

李 霆,李强强,姜艳军,等. 二氧化硅纳米花固定化酶及其有机磷农药降解性能[J]. 江苏农业科学,2022,50(10):104-109.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.10.017

二氧化硅纳米花固定化酶及其有机磷农药降解性能

李 霆¹,李强强¹,姜艳军²,马 丽²

(1. 精品药业股份有限公司,河北邢台 055550; 2. 河北工业大学化工学院,天津 300130)

摘要:有机磷农药在蔬菜、水果及土壤中的残留严重影响了环境和人类的身体健康。有机磷水解酶(organophosphate pesticides, OPH)能高效降解有机磷类化合物残留,利用具有开放孔道的二氧化硅纳米花固定有机磷水解酶,可以优化固定化条件,固定化 OPH 的最适温度为 45 ℃,最适 pH 值为 8,与游离 OPH 相比,在温度为 35 ~ 55 ℃、pH 值为 7.5 ~ 9.0 的范围内均能保持较高的催化活性。与游离有机磷水解酶相比,固定化有机磷水解酶具有更好的热稳定性、pH 值稳定性和重复使用性。研究结果表明,固定化酶在保证降解效率的同时,可有效降低有机磷水解酶的使用成本,是一种具有发展前景的固定化酶降解有机磷农药技术。

关键词:有机磷降解酶;有机磷农药;二氧化硅纳米花;固定化酶;降解

中图分类号: S482.3⁺3; S188⁺.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)10-0104-06

有机磷农药(organophosphate pesticides, OPs)是我国乃至世界范围内使用最广泛的一类用于农作物和蔬果的杀虫剂,由于其与生物体内的乙酰胆碱具有相似的结构,从而会影响生物体内正常的神经系统传递过程,达到消灭害虫的目的^[1-3]。但在自然界中,有机磷农药会持续存在很长时间,给环境和人类健康带来严重威胁^[3-7]。因此,开发可以在水体、农作物、土壤中应用的高效降解有机磷农药技术十分必要。

目前,针对有机磷农药的降解方法主要分为热降解法、化学降解法和生物酶降解法,由于生物酶法具有反应专一性强、反应条件温和、绿色环保的优势而受到广泛关注^[8-13]。有机磷水解酶(organophosphate pesticides, OPH)是一种广泛存在于生物体内的酯酶,能够高效催化有机磷农药的降解。2020 年,白俊岩等利用 OPH 降解甲基对硫磷,在优化的试验条件下,OPH 对有机磷类化合物的降解率达到 98% 以上^[14]。用 OPH 降解有机磷类毒剂时,通常需要将 OPH 固定在载体上,与直接使用游离酶相比,在保证酶催化性能的同时,解决了游离酶难分离、重复使用的缺陷。固定化酶的方法和载

体的选择是影响固定化酶效果的关键因素。因此,开发适合 OPH 固定的良好载体,并通过合适的固定化方法维持酶的活性与稳定性是目前亟待解决的问题。

本研究制备了具有开放孔道结构的二氧化硅纳米花作为载体固定化 OPH。二氧化硅纳米花具有独特的孔道结构,可以提高 OPH 的负载量,同时可为 OPH 提供适宜的微环境,有利于保持酶分子的活性构象,使固定化酶表现出良好的催化活性。通过单因素和正交试验对固定化酶的条件进行优化,考察固定化酶的酶学性能,并对固定化 OPH 在真实样品中的降解能力和重复使用性进行了测定。褶皱二氧化硅纳米花不仅为固定化酶提供了一种良好载体,同时该技术也为在蔬果中实现有机磷农药的降解提供了新方法。

1 材料与方法

1.1 试验试剂

OPH,购于西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)、正丁醇、环己烷、乙醇、尿素、碳酸钠(Na_2CO_3)和正硅酸乙酯(tetraethyl orthosilicate, TEOS),购于天津市大茂化学试剂厂;甲基对硫磷、对硝基苯酚(*p*-nitrophenol, PNP)、三氯乙酸、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

