

# 磁性氧化石墨烯对 HRP 的固定 及对苯酚的催化研究

毕淑娴 雷文雅 张 聪 李廷林 詹海鹃 马保军 刘万毅

(宁夏大学化学化工学院, 省部共建煤炭高效利用与绿色化工国家重点实验室, 银川 750021)

**摘 要** 以氧化石墨烯为原料, 戊二醛为交联剂, 用组装技术制备出磁性氧化石墨烯, 并对辣根过氧化物酶 (HRP) 进行固载并考察其固载条件, 选择最佳固载条件, 探究磁性氧化石墨烯载体固载 HRP 对苯酚的催化研究。以苯酚为降解底物, 比较了磁性氧化石墨烯固载酶与游离酶在不同 pH、温度条件下的催化降解效率, 在反应温度为 40℃, pH=8 条件下, 制得的磁性氧化石墨烯固载 HRP 对苯酚的去除率最高达到 96.7%。

**关键词** 固载酶, 磁性, 氧化石墨烯, 苯酚, 降解

## Magnetic fixation of HRP by graphene oxide and its catalytic research on phenol

Bi Shuxian Lei Wenya Zhang Cong Li Tinglin Zhan Haijuan Ma Baojun Liu Wanyi

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Ningxia University, State Key Laboratory of High-efficiency Utilization of Coal and Green Chemical Engineering, Yinchuan 750021)

**Abstract** Magnetic graphene oxide was prepared by using assembly technology and glutaraldehyde as crosslinking agent. The horseradish peroxidase (HRP) was immobilized and its immobilization conditions were investigated. The optimal loading conditions were selected and the magnetic graphene oxide carrier was immobilized. Phenol was used as degradation substrate, and the catalytic degradation efficiency of magnetic graphene oxide-supported enzyme and free enzyme at different pH and temperature were compared. In the catalytic degradation of phenol test, the phenol degradation rate was 96.7% under the temperature of 40℃ and pH = 8.

**Key words** immobilized enzyme, magnetic crosslinking, graphene oxide, phenol, degradation

酚类化合物是工业上常见的有机污染物, 随着工业的发展, 含酚废水的种类与数量都日益增加。对含酚废水的处理方法有多种。MacDonald 等<sup>[1]</sup>采用活性炭对含酚废水进行了吸附动力学与热力学研究, 最终得出吸附模型。吴慧英等<sup>[2]</sup>以活性炭为吸附剂和吸波载体对含酚废水进行处理。对含酚废水处理方法还有膜分离法、化学方法和生化方法等。总体来说, 这些方法效果良好, 有些方法在实际操作中也切实可行, 但是这些方法存在一些缺陷, 因而寻找高效、快速、廉价和无产生毒副产物对含酚废水进行处理十分必要。

固定化酶的载体材料已经由最初的活性炭、黏土<sup>[3]</sup>、金属氧化物<sup>[4]</sup>、玻璃球发展到合成聚苯乙烯材

料<sup>[5]</sup>和磁性高分子微球<sup>[6]</sup>等高分子复合材料。为了获得高活性且适用于实际的固载酶, 科研人员已对相关酶的固定载体材料进行了大量筛选和探索, 对固载方法也进行了大量的研究。酶的固定化技术的进一步研究, 对我国的含酚废水处理有积极的促进作用。本研究在游离酶处理苯酚的基础上, 将酶固定于载体上, 提高固定化酶的活力范围以及处理含酚废水的效率。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂

氧化石墨烯(工业级), 青岛岩海碳材料公司; 壳聚糖(生化试剂), 上海中秦有限公司; 冰乙酸(分析

**基金项目:** 国家自然科学基金(21467022); 宁夏自然科学基金资助项目(NZ17048); 宁夏“化学工程与技术”国内一流学科建设项目资助(NXY-LXK2017A04); 2017 年宁夏回族自治区自治区级大学生创新创业训练计划项目(201710749027); 宁夏大学西部一流大学建设项目(ZKZD2017003)

