

## 锰过氧化物酶的耦合固定化及其性质研究

# Studies on the Properties and Co-immobilization of Manganese Peroxidase

程晓滨 荚 荣\* 李平生 朱 芹 涂仕前 唐文忠

CHENG Xiao-Bin, JIA Rong\*, LI Ping-Sheng, ZHU Qin, TU Shi-Qian and TANG Wen-Zhong

安徽大学生命科学学院,安徽省生态工程与生物技术重点实验室,合肥 230039

School of Life Science, Anhui Key Laboratory of Eco-engineering and Bio-technique, Anhui University, Hefei 230039, China

**摘 要** 分别采用海藻酸钠、明胶和壳聚糖为载体,并以戊二醛为交联剂,通过包埋-交联和吸附-交联两种耦合固定化方法制备固定化锰过氧化物酶。探讨了酶的不同固定化条件和固定化酶的部分性能。与游离酶相比,制备的 3 种固定化酶最适反应 pH 分别由 7.0 降低到 5.0、5.0 和 3.0,最适反应温度分别由 35℃ 升高到 75℃、55℃ 和 75℃。3 种固定化酶的耐热性都显著提高,其中用壳聚糖制成的固定化酶在 pH 2.2~11 的宽范围内表现出很好的酸碱耐受性。30℃ 连续测定 6~9 次酶活力,重复使用的 3 种固定化酶显示出良好的稳定性。将固定化酶应用在偶氮染料的脱色中,用明胶制成的固定化酶在静置和摇床条件下,以及用海藻酸钠制成的固定化酶在摇床条件下,均表现出与游离酶相近的脱色能力,并且在重复进行的摇床实验中,脱色能力未降低,反应前后的酶活力均没有损失。

**关键词** 锰过氧化物酶,耦合固定化,海藻酸钠,明胶,壳聚糖,戊二醛,偶氮染料

中图分类号 Q814.2 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)01-0090-06

**Abstract** White-rot fungus manganese peroxidase (MnP) oxidizes a wide range of substrates, rendering it an interesting enzyme for potential applications. The stability of MnP can be improved by immobilization. With sodium alginate, gelatin, or chitosan as a carrier, and glutaraldehyde as the crosslinking agent, MnP was co-immobilized using the embed-crosslinked method and the adsorb-crosslinked method. The immobilization conditions and the partial properties of the three immobilized enzymes were investigated. When compared with the free enzyme, the optimum pH values and the temperatures of the three immobilized MnPs carried by alginate, gelatin, and chitosan were respectively shifted from 7.0 to 5.0, 5.0, 3.0 and from 35℃ to 75℃, 55℃, 75℃. The thermostabilities of the three immobilized MnPs were considerably better than that of the native enzyme. The chitosan-immobilized enzyme was stable in the wide range of pH 2.2 to pH 11. The enzyme activities of the three immobilized MnPs decreased by less than 5% even after repeated use for 6~9 times. The ability of decolorizing azo dyes in static and shaky situation by gelatin-immobilized MnP approached to the free enzyme, and there was no loss of enzyme activity during 2 repeated batch reactions.

**Key words** manganese peroxidase (MnP), co-immobilization, sodium alginate, gelatin, chitosan, glutaraldehyde, azo dye

锰过氧化物酶 (MnP, EC 1.11.1.13) 是最常见的木质素降解酶,它是一种需要 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的血红素糖

Received: August 25, 2006; Accepted: September 7, 2006.

This work was supported by the grant from the Natural Science Foundation of Anhui Province, the Natural Science Research Programme of the Educational Office of Anhui Province (No. 2006KJ162B) and the grant for Construction of the Staffs of Anhui University.