收稿日期:2021-07-05

基金项目:河北省重点研发计划(编号:20372802D)。

作者简介:李 霆(1986—),男,河北石家庄人,助理工程师,研究方向为生物制药、酶催化转化。E-mail:394953230@qq.com。

通信作者:马 丽,博士研究生,高级实验师,研究方向为生物传感、酶催化转化。E-mail:malihebut@163.com。

1.2 仪器与设备

集热式恒温加热磁力搅拌器 (DF-101S), 购自河南予华仪器有限公司; 管式炉 (KRG-9-12), 购自洛阳科热炉业有限公司; 紫外可见分光光度计 (UV-1100), 购自上海仪电分析仪器有限公司; 扫描电子显微镜 (NanoSEM450) 和透射电子显微镜 (TalosF200s), 购自美国 FEI 公司; 漩涡振荡器 (XW-80A), 购自上海青浦沪西仪器厂。

1.3 试验方法

1.3.1 褶皱二氧化硅纳米花的制备方法 将 CTAB (1.0 g)、正丁醇 (1.0 g) 和尿素 (30 g, 0.4 mol/L) 置于单口烧瓶中, 搅拌至完全溶解, 向上述溶液中加入 12 g 环己烷, 待完全溶解后缓慢滴加 2 g 正硅酸乙酯, 搅拌 30 min, 于 70 °C、恒温条件下磁力搅拌反应 20 h, 用蒸馏水、95% 乙醇洗涤, 在煅烧炉中于 550 °C 空气煅烧 5 h, 除去未反应的 CTAB, 得到褶皱二氧化硅纳米花颗粒 (SiO_2NF)。

1.3.2 固定化酶的制备方法 取一定量褶皱二氧化硅, 在水浴振荡下使其均匀分散在 1 mL Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol/L, pH 值为 8.0) 中, 加入 OPH, 在一定温度下孵育一定时间, 离心分离后收集沉淀, 用去离子水清洗 3 次, 真空干燥后得到固定化酶 (OPH@ SiO_2NF)。

1.3.3 载体及固定化酶的特征方法 通过扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 和透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 对 OPH@ SiO_2NF 的形貌和结构进行表征。

1.3.4 游离 OPH 和 OPH@ SiO_2NF 活性的测定 通过比色法测定游离 OPH 和 OPH@ SiO_2NF 的活性。OPH 可将甲基对硫磷降解为对硝基苯酚 (PNP), 与 Na_2CO_3 会发生颜色变化, 反应方程见图 1。根据颜色变化来衡量游离 OPH 和 OPH@ SiO_2NF 的活性。

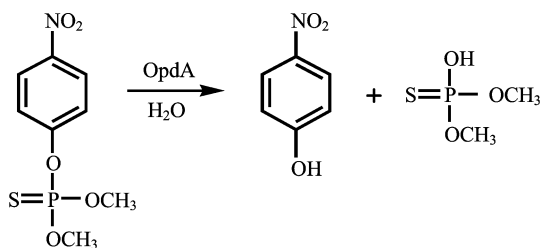


图1

具体测定条件: 取适量游离 OPH 或固定化 OPH@ SiO_2NF , 加入至含有甲基对硫磷 (5 μL 10 mg/mL) 的 Tris-HCl 缓冲液 (50 mmol/L, pH 值

为 8.0) 中, 于 37 °C 反应 5 min, 立即加入 1 mL 终止剂三氯乙酸 (10%) 终止反应, 再加入 1 mL 碳酸钠 (10%) 显色, 测定其在 410 nm 处的吸光度。根据 PNP 标准曲线得到 PNP 产量并计算酶活性。1 个酶活性单位 (U) 定义: 37 °C 反应 1 min 产生 1 μmol PNP 所需的酶量。

1.3.5 OPH@ SiO_2NF 和 OPH 的酶学性质分析

1.3.5.1 固定化酶的最适温度 取一定量 OPH@ SiO_2NF 和 OPH, 在不同温度的 Tris-HCl 缓冲液中孵育 10 min 后, 测定其活性。

1.3.5.2 固定化酶的最适 pH 值 取一定量 OPH@ SiO_2NF 和 OPH, 在不同 pH 值的缓冲液中孵育 10 min 后, 在 37 °C 测定其活性。

