O 振动峰。在 1548 cm^{-1} 和 1394 cm^{-1} 处的 2 个峰是羧基的不对称振动峰和对称振动峰，这证实了 MIL-88B(Fe) 材料中存在二羧酸配体^[14]。在负载 HRP 后，MIL-88(Fe) 出现了新的特征峰，其中 1029.93 cm^{-1} 为酰胺键的 N—H 弯曲振动峰，其在 $1174\sim 955\text{ cm}^{-1}$ 的蛋白质特征结构区域内^[15]， $3700\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ 处的特征峰为—OH 和—NH 基团^[16]。可以看出，固定化酶材料同时具有 MIL-88B(Fe) 和 HRP 的特征吸收峰，表明 MIL-88(Fe)/HRP 的成功制备。

4) TGA 分析。热重曲线 (图 4) 表明，MIL-88B(Fe) 在 $<350\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下具有良好的热稳定性。当温度高于 $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时，结构发生坍塌 (急剧失重)。与 MIL-88B(Fe) 相比，MIL-88(Fe)/HRP 的 TGA 曲线有 2 个明显的失重步骤。第 1 次质量损失 ($<100\text{ }^{\circ}\text{C}$) 是由于吸附水和结合水的蒸发^[17]。第 2 次质量损失 (约 $300\text{ }^{\circ}\text{C}$) 是由于 MOF 骨架的坍塌所致，这与 MIL-88B(Fe) 的变化趋势一致。当温度达到 $450\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时，固定化酶保留了 29.9% 的初始质量，比 MIL-88B(Fe) 的 25.3% 稍微高一点，这是由于固定化酶在热解过程中残留了一些有机物所导致的^[18]。

2.2 不同反应条件对 BPA 降解效果的影响

1) 反应时间及 PEG 的影响。在 pH 为 7.0 的条件下，对双酚 A ($20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 进行了降解实验，以评价合成材料的催化性质。如图 5 所示，MIL-88(Fe) 的吸附性能较差，在 3 h 内对双酚 A 的去除率仅为 22.6%。在添加了过氧化氢之后，没有观察到明显的催化效果。在相同条件下，以 MIL-88(Fe)/HRP 为催化剂，1 h 内可去除 50.5% 的 BPA。较低的 BPA 降解率可能是因为催化过程中自由基和聚合物附着在酶上，导致酶被灭活，从而使反应终止^[19]。为了防止这种情况发生，一些研究者建议在反应体系中加入如聚乙二醇 (PEG) 等高亲水性物质。PEG 可以在 HRP 活性中心附近形成保护层，防止反应过程中形成的游离苯氧基破坏过氧化物酶；同时，PEG 对降解产物的亲和力比酶强，可以防止降解产物与酶结合^[20]。在 PEG 的作用下，MIL-88(Fe)/HRP 材料可以实现高效快速降解 BPA，反应 1 h 后，BPA 的去除率高达 99.2%。与之前的相关研究相比，MIL-88(Fe)/HRP 表现出优异的催化性能 (表 1)。

在催化剂投加量为 $0.06\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、BPA 初始质量浓度为 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，可以看出，在初始 60 min 内双酚 A 降解速度较快，随着时间的推移，降解速度有所减慢，在 3 h 基本达到降解平衡，此时双酚 A 的降解率为 98.4%。因此，确定最佳降解反应时间为 3 h。如图 6 所示，当 PEG/BPA 的质量比为 0.1 时，双酚 A 的降解率为 72.7%。随着 PEG 用量的增加，双酚 A 的降解率显著提高。这是由于

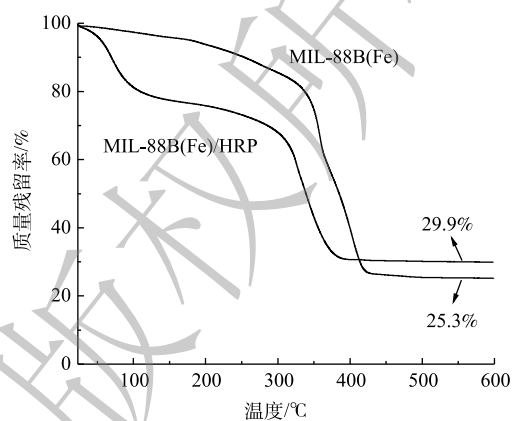


图 4 MIL-88(Fe) 和 MIL-88(Fe)/HRP 的 TGA 图谱
Fig. 4 TGA curves of MIL-88B(Fe) and MIL-88B(Fe)/HRP