**作者简介:** 毕淑娴(1981-), 女, 硕士, 副教授, 从事复合材料的制备及污水处理研究。

纯),上海广诺有限公司;戊二醛(分析纯),上海中泰公司;4-氨基安替比林(分析纯),天津市凯通公司;苯酚(分析纯),湖北巨胜有限公司;30%过氧化氢(分析纯),天津市东方化工公司;磷酸二氢钠、磷酸氢二钠,均为分析纯,天津市大茂有限公司;辣根过氧化物酶(HRP,生化试剂),九水合硝酸铁 $[\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}]$ 、七水合硫酸亚铁 $(\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ 、一水合氨、四氧化三铁 $(\text{Fe}_3\text{O}_4)$ ,阿拉丁试剂有限公司。

## 1.2 仪器

电子分析天平(BS124S型)、酸度计(PB-10型),德国赛多利斯公司;磁力搅拌器(JB-3型),江苏澳华有限公司;超声波清洗机(YFT-1048S型),苏州英菲腾超声科技有限公司;真空干燥箱(DZF-6210型),上海一恒科技有限公司;高速离心机(CR22G型),日本日立公司;恒温振荡器(THZ-82B型),常州申光仪器有限公司;紫外-可见分光光度计(UV-Vis,1240型),日本岛津公司;傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR,TENSOR27型)、X射线能谱分析仪(XPS,QUANTAX200型),德国布鲁克公司。

## 1.3 交联磁性氧化石墨烯材料的制备

### 1.3.1 壳聚糖-氧化石墨烯的制备

配制1%的醋酸,称取0.05g壳聚糖溶于10g 1%的醋酸中,采用磁力搅拌器(JB-3型,江苏澳华有限公司)磁力搅拌至溶液澄清透明,备用,称取0.8g氧化石墨烯,加入12mL 0.5%的壳聚糖溶液,采用磁力搅拌器(JB-3型,江苏澳华有限公司)磁力搅拌12h后静置,倒去上清液,并洗涤至中性,过滤,将其采用真空干燥箱(DZF-6210型,上海一恒科技有限公司)80℃烘干,轻微研磨后即制得壳聚糖-氧化石墨烯复合材料。

### 1.3.2 磁性氧化石墨烯的制备

准确称取 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  3.3g和 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.1g,置于500mL烧杯中,加蒸馏水250mL,采用磁力搅拌器(JB-3型,江苏澳华有限公司)磁力搅拌,同时滴加6mol/L的一水合氨溶液,当溶液的pH达到11~12之间时停止滴加,反复洗涤溶液至中性,即得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁流体。称取0.8g壳聚糖-氧化石墨烯,加入5mL  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁流体,采用磁力搅拌器(JB-3型,江苏澳华有限公司)搅拌15min后,采用超声波清洗机(YFT-1048S型,苏州英菲腾超声科技有限公司)超声20min,然后采用真空干燥箱(DZF-6210型,上海一恒科技有限公司)80℃烘干,轻微研磨后,即制得磁性氧化石墨烯。

### 1.3.3 交联磁性氧化石墨烯的制备

称取0.8g磁性氧化石墨烯,加入5mL 50%的戊二醛溶液,采用磁力搅拌器(JB-3型,江苏澳华有限公司)搅拌4h后静置,洗涤3~5次洗去多余的戊二醛,采用真空干燥箱(DZF-6210型,上海一恒科技有限公司)80℃烘干,研磨即制得交联磁性氧化石墨烯。

## 1.4 固载酶对苯酚的催化性能测试

### 1.4.1 固载酶对苯酚的催化机理

HRP催化过氧化氢氧化苯酚时,生成难溶于水的化合物,可通过离心或沉淀方式加以分离,即在HRP的作用下,过氧化氢将苯酚氧化,产生了活性高的苯氧自由基中间产物,它们与苯酚分子或苯氧自由基本身发生反应,生成了一系列的聚合物。

### 1.4.2 固载酶对苯酚的催化测试

固载酶对苯酚的催化步骤如下:(1)称取一组按上述步骤固载的样品酶,加入10 $\mu\text{L}$  0.08mol 苯酚,10 $\mu\text{L}$  0.1mol 过氧化氢,980 $\mu\text{L}$  0.1mol 磷酸盐缓冲液,混合均匀后室温静置反应12h;(2)反应结束后往样品管中加入200 $\mu\text{L}$  4%硫酸铝钾,采用高速离心机(CR22G型,日本日立公司)进行离心分离;(3)取上清液500 $\mu\text{L}$ 于10mL比色管,依次加入7.5mL缓冲液,1mL 83.4mmol 铁氰化钾溶液,1mL 20.8mmol 4-氨基安替比林溶液混合,静置5min后采用紫外-可见分光光度计(UV-Vis,1240型,日本岛津公司)测定其在510nm处的吸光度值;(4)再根据苯酚标准曲线方程计算上清液中残留的苯酚浓度,进一步得到苯酚的去除率。