1.3.5.3 有机溶剂耐受性的分析 取一定量 OPH@ SiO_2NF 和 OPH, 在不同浓度的甲醇和 DMSO 溶液中孵育 10 min 后, 在 37 °C、最适 pH 值下测定其活性。

1.3.5.4 热稳定性和 pH 值稳定性的分析 分别将一定量的 OPH 和 OPH@ SiO_2NF 置于 Tris-HCl 缓冲液 (pH 值为 8.0) 中, 于 50、60 °C 水浴条件下孵化, 每隔一定时间测其剩余活性。分别将一定量的 OPH 和 OPH@ SiO_2NF 置于不同 pH 值的缓冲液 (pH 值为 8.0) 中, 在 50、60 °C 水浴条件下孵化, 每隔一定时间测其剩余活性。

1.3.5.5 储藏稳定性分析 分别将一定量的 OPH 和 OPH@ SiO_2NF 置于 Tris-HCl 缓冲液 (pH 值为 8.0) 中, 在 37 °C 水浴条件下孵化, 每隔一定时间测其剩余活性。

1.3.6 OPH@ SiO_2NF 和 OPH 在实际蔬果中对甲基对硫磷的降解能力测定 在天津市本地蔬菜市场购买苹果和卷心菜, 摘除腐败叶片后, 用清水清洗泥污后晾干。取 2 g 苹果与卷心菜, 喷洒上 2 mL 1×10^{-5} mol/L 甲基对硫磷, 静置 1 h 后, 将苹果与卷心菜置于 5 mL 含有 5% 丙酮的缓冲溶液中, 于 25 °C 反应 1 h, 再于 8 000 r/min 离心 5 min, 取上清于 410 nm 处测定吸光度, 计算酶降解活性。

1.4 正交试验优化固定化条件

在单因素试验的基础上, 以蛋白负载量和降解活性为评价标准, 利用正交试验对固定化过程进行优化, 试验因素和水平见表 1。

2 结果与分析

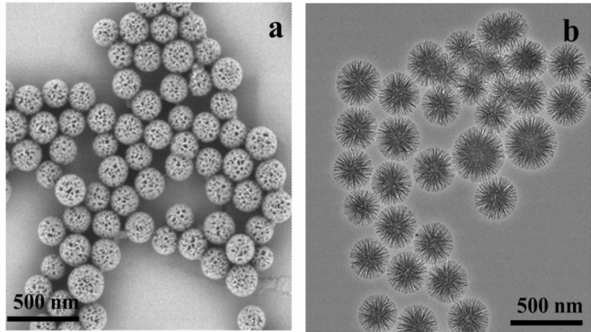
2.1 SiO_2NF 的表征

利用 SEM 考察 SiO_2NF 的外部形貌, 由图 2-a

表 1 正交试验设计

试验号	初始酶浓度 (mg/mL)	吸附时间 (h)	摇床转速 (r/min)	固定化温度 (℃)
1	35	8	50	25
2	45	12	100	30
3	55	16	150	35
4	65	20	200	40

可以看出, SiO₂NF 为高度分散、尺寸均一(粒径为 80 ~ 120 nm)的花状纳米颗粒,表面分布着开放的孔道。SiO₂NF 的 TEM(图 2 - b)与 SEM 表征的纳米颗粒尺寸一致。由 TEM 结果可以看出, SiO₂NF 表面的枝状孔道深嵌入纳米颗粒的中心位置。因此可见, SiO₂NF 的放射状孔道结构可为后面固定化酶修饰提供较大的比表面积,并且在反应体系中有利于传质。



a. 扫描电镜结果
b. 透射电镜结果
图2 SiO₂NF 的扫描电镜和透射电镜结果

2.2 SiO₂NF 固定化 OPH 条件的筛选

为筛选出最佳固定化 OPH 条件,通过单因素试验研究不同初始酶浓度和吸附时间 2 个关键因素对固定化 OPH 酶活性的影响。由图 3 可见,随着初始酶浓度的增大,蛋白负载量也呈现出不断上升的趋势,但当初始酶浓度超过 55 mg/mL 时,蛋白负载量增大不明显,而且在吸附 16 h 时,所有酶浓度固定化 OPH 均可达到吸附平衡。