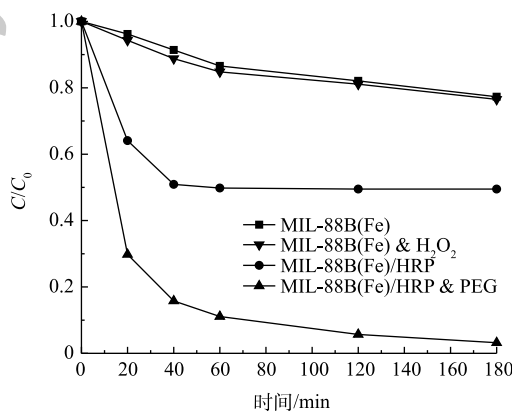


图 5 不同条件下催化材料对 BPA 的去除率
Fig. 5 Removal rate of BPA by catalytic materials under different conditions

表 1 不同材料固定化酶对 BPA 的去除率
Table 1 BPA removal rate of enzyme immobilized with different materials

固定化材料	酶	催化剂投加量/ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	BPA初始浓度/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	降解时间/ min	去除率/ %	参考文献
海绵蛋白支架	漆酶	1.00	2	1 440	>95	[21]
MCMSs	漆酶	2.00	20	720	85	[22]
PFM	HRP	0.1425	8.7	180	93	[23]
TiO ₂ 修饰的PVDF薄膜	漆酶	<0.40	34.5	5 760	91.7	[24]
NF薄膜	HRP	120	20	180	95	[25]
APTES改性的TiO ₂ 纳米颗粒	漆酶	500	34.5	300	>80	[26]
磁丝纤蛋白纳米颗粒	HRP	500	50	160	80.3	[27]
MCN	HRP	0.5	10	50	85.7	[28]
MIL-88(Fe)	HRP	0.10	20	60	99.2	本研究

注: NF薄膜、APTES改性的TiO₂纳米颗粒、磁丝纤蛋白纳米颗粒3种固定化材料的催化剂投加量单位为 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

酶失活数量的减少,降解反应得以继续。当PEG/BPA的质量比为0.4时,双酚A降解率达到98.4%,且随着PEG的进一步添加,降解率保持不变。因此,确定最佳PEG/BPA的质量比为0.4。

2) 反应温度的影响。由图7(a)可以看出,在较低温度(15~35℃)下,各温度下的降解率差异较小;随着反应温度提高,酶开始失活。因此,选择常温25℃进行后续实验。

3) 双酚A初始质量浓度的影响。如图7(b)所示,当双酚A质量浓度为 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,MIL-88B(Fe)/HRP的降解效率最高;随着双酚A质量浓度由 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加到 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,其去除率有所下降。其原因是,过多的双酚A分子聚集,导致无法接触HRP上的活性位点^[29]。此外,随着双酚A质量浓度的增加,酶催化的反应速率趋于平衡,双酚A的去除率开始降低。值得注意的是,即使双酚A质量浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,仍有

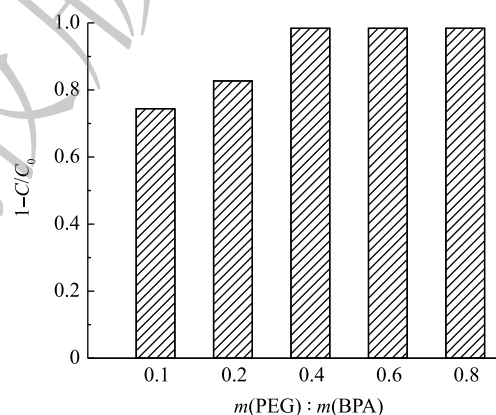
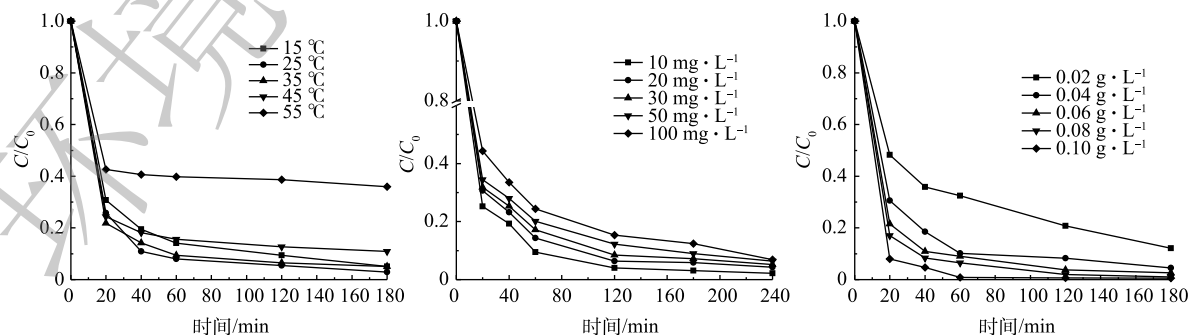