## 1.5 样品的测试

采用傅里叶变换红外光谱仪(FT-IR,TENSOR 27型,德国布鲁克公司)对样品进行红外光谱测试。采用X射线能谱分析仪(XPS,QUANTAX 200型,德国布鲁克公司)对样品进行元素测试。

## 2 结果与讨论

### 2.1 磁性氧化石墨烯的 FT-IR 分析

磁性氧化石墨烯的FT-IR谱图见图1。从图可以看出,磁性氧化石墨烯在3188~3286 $\text{cm}^{-1}$ 处是C—H和N—H的伸缩振动吸收峰;在3750 $\text{cm}^{-1}$ 处有吸收峰,该吸收峰应归因于—NH<sub>2</sub>和—OH的伸缩振动;1571 $\text{cm}^{-1}$ 是—NH<sub>2</sub>弯曲振动吸收峰,这些峰的吸收位置大部分有轻微的位移或峰的相对强度发生了变化,如在3750 $\text{cm}^{-1}$ 处的吸收峰较壳聚糖的吸收峰宽,这表明在磁性壳聚糖纳米粒子中存在增

强的氢键作用,也说明  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  和壳聚糖之间存在分子间的相互作用,因此可以认为静电吸附是成功的。

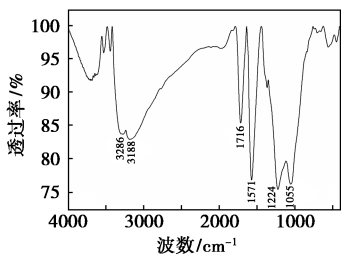


图 1 磁性氧化石墨烯的 FT-IR 谱图

## 2.2 磁性氧化石墨烯的 XPS 分析

磁性氧化石墨烯的 XPS 谱图见图 2。磁性氧化石墨烯元素分析见表 1。从图 2 和表 1 可知,磁性氧化石墨烯中检测出 O 和 Fe 元素,其中 O1s 元素含量为 36.69%,Fe 2p 元素含量为 11.87%,符合所制备的磁性氧化石墨烯的组成特征。

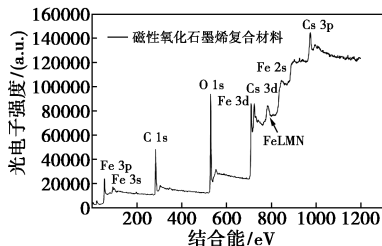


图 2 磁性氧化石墨烯的 XPS 谱图

表 1 磁性氧化石墨烯元素分析

| 样品名称    | 表面元素相对含量 <sup>①</sup> /% |       |       |       |
|---------|--------------------------|-------|-------|-------|
|         | O 1s                     | C 1s  | Fe 2p | Cs 3d |
| 磁性氧化石墨烯 | 36.69                    | 46.60 | 11.87 | 4.84  |

注:①%为原子百分比。

## 2.3 磁性氧化石墨烯对 HRP 的固载率分析

### 2.3.1 HRP 浓度对固载率的影响

HRP 浓度对磁性氧化石墨烯固载率的影响见图 3。从图可以看出,随着 HRP 浓度的增大,磁性氧化石墨烯的固载率呈不断降低态势,通过计算得出,磁性氧化石墨烯对 HRP 的最大固载量为

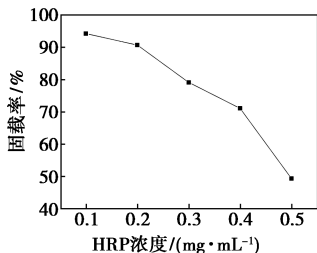


图 3 HRP 浓度对磁性氧化石墨烯固载率的影响

3.62mg/g,因此在后续实验中加入 10mg 磁性氧化石墨烯并使体系 HRP 浓度维持在  $5\mu\text{g}/\text{mL}$ ,使得酶和磁性氧化石墨烯均能得到最优的利用效果,避免造成浪费。