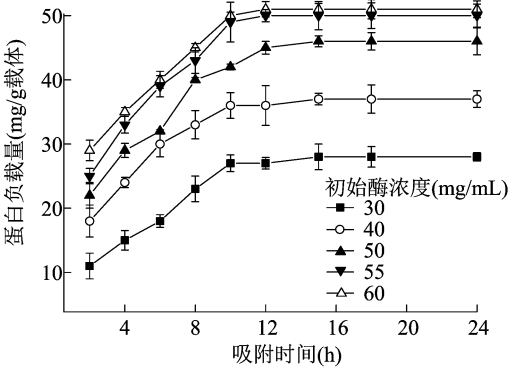


图3 初始酶浓度和吸附时间对 OPH@SiO₂NF 酶活性的影响

由图 4 可见,当初始酶浓度达到 55 mg/mL 后,降解活性不再上升,反而表现出降低趋势。这是由于当初始酶活性过高时,酶分子在载体内部的聚集程度增大,造成酶分子之间活性位点相互遮盖,减少了底物、产物与活性位点接触的机会,导致降解活性降低^[15-17]。

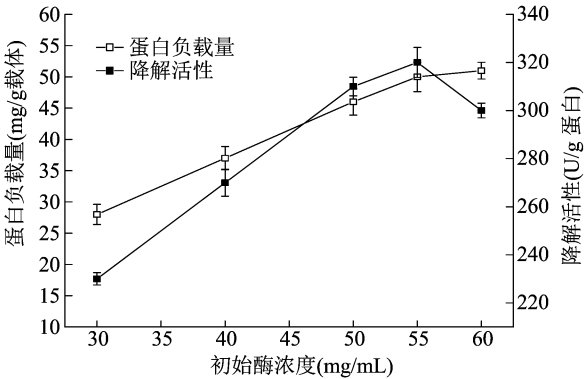


图4 初始酶浓度对 OPH@SiO₂NF 蛋白负载量和降解活性的影响

在单因素试验的基础上,选取不同初始酶浓度、吸附时间、摇床转速和固定化温度 4 个因素,通过正交试验对固定化条件进行优化,取 4 因素 4 水平,设计 L₁₆ 正交试验,试验结果如表 2 所示。根据正交试验法对固定化条件的优化结果及极差分析可知,上述 4 个因素对固定化酶蛋白负载量的影响顺序依次为初始酶浓度 > 吸附时间 > 固定化温度 > 摇床转速,获得蛋白负载量最优的试验设计方案是 A₄B₃C₂D₂,上述 4 个因素对降解活性的影响顺序依次为初始酶浓度 > 吸附时间 > 固定化温度 > 摇床转速,获得降解活性最优的试验设计方案是 A₃B₄C₂D₄,综合考虑蛋白负载量和降解活性,后续固定化酶试验选择初始酶浓度为 55 mg/mL,吸附时间为 16 h,摇床转速为 100 r/min,固定化酶的温度为 35 ℃,此时的降解活性为 320 U/g,蛋白负载量为 51 mg/g。

2.3 游离 OPH 和 OPH@ SiO₂NF 酶学性能的分析

2.3.1 游离 OPH 和 OPH@ SiO₂NF 的最适温度 分别对游离 OPH 和 OPH@ SiO₂NF 的最适温度进行研究,由图 5 可见,游离 OPH 在 40 ℃时表现出最高的相对活性,而固定化后的 OPH@ SiO₂NF 在 45 ℃时的酶活性最高。OPH@ SiO₂NF 的最适温度要高于游离 OPH,因为 OPH 被固定于 SiO₂NF 上后,限域作用的影响使其展现活性所需的活化能比游离 OPH 高。而当温度继续升高时,游离的 OPH 和固定化 OPH 的相对活性都有不同程度的降低,这是由于酶分子在过高的温度下会产生不可逆的构象变