图 6 PEG 投加量对 BPA 去除率的影响

Fig. 6 Effect of PEG dosage on the removal rate of BPA



(a) 不同反应温度对BPA降解效果的影响 (b) 不同初始浓度对BPA降解效果的影响 (c) 不同催化剂投加量对BPA降解效果的影响

图 7 不同降解实验条件对 BPA 降解效果的影响

Fig. 7 Effects of different degradation conditions on the degradation of BPA

93.1%的BPA在4 h内被去除,这显示了MIL-88B(Fe)/HRP优秀的降解性能及其在废水处理中潜在的应用前景。

4) 催化剂用量的影响。如图7(c)所示,当催化剂用量由 $0.02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加到 $0.10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,双酚A的降解率迅速提高,这是因为降解双酚A的催化活性位点有所增加。当催化剂用量为 $0.10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,1 h内可去除99.2%的BPA,但酶用量过高势必会导致成本增加。为了降低成本,控制反应速率以及方便测量,选择 $0.06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为双酚A降解的最佳催化剂剂量。

2.3 酶促反应动力学

利用米氏方程和Lineweaver-Burk图计算游离酶和固定化酶的动力学参数(米氏常数 K_m 和最大反应速率 v_{\max})。采用Bradford法测定得出材料固定化酶的最大负载量为 $38.9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$,在保证酶的质量相同的情况下测定游离酶和固定化酶的参数。如图8(a)所示,随着底物浓度的增加,酶促反应速率先增加后趋于平稳。与游离酶相比,由于传质受限,固定化酶的反应速率较低^[30]。米氏常数 K_m 值是指酶与底物之间的亲和力,其值的大小只与酶的性质有关系, K_m 值越小,底物与酶的亲和力越高。如图8(b)所示,游离酶的 K_m 为 $0.34 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,固定化酶的 K_m 值增加到了 $0.47 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, v_{\max} 由 $19.23 \text{ mmol}\cdot(\text{L}\cdot\text{min})^{-1}$ 下降到 $14.28 \text{ mmol}\cdot(\text{L}\cdot\text{min})^{-1}$ 。这是由于共价固定改变了酶蛋白的构象,阻碍了底物与HRP活性位点的接触,使亲和力降低,最大反应速率降低。经实验测定,固定化酶可以保留游离酶活性的70.6%。

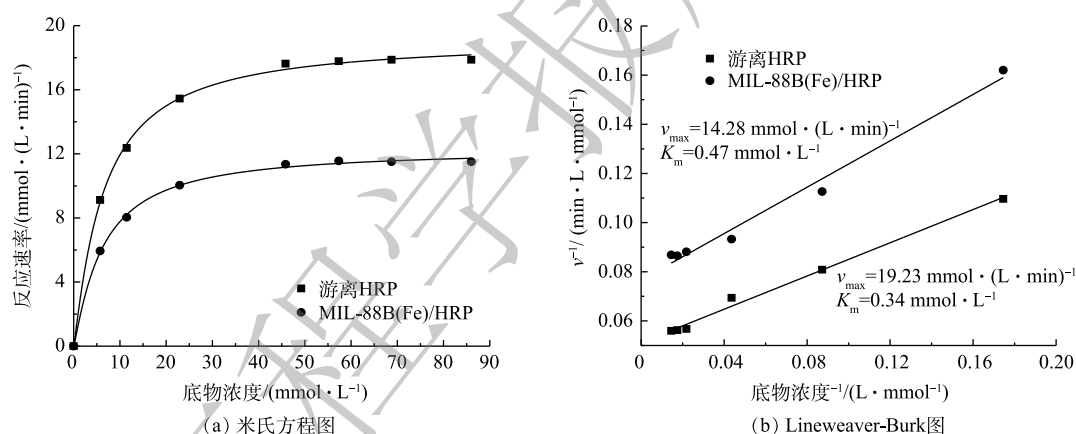


图8 游离和固定化HRP的米氏方程图和Lineweaver-Burk图

Fig. 8 Michaelis-Menten plots and Lineweaver-Burk plots of free and immobilized HRP