### 2.3.2 反应体系 pH 对固载率的影响

反应体系 pH 对磁性氧化石墨烯固载率的影响见图 4。从图可以看出,随着 pH 的增加,磁性氧化石墨烯对 HRP 的固载率呈逐渐下降态势,造成这种现象的原因可能是由于 HRP 的等电点为 7.2,当体系  $\text{pH} < 7.2$  时 HRP 带正电,其所带的氨基与磁性氧化石墨烯表面的羧基在交联剂的作用下通过形成共价键的方式进行结合。当体系  $\text{pH} > 7.2$  时,HRP 与磁性氧化石墨烯载体均带负电互相排斥,导致固载率降低。

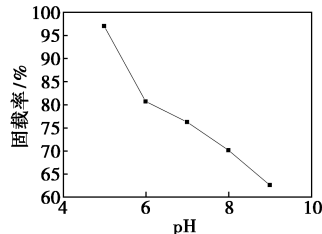


图 4 反应体系 pH 对磁性氧化石墨烯固载率的影响

## 2.4 磁性氧化石墨烯固载 HRP 降解苯酚的分析

### 2.4.1 温度对降解苯酚的影响

温度对磁性氧化石墨烯固载 HRP 降解苯酚的影响见图 5。从图可以看出,在反应温度为  $40^\circ\text{C}$  之前,磁性氧化石墨烯固载 HRP 对苯酚的去除率随温度升高呈略有增长态势,在温度为  $40^\circ\text{C}$  条件下,磁性氧化石墨烯固载 HRP 对苯酚的去除率最高达到 96.7%,当温度超过  $40^\circ\text{C}$  之后,去除率开始迅速下降,苯酚去除率下降的原因可能是由于温度升高造成酶活性降低导致的。

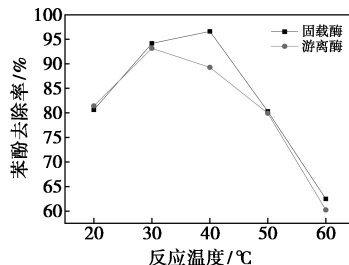


图 5 温度对磁性氧化石墨烯固载 HRP 降解苯酚的影响

### 2.4.2 pH 对降解苯酚的影响

由于磁性氧化石墨烯固载 HRP 后对 pH 稳定性高,在 pH 为 4~10 条件下都有一定催化活性。

在反应温度为 40℃ 条件下, pH 对磁性氧化石墨烯固载 HRP 降解苯酚的影响见图 6。从图可以看出, 在酸性条件下, 磁性氧化石墨烯固载 HRP 对苯酚的降解效果比游离酶略低, 但随着 pH 的增加, 尤其在碱性条件下, 固载酶对苯酚的去除率高于游离酶, 在 pH=8 条件下, 磁性氧化石墨烯固载 HRP 对苯酚的降解效果最好达到 96.7%。

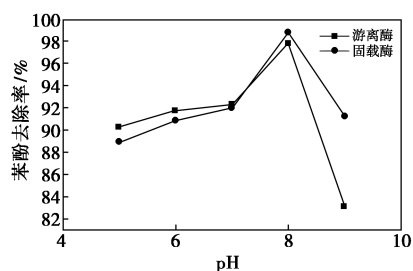


图 6 pH 对磁性氧化石墨烯固载 HRP 降解苯酚的影响

### 3 结论

以氧化石墨烯为原料, 戊二醛为交联剂, 通过静电自组装技术制备出交联磁性氧化石墨烯载体, 对辣根过氧化物酶在冰浴条件下进行固载并考察其固载条件, 选择最佳固载条件, 并探究其对苯酚的催化

降解性能, 研究结果表明: 在反应温度为 40℃, pH=8 条件下, 制得的磁性氧化石墨烯固载 HRP 对苯酚的去除率最高达到 96.7%, 对降解污水中的苯酚具有较好的效果。