表 2 正交试验分析结果

试验号	初始酶浓度 (mg/mL)	吸附时间 (h)	摇床转速 (r/min)	固定化温度 (℃)	蛋白负载量 (mg/g)	降解活性 (U/g)
1	35	8	50	25	25.32	200
2	35	12	100	30	32.56	245
3	35	16	150	35	35.36	260
4	35	20	200	40	33.33	262
5	45	8	100	35	32.36	235
6	45	12	50	40	32.63	279
7	45	16	200	25	37.96	252
8	45	20	150	30	39.28	293
9	55	8	150	40	38.61	269
10	55	12	200	35	42.96	300
11	55	16	50	30	51.66	322
12	55	20	100	25	50.33	325
13	65	8	200	30	42.36	241
14	65	12	150	25	49.63	266
15	65	16	100	40	50.29	300
16	65	20	50	35	50.77	286
$k_{\text{蛋白负载量1}}$	31.643	34.662	40.095	40.810		
$k_{\text{蛋白负载量2}}$	35.558	39.445	41.385	41.465		
$k_{\text{蛋白负载量3}}$	45.890	43.817	40.720	40.363		
$k_{\text{蛋白负载量4}}$	48.263	43.428	39.153	38.715		
$R_{\text{蛋白负载量}}$	16.620	9.155	2.232	2.750		
$k_{\text{降解活性1}}$	241.750	236.250	271.750	260.750		
$k_{\text{降解活性2}}$	264.750	272.500	276.250	275.250		
$k_{\text{降解活性3}}$	304.000	283.500	272.000	270.250		
$k_{\text{降解活性4}}$	273.250	291.500	263.750	277.500		
$R_{\text{降解活性}}$	62.250	55.250	12.500	16.750		

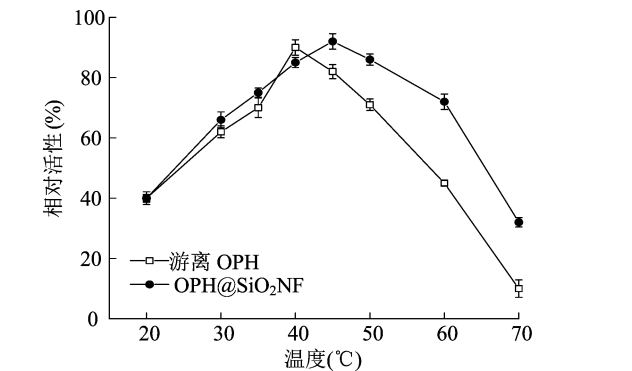


图5 游离 OPH 和 OPH@SiO₂NF 在不同温度下的相对活性

化^[18-20],使酶丧失活性。

2.3.2 游离 OPH 和 OPH@SiO₂NF 的最适 pH 值
对游离 OPH 和 OPH@SiO₂NF 的最适 pH 值进行研究,由图 6 可见,游离酶在 pH 值为 8.5 时的相对活性最高,达到 95%,相比较而言,OPH@SiO₂NF 在 pH 值为 7.5~9.0 之间均表现出较高的相对活性,

OPH@SiO₂NF 的最适 pH 值为 8。从图 6 还可以看出,通过固定化后的 OPH 在较宽的 pH 值范围内均能保持较高的酶活性,这是由于将 OPH 固定于 SiO₂NF 的孔道中,为酶分子提供了良好的微环境,其酶活性中心得到保护^[21],从而表现出稳定的酶活性。

2.4 游离 OPH 和 OPH@SiO₂NF 稳定性能的分析

2.4.1 有机溶剂耐受性 OPH 降解的有机磷农药及神经毒剂等,通常需要丙酮、乙腈等有机溶剂对其进行溶解,但此类极性较强的有机溶剂会引起 OPH 失活,因此选择乙腈和丙酮溶剂对游离 OPH 和 OPH@SiO₂NF 的有机溶剂耐受性进行研究。由图 7 可以看出,在 25% 乙腈溶液中,OPH@SiO₂NF 仍然可以保留 80% 的剩余活性,而游离 OPH 仅有 50% 的剩余活性。同样的,在不同浓度的丙酮溶液中,OPH@SiO₂NF 的稳定性也优于游离 OPH,这是