2.4 热稳定性和贮存稳定性

在工业应用中,酶的高温变性也是一个迫切需要解决的问题。固定和游离HRP的热稳定性实验,是通过在 $25\sim 60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 内孵育1 h后,测量其残余活性来进行。由图9(a)可以看出,经过 $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 热处理后,游离HRP的残余活性下降到55.9%,而固定化后的HRP仍保持初值的70.2%。在不同温度下,MIL-88B(Fe)/HRP的活性均高于游离酶。上述结果表明,固定化酶比游离酶具有更好的耐热性,这是由于固定化限制了酶的构象变化所致。据报道,MIL-88B(Fe)的保护作用可以抑制酶分子的展开和非特异性聚集,从而防止HRP的热变性^[31]。

合成样品的贮存稳定性是评价固定化效率的重要指标。对MIL-88B(Fe)/HRP和游离HRP均通过在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 去离子水中存储30 d后的残余活性进行评估(图9(b))。与所预期一样,MIL-88B(Fe)/HRP的活性下降速度明显慢于游离酶。固定化后的HRP在储藏15 d后仍保留了高达90%的初始活性,而游离的HRP的活性则降低到初始活性的64%。30 d后,游离HRP只剩下26.2%的初始活性,而合成材料的活性达到70%以上。游离HRP活性的丧失可能是由于在贮存过程中蛋白构象发生变

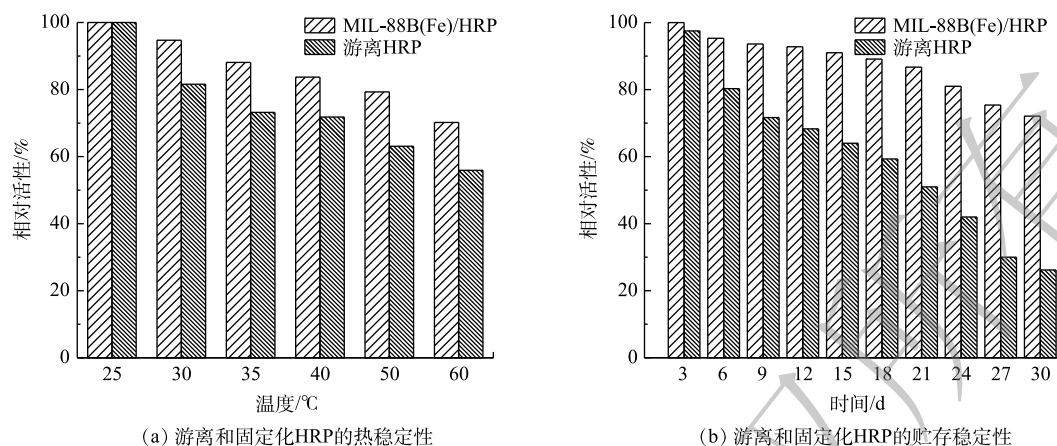


图 9 游离和固定化 HRP 的稳定性

Fig. 9 Stability of free and immobilized HRP

化, 活性位点不能与底物反应^[32]。相反, MIL-88B(Fe)/HRP 由于与酶形成强共价键, 对构象变化表现出很强的抗性^[33]。因此, 固定化酶比游离 HRP 更稳定, 保质期更长。上述结果表明, MIL-88B(Fe)/HRP 具有良好的耐久性, 在工业应用中具有较大的潜力。