### 参考文献

- [1] MacDonald J A F, Evans M J B. Adsorption and enthalpy of phenol on BPL carbon[J]. Carbon, 2002, 40(5): 703-707.
- [2] 吴慧英, 施周, 陈积义, 等. 两种微波活性炭法对苯酚的去除效果及其效能比较[J]. 中国给水排水, 2008, 4(23): 52-56.
- [3] Laurell T, Drott J, Rosengren L. Silicon wafer integrated enzyme reactors[J]. Biosensors and Bioelectronics, 1995, 10(3/4): 289-299.
- [4] Martin B, Simon E, Gyorgy M, et al. Improved performance in silicon enzyme microreactors obtained by homogeneous porous silicon carrier matrix[J]. Talanta, 2002, 56(2): 341-353.
- [5] Sun D M, Cai C X, Li X G, et al. Direct electrochemistry and bioelectrocatalysis of horseradish peroxidase immobilized on active carbon[J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2004, 566(2): 415-421.
- [6] 彭振, 姚可夫. 磁性纳米  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  颗粒的制备及在染料废水处理中的应用[J]. 化工新型材料, 2014, 42(12): 223-226.

收稿日期: 2017-04-24

修稿日期: 2018-07-11

(上接第 238 页)

- [48] 赵国发. 改性 PVDF 超滤膜的制备与表征及成膜机理研究[D]. 长春: 东北石油大学, 2012.
- [49] 张刚, 王鸿儒, 王倩倩, 等. 磺甲基化聚砜超滤膜的制备及在脱毛废水中的应用[J]. 工业水处理, 2013, 33(8): 44-47.
- [50] 陈佳丹. 超滤膜的制备及其在菜籽油脱胶中的应用[D]. 武汉: 武汉工业学院, 2012.
- [51] 纪芹, 郎万中, 郑斐尹, 等. 酚酞型聚醚砜(PES-C)超滤膜的制备及性能[J]. 功能高分子学报, 2012, 25(2): 81-87.
- [52] 王瑞莉, 沈诚, 李戎, 等. 新型抗静电整理剂 ITO(掺锡氧化铜)[J]. 印染, 2010, 36(16): 49-53.
- [53] 范苏, 邱鸣慧, 周邢, 等. 多通道  $\text{TiO}_2$  超滤膜的制备及其在印染废水中的应用[J]. 南京工业大学学报: 自然科学版, 2011,

33(1): 44-47.

- [54] 施圣芳, 谷景华, 张跃. 负载型  $\text{TiO}_2$  超滤膜的制备[J]. 功能材料, 2015(10): 10148-10152.
- [55] 滕双双, 罗肖, 王鹏飞, 等. 氧化铝超滤膜的制备及性能[J]. 功能材料, 2013, 44(20): 3030-3034.
- [56] 高云静. PVDF 中空纤维复合超滤膜制备及性能的研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2012.
- [57] 沈建平. PVB 及 PVDF 中空纤维超滤膜的制备及其性能的研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2013.
- [58] 陈培培, 徐佳, 蒋钰焯, 等. 新型抑菌  $\text{Cu}^{2+}$  固载超滤膜的制备及性能表征[J]. 高等学校化学学报, 2013, 34(3): 739-745.

收稿日期: 2017-04-10

(上接第 242 页)

- [10] McGovern M, Kallury K, Thompson M, et al. Role of solvent on the silanization of glass with octadecyltrichlorosilane[J]. Langmuir, 1994, 10(10): 3607-3614.
- [11] Wang Y, Lieberman M. Growth of ultrasoft octadecyltrichlorosilane self-assembled monolayers on  $\text{SiO}_2$  [J]. Langmuir, 2003, 19(4): 1159-1167.
- [12] Poda A, Anderson A, Ashurst W R. Self-assembled octadecyltrichlorosilane monolayer formation on a highly hydrated silica film[J]. Appl Surf Sci, 2010, 256(22): 6805-6813.
- [13] Di X, Zhang W, Zang D, et al. A novel method for the fabrication of superhydrophobic nylon net[J]. Chem Eng J, 2016, 306(30): 53-59.

tion of superhydrophobic nylon net[J]. Chem Eng J, 2016, 306(30): 53-59.

- [14] Wang M, Zhao T, Wang G, et al. Blend films of human hair and cellulose prepared from an ionic liquid[J]. Text Res J, 2014, 84(12): 1315-1324.
- [15] Liu F, Ma M, Zang D, et al. Fabrication of superhydrophobic/superoleophilic cotton for application in the field of water/oil separation[J]. Carbohydr Polym, 2014, 103(1): 480-487.
- [16] Nakajima A. Design of hydrophobic surfaces for liquid droplet control[J]. NPG Asia Mater, 2011, 3(5): 49-56.

收稿日期: 2017-05-20