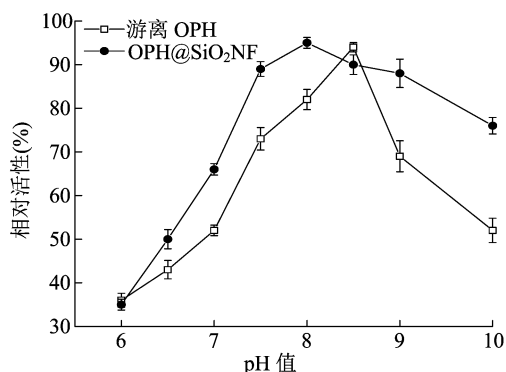


图6 游离 OPH 和 OPH@SiO₂NF 在不同 pH 值下的相对活性

因为当游离 OPH 直接接触有机溶剂时,其内部蛋白质的高级结构中的非极性基团与极性溶剂作用,导致酶高级结构构象发生变化,使酶失活,而固定化的 OPH、SiO₂NF 有效保护了酶分子,可以防止其构象发生变化,从而有效保持酶活性^[22]。

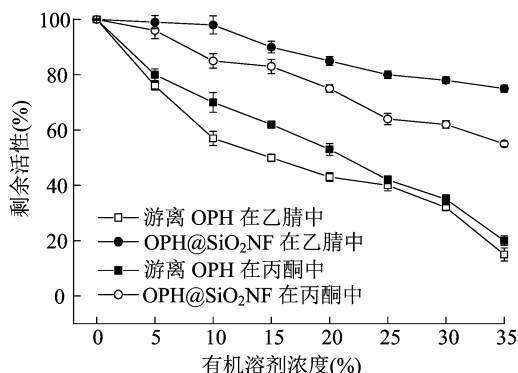


图7 游离 OPH 和 OPH@SiO₂NF 在不同浓度有机溶剂中的酶活性

2.4.2 热稳定性 为了研究游离 OPH 和 OPH@SiO₂NF 的热稳定性,将游离和固定化酶分别在 50、60 ℃ 下孵育一段时间,再研究其剩余酶活性。由图 8 可见,在 50、60 ℃ 下孵育 4 h 后,OPH@SiO₂NF 分别可以保持 60.08%、52.91% 的初始酶活性,而游离 OPH 在相同条件下分别仅能保持初始酶活性的 32.83%、21.65%。试验结果表明,在高温操作条件下,固定化酶的稳定性比游离酶强,OPH@SiO₂NF 可以抵抗高温引发的酶分子构象变化,这可能是由于 OPH 酶分子与二氧化硅纳米花载体之间的静电作用^[22],使酶分子长时间在高温条件下仍能保持其原有构象,从而维持较高的酶活性。

2.4.3 储藏稳定性 对游离 OPH 和 OPH@SiO₂NF 的储藏稳定性进行研究,由图 9 可见,游离酶储藏至 12 d 时,仅剩余初始酶活性的 50% 左右;而 OPH@SiO₂NF 储藏至 20 d 时,仍可保持 80% 以上的初始酶活性。说明固定化后的 OPH 稳定性得到了明显提升,这可能是由于固定在合适的载体上后,为