2.5 固定化 HRP 的可重复使用性

酶固定化的主要目的之一是实现酶的重复利用。为此, 研究了 MIL-88B(Fe)/HRP 在连续使用数次后的残留活性。如图 10 所示, 固定化的 HRP 经过 4 次循环, 残余活性仍超过 80%, 且第 4 次降解后 MIL-88B(Fe)/HRP 的 XRD 谱图仍保留了原材料的特征峰 (图 11)。这表明催化剂经循环使用后其结构没有发生变化, 具有较高的稳定性。其原因与 HRP 和 MIL-88B(Fe) 通过 EDC/NHS 形成的强共价键有关, 共价键的形成可增强催化剂的结构稳定性, 防止酶的脱落, 从而保持较高的催化活性^[34]。但催化剂的相对活性随着重复使用次数的增加而降低, 对于活性降低的可能原因有 3 点: 一是由于样品量微小, 部分 MIL-88B(Fe)/HRP 在回收过程中丢失, 材料回收率仅为 91.3%; 二是反应过程中产物在催化剂表面的积累会阻碍 HRP 的活性位点, 对下一个反应周期产生不利影响^[35]; 三是 HRP 在与底物反应过程中蛋白发生部分折叠或变性, 导致酶失活^[36]。从整体上看, 固定化酶具有分离简单、稳定性好、可回收等优点, 从而可大大降低酶体系的实际应用成本。

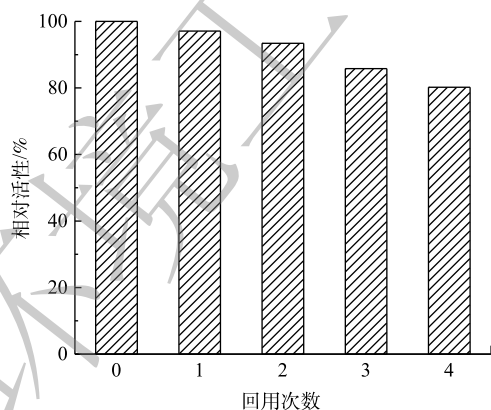


图 10 固定化 HRP 可重用性

Fig. 10 Reusability of immobilized HRP

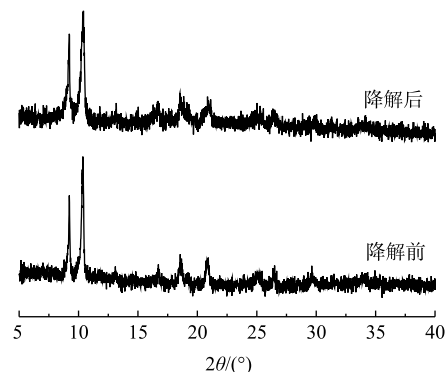


图 11 MIL-88(Fe)/HRP 降解 BPA 前后的 XRD 图谱

Fig. 11 XRD patterns before and after BPA degradation by MIL-88B(Fe)/HRP

3 结论

1) 通过 EDC/NHS 共价交联体系将 HRP 固定化到 MIL-88B(Fe) 上, 可得到 MIL-88B(Fe)/HRP 复

合材料；通过一系列 XRD、FTIR、SEM、TGA 等手段的表征，证明了 MIL-88B(Fe) 的成功合成，及 HRP 的成功负载。

2) 在 PEG/BPA 质量比为 0.4 的情况下，最终确定在 pH 为 7、25 °C、BPA 的初始质量浓度为 20 mg·L⁻¹，固定化酶投加量为 0.06 g·L⁻¹ 的实验条件下，3 h 内可去除 98.4% 的 BPA。