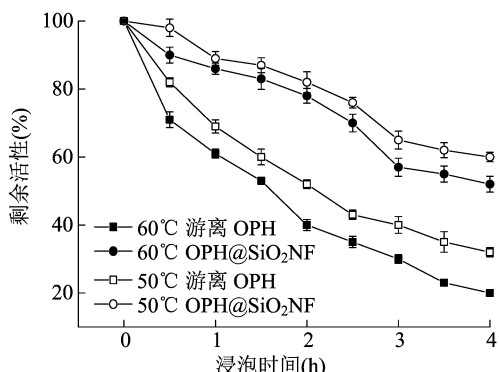


图8 游离 OPH 和 OPH@SiO₂NF 的热稳定性

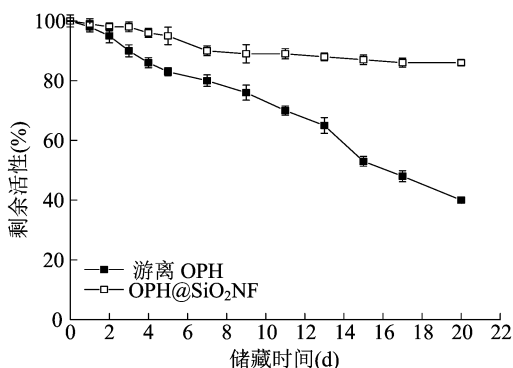


图9 游离 OPH 和 OPH@SiO₂NF 的储藏稳定性

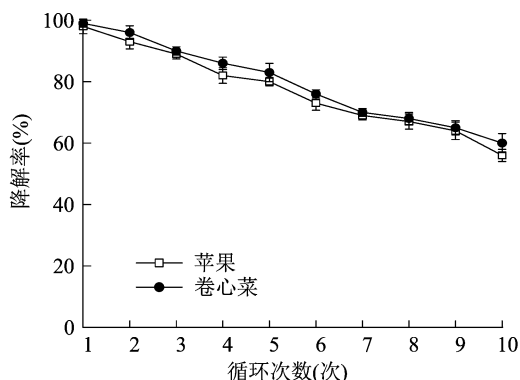
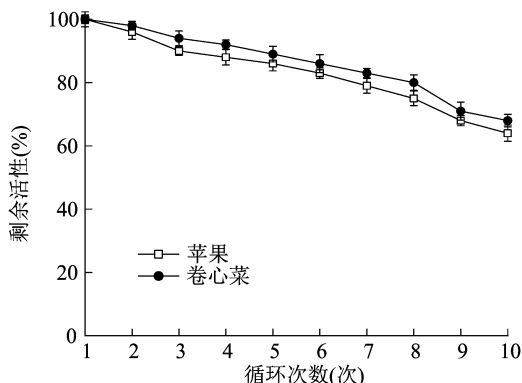
OPH 酶分子提供了适宜的微环境,并且可以抵御外界环境引发的酶构象变化,从而使 OPH 在较长时间内仍能维持较高的催化活性。

2.5 OPH@SiO₂NF 用于蔬果有机磷农药的降解性能

由于固定化酶方便回收分离再重复使用,可以有效降低酶的使用成本,因而受到广泛关注,笔者对 OPH@SiO₂NF 在实际蔬果中的应用及重复使用性进行了研究。由图 10、图 11 可见,OPH@SiO₂NF 用于苹果、卷心菜中有机磷农药的降解,在重复使用 10 次后,剩余酶活性都保持在 65% 以上,降解率保持在 60% 以上。说明 OPH@SiO₂NF 具有良好的降解能力,而且重复使用性良好,多次重复使用后酶活性下降,可能由于在多次使用过程中对固定化酶回收的损失造成的。

3 结论

本研究成功制备了粒径均一、高度分散的二氧化硅纳米花,其表面分布着明显的孔道结构。利用吸附法固定化 OPH,对固定化条件及固定化酶的酶学性能进行研究发现,初始酶浓度为 55 mg/mL,吸附时间为 16 h,酶活性为 320 U/g,蛋白负载量为 51 mg/g。固定化 OPH 的最适温度为 45 ℃,最适 pH

图10 OPH@SiO₂NF 在重复使用过程中降解率的变化图11 OPH@SiO₂NF 在实际降解过程中的重复使用性

值为8,与游离 OPH 相比,在温度为 35 ~ 55 ℃、pH 值为 7.5 ~ 9.0 的范围内均能保持较高的催化活性,同时表现出良好的热稳定性、pH 值稳定性和储藏稳定性,在真实样品中重复使用 10 次后,仍能保持初始活性的 65% 以上。由此可见,OPH@SiO₂NF 具有在有机磷农药降解方面的应用潜力,同时这种表面分布开放的孔道结构的二氧化硅纳米花是一种良好的固定化酶载体,为保护酶分子的高级结构提供了良好的保护,是一种十分具有发展潜力的固定化载体,可以应用于工业催化、药物递送、气体吸附等更多的领域。

参考文献:

- [1] 汪德生. 微生物抗菌、降解有机磷农药研究进展[J]. 环境保护与循环经济,2015,35(5):33-36,47.
- [2] 贺茂芳,秦蓓,张博,等. 固定金属亲和磁性吸附剂对有机磷农药残留的固相萃取性能[J]. 分析科学学报,2021,37(3):351-355.
- [3] Uniyal S, Sharma R K. Technological advancement in electrochemical biosensor based detection of organophosphate pesticide chlorpyrifos in the environment; a review of status and prospects[J]. Biosensors & Bioelectronics,2018,116:37-50.
- [4] Zhao F N, Wu J, Ying Y B, et al. Carbon nanomaterial-enabled

pesticide biosensors: design strategy, biosensing mechanism, and practical application[J]. Trends in Analytical Chemistry,2018,106:62-83.

- [5] 李陈娟. 浅析食用农产品农药残留检测技术应用及优化措施[J]. 食品安全导刊,2019(34):42-43.
- [6] 林瑾. 果蔬中农药残留检测技术及其条件优化研究[J]. 江西化工,2019(4):118-120.
- [7] 毛金竹,肖淑玲,杨智淳,等. 合成生物学在农残检测领域的应用[J]. 化工学报,2021,72(5):2413-2425.
- [8] 高慢慢,白俊岩,孙磊,等. 有机磷水解酶对不同有机磷农药降解功效的评价[J]. 江苏农业科学,2019,47(8):217-220.
- [9] 潘玉娟,尹芳,张无敌,等. 有机磷降解剂对生菜农残降解效果分析[J]. 安徽农业科学,2015,43(32):136-138.
- [10] 王丽红,张林,陈欢林. 有机磷农药酶生物传感器研究进展[J]. 化学进展,2006,18(4):440-452.
- [11] 金潇,颜冬云,秦文秀. 有机磷农药的微生物降解技术[J]. 湖南农业科学,2011(9):93-97.
- [12] 聂司宇,孟昊,王淑红. 微生物对有机磷农药残留的降解[J]. 环境保护与循环经济,2020,40(3):44-49.
- [13] 全爽,李晔,金丽华,等. 有机磷水解酶及其在传感器应用中的研究进展[J]. 生态科学,2015,34(1):198-204.
- [14] 白俊岩,高慢慢,孙磊,等. 有机磷水解酶对甲基对硫磷的快速降解及检测[J]. 江苏农业科学,2020,48(4):186-191.
- [15] 韩玉,瞿成良,王亚斌,等. 超小孔径树枝状介孔二氧化硅纳米球的制备和表征[J]. 人工晶体学报,2020,49(4):684-688,704.
- [16] Li R, Yang J, Xiao Y Z, et al. *In vivo* immobilization of an organophosphorus hydrolyzing enzyme on bacterial polyhydroxyalkanoate nano-granules[J]. Microbial Cell Factories,2019,18(1):166.
- [17] Wang Y B, Du X, Liu Z, et al. Dendritic fibrous nano-particles (DFNPs): rising stars of mesoporous materials[J]. Journal of Materials Chemistry A,2019,7(10):5111-5152.
- [18] Jaquish R, Reilily A K, Lawson B P, et al. Immobilized glucose oxidase on magnetic silica and alumina; beyond magnetic separation[J]. International Journal of Biological Macromolecules,2018,120(A):896-905.
- [19] 项云,陈强,许杪,等. 介孔二氧化硅纳米球孔结构及其酶固定性能[J]. 中国粉体技术,2020,5(9):66-71.
- [20] 庞乾辉,吴一鑫,俞丽萍,等. 整体型大孔/介孔 PDA/SiO₂ 复合材料固定化漆酶及其在染料降解中的应用[J]. 化工进展,2019,38(2):1018-1026.
- [21] Nakayama K, Ishikawa S, Ohmori T, et al. Immobilization of organophosphorus hydrolase for the degradation of organophosphorus nerve agents[J]. The Journal of General and Applied Microbiology,2016,62(1):38-41.
- [22] Sharifi M, Robatjazi S M, Sadri M, et al. Covalent immobilization of organophosphorus hydrolase enzyme on chemically modified cellulose microfibers: statistical optimization and characterization[J]. Reactive & Functional Polymers,2017,124:162-170.