3) 在酶固定化后，酶与底物的亲和力降低。酶的活性保留了游离 HRP 的 70.6%。

4) 在固定化酶之后，MIL-88B(Fe)/HRP 比游离 HRP 具有更好的热稳定性、贮存稳定性和可重复使用性，这可为工业应用提供潜在的可能性。

参 考 文 献

- [1] LUO Z F, CHEN H Y, WU S C, et al. Enhanced removal of bisphenol A from aqueous solution by aluminum-based MOF/sodium alginate-chitosan composite beads[J]. *Chemosphere*, 2019, 237: 124493.
- [2] ZHANG L, MI J L, HU G N, et al. Facile fabrication of a high-efficient and biocompatibility biocatalyst for bisphenol A removal[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 150: 948-954.
- [3] BESHARATI VINEH M, SABOURY A A, POOSTCHI A A, et al. Stability and activity improvement of horseradish peroxidase by covalent immobilization on functionalized reduced graphene oxide and biodegradation of high phenol concentration[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 106: 1314-1322.
- [4] PYLYPCHUK I V, DANIEL G, KESSLER V G, et al. Removal of diclofenac, paracetamol, and carbamazepine from model aqueous solutions by magnetic sol-gel encapsulated horseradish peroxidase and lignin peroxidase composites[J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2020, 10(2): 282-301.
- [5] XU W Q, JIAO L, YAN H Y, et al. Glucose oxidase-integrated metal-organic framework hybrids as biomimetic cascade nanozymes for ultrasensitive glucose biosensing[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(25): 22096-22101.
- [6] SHIH Y H, LO S H, YANG N S, et al. Trypsin-immobilized metal-organic framework as a biocatalyst in proteomics analysis[J]. *ChemPlusChem*, 2012, 77(11): 982-986.
- [7] DOHERTY C M, GRENCI G, RICCO R, et al. Combining UV lithography and an imprinting technique for patterning metal-organic frameworks[J]. *Advanced Materials*, 2013, 25(34): 4701-4705.
- [8] LAURIER K G, VERMOORTELE F, AMELOOT R, et al. Iron(III)-based metal-organic frameworks as visible light photocatalysts[J]. *Journal of American Chemical Society*, 2013, 135(39): 14488-14491.
- [9] YI X R, HE X B, YIN F X, et al. NH₂-MIL-88B-Fe for electrocatalytic N₂ fixation to NH₃ with high faradaic efficiency under ambient conditions in neutral electrolyte[J]. *Journal of Materials Science*, 2020, 55(26): 12041-12052.
- [10] WANG S, FANG H, WEN Y K, et al. Applications of HRP-immobilized catalytic beads to the removal of 2, 4-dichlorophenol from wastewater[J]. *RSC Advances*, 2015, 5(71): 57286-57292.
- [11] CHANG Q, TANG H Q. Immobilization of horseradish peroxidase on NH₂-modified magnetic Fe₃O₄/SiO₂ particles and its application in removal of 2, 4-dichlorophenol[J]. *Molecules*, 2014, 19(10): 15768-15782.
- [12] LEI Z D, XUE Y C, CHEN W Q, et al. The influence of carbon nitride nanosheets doping on the crystalline formation of MIL-88B(Fe) and the photocatalytic activities[J]. *Small*, 2018, 14(35): 1802045.
- [13] VU T A, LE G H, VU H T, et al. Highly photocatalytic activity of novel Fe-MIL-88B/GO nanocomposite in the degradation of reactive dye from aqueous solution[J]. *Materials Research Express*, 2017, 4(3): 035038.
- [14] LIN J W, HU Y Y, WANG L X, et al. M88/PS/Vis system for degradation of bisphenol A: Environmental factors, degradation pathways, and toxicity evaluation[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2020, 382: 122931.

- [15] SAMUI A, SAHU S K. One-pot synthesis of microporous nanoscale metal organic frameworks conjugated with laccase as a promising biocatalyst[J]. *New Journal of Chemistry*, 2018, 42(6): 4192-4200.
- [16] JIA Y T, CHEN Y C, LUO J, et al. Immobilization of laccase onto meso-MIL-53(Al) via physical adsorption for the catalytic conversion of triclosan[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 184: 109670.
- [17] ZHANG R Z, WANG L, HAN J, et al. Improving laccase activity and stability by HKUST-1 with cofactor via one-pot encapsulation and its application for degradation of bisphenol A[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 383: 121130.
- [18] 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.
- [19] DALAL S, GUPTA M N. Treatment of phenolic wastewater by horseradish peroxidase immobilized by bioaffinity layering[J]. *Chemosphere*, 2007, 67(4): 741-747.
- [20] CHENG J, YU S M, ZUO P. Horseradish peroxidase immobilized on aluminium-pillared inter-layered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater[J]. *Water Research*, 2006, 40(2): 283-290.
- [21] 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.
- [22] LIN J H, LIU Y J, CHEN S, et al. Reversible immobilization of laccase onto metal-ion-chelated magnetic microspheres for bisphenol A removal[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 84: 189-199.
- [23] XU R, CHI C L, LI F T, et al. Immobilization of horseradish peroxidase on electrospun microfibrous membranes for biodegradation and adsorption of bisphenol A[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 149: 111-116.
- [24] HOU J W, DONG G X, YE Y, et al. Enzymatic degradation of bisphenol-A with immobilized laccase on TiO₂ sol-gel coated PVDF membrane[J]. *Journal of Membrane Science*, 2014, 469: 19-30.
- [25] ESCALONA I, DE GROOTH J, FONT J, et al. Removal of BPA by enzyme polymerization using NF membranes[J]. *Journal of Membrane Science*, 2014, 468: 192-201.
- [26] HOU J W, DONG G X, LUU B, et al. Hybrid membrane with TiO₂ based bio-catalytic nanoparticle suspension system for the degradation of bisphenol A[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 169: 475-483.
- [27] XU J, TANG T T, ZHANG K, et al. Electroenzymatic catalyzed oxidation of bisphenol A using HRP immobilized on magnetic silk fibroin nanoparticles[J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46(5): 1160-1165.
- [28] ZHANG H B, WU J C, HAN J, et al. Photocatalyst/enzyme heterojunction fabricated for high-efficiency photoenzyme synergic catalytic degrading bisphenol A in water[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2020, 385: 123764.
- [29] CAO W, YUAN Y H, YANG C, et al. In-situ fabrication of g-C₃N₄/MIL-68(In)-NH₂ heterojunction composites with enhanced visible-light photocatalytic activity for degradation of ibuprofen[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2020, 391: 123608.
- [30] BILAL M, BARCELO D, IQBAL H M N. Persistence, ecological risks, and oxidoreductases-assisted biocatalytic removal of triclosan from the aquatic environment[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 735: 139194.
- [31] VINEH M B, SABOURY A A, POOSTCHI A A, et al. Biodegradation of phenol and dyes with horseradish peroxidase covalently immobilized on functionalized RGO-SiO₂ nanocomposite[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 164: 4403-4414.
- [32] CHANG Q, HUANG J, DING Y B, et al. Catalytic oxidation of phenol and 2, 4-dichlorophenol by using horseradish peroxidase immobilized on graphene oxide/Fe₃O₄[J]. *Molecules*, 2016, 21(8): 1044.
- [33] ZHAI R, ZHANG B, WAN Y Z, et al. Chitosan-halloysite hybrid-nanotubes: Horseradish peroxidase immobilization and

- applications in phenol removal[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2013, 214: 304-309.
- [34] HU Y L, DAI L M, LIU D H, et al. Progress & prospect of metal-organic frameworks (MOFs) for enzyme immobilization (enzyme/MOFs)[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2018, 91: 793-801.
- [35] CHANG Q, JIANG G D, TANG H Q, et al. Enzymatic removal of chlorophenols using horseradish peroxidase immobilized on superparamagnetic Fe₃O₄/graphene oxide nanocomposite[J]. *Chinese Journal of Catalysis*, 2015, 36(7): 961-968.
- [36] SHAKERIAN F, ZHAO J, LI S P. Recent development in the application of immobilized oxidative enzymes for bioremediation of hazardous micropollutants: A review[J]. *Chemosphere*, 2020, 239: 124716.

(责任编辑: 曲娜)

Degradation of bisphenol A using horseradish peroxidase immobilized on MIL-88B(Fe)

CAI Wenting¹, XU Jiabin¹, DU Kesi¹, CHENG Jianhua^{1,2,*}

1. College of Environment and Energy, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China

2. South China Institute of Collaborative Innovation, South China University of Technology, Dongguan 523808, China

*Corresponding author, E-mail: jhcheng@scut.edu.cn

Abstract In this study, a water-stable Fe-based metal-organic framework material of MIL-88B (Fe) was prepared through a solvothermal method, then horseradish peroxidase was immobilized on MIL-88B (Fe) using covalent fixation method to prepare MIL-88B (Fe)/HRP composite for the degradation of bisphenol A (BPA). The material was characterized via XRD, FTIR, SEM and TGA methods. The results showed that HRP was successfully immobilized on MIL-88B(Fe) without changing its morphology and crystal structure. The BPA degradation experiments showed that MIL-88B(Fe)/HRP could effectively remove BPA by adding the hydrophilic agent polyethylene glycol, and the removal rate of BPA was up to 99.2% within 1 h. The effects of PEG dosage, initial BPA concentration and immobilized enzyme dosage on the BPA degradation efficiency were investigated. The results showed that at PEG/BPA mass ratio of 0.4, pH=7, 25 °C, initial BPA concentration of 20 mg·L⁻¹, immobilized enzyme dosage of 0.06 g·L⁻¹, 98.4% BPA could be removed within 3 h. At the same time, MIL-88B(Fe)/HRP had good stability and reusability. The storage stability and thermal stability of immobilized HRP were better than that of free HRP. After 4 cycles, the residual activity of immobilized HRP was still more than 80%. This study provides a reference for the development of new enzyme fixation materials and their application in wastewater treatment.

Keywords MIL-88B(Fe); immobilized enzyme; horseradish peroxidase; bisphenol A