\* Corresponding author. Tel: +86-551-5107341; E-mail: jiarong@ah163.com

安徽省自然科学基金项目、安徽省教育厅自然科学基金项目(No. 2006J1162B)和安徽大学人才队伍建设项目资助 <http://journals.im.ac.cn>

蛋白。MnP 可将  $Mn^{2+}$  氧化为  $Mn^{3+}$ ,  $Mn^{3+}$  通过螯合作用与有机酸结合而变成稳定的高氧化还原电势, 因此 MnP 能够氧化和解聚各种底物, 包括木质素以及诸如硝基芳香族化合物、纺织染料等环境异生物质<sup>[1]</sup>。然而, MnP 比起其它的过氧化物酶较为不稳定, 低的酸碱耐受性和热不稳定性等都制约了 MnP 的商业应用<sup>[2]</sup>。

酶固定化是用固体材料将酶束缚或限制于一定区域内, 仍能进行其特有的催化反应, 并可回收及重复使用的一类技术, 可以克服上述的一些缺点。但目前有关 MnP 固定化的研究还很有限, 国内国外仅能见到以下的报道。Grabski AC 等通过共价结合将 MnP 固定在乙二醇和 2-乙氧基-1-乙氧碳酰基-1, 2-二氢喹啉 (EEDQ) 上<sup>[3-5]</sup>, Peralta-Zamora P 等通过吸附作用将 MnP 固定在安伯来特 IRA-400 树脂上<sup>[6]</sup>, Sasaki T 等通过吸附作用将 MnP 固定在中孔性的硅胶微球上<sup>[2]</sup>, Song SF 等通过包埋作用将 MnP 固定在明胶微乳胶内<sup>[7]</sup>。

近年来耦合固定化技术发展迅速, 在生物转化、手性拆分和废水处理等方面均有良好的应用实例<sup>[8]</sup>。耦合固定化是指几种固定化方法或载体的联合使用, 即添加稳定因子和促进因子的固定化方法。耦合固定化技术能够平衡传统单一固定化方法的优缺点, 使酶在保持原有活性的基础上, 稳定性有所提高, 还具有操作简单、成本低廉等优点。本实验选择海藻酸钠等 3 种常见载体, 对包埋-交联和吸附-交联两种耦合固定化方法的条件进行了优化。固定化酶的稳定性显著提高, 并进行了偶氮染料的脱色实验, 表现出良好的应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

锰过氧化物酶(锰过氧化物酶产于白腐菌 *Schizophyllum* sp. F17, 分子量 48.7kD, 由本实验室经过超滤浓缩、纤维素 DE52 阴离子交换层析、Sephadex G-75 凝胶过滤等纯化步骤得到, 纯度经电泳测试, 溶于 pH 5.9 的 HAc-NaAc 缓冲溶液 4℃ 保存, 酶活 70u/L); 2, 6-二甲氧酚 (DMP, Fluka 公司); 海藻酸钠、明胶、壳聚糖、戊二醛等为国产分析纯。

### 1.2 固定化锰过氧化物酶的制备

**1.2.1 包埋-交联法:**称取一定量的海藻酸钠溶于 90mL pH 5.9 的 HAc-NaAc 缓冲溶液中, 加入 10mL 酶液混合搅拌, 然后与 100mL 一定浓度的戊二醛溶液 (pH 5.9 的 HAc-NaAc 缓冲溶液作为溶解介质) 合

并均匀混合约 10min, 慢速搅拌并降温至 5~10℃, 通过 6 号注射器的针头将上述冷却液以 5cm 的高度注进一定浓度的氯化钙溶液中立刻形成光滑微球, 然后保持温度为 4℃。微球在一定浓度的氯化钙溶液中被硬化 30min。用去离子水洗涤后, 固定化酶被贮存在 0~5℃ 冰箱中准备在实验中使用。

### 1.2.2 吸附-交联法:

(1) 明胶:采用 0.18~0.32mm 细度的明胶, 将明胶与酶液按一定的质量体积比混合, 吸附 30min 后, 以适量的戊二醛溶液交联一段时间。用去离子水洗涤后, 固定化酶被贮存在 0~5℃ 冰箱中准备在实验中使用。

(2) 壳聚糖:用 1% 的乙酸溶解壳聚糖, 配制成一定浓度的壳聚糖溶液。用注射器滴入含有 20% 的 NaOH, 30% 的  $CH_3OH$  的凝结液中, 形成小球。所制微球, 滤去凝结液, 用去离子水反复清洗至中性。将微球与酶液按一定的质量体积比混合, 吸附 30min 后, 以适量的戊二醛溶液交联一段时间。用去离子水洗涤后, 固定化酶被贮存在 0~5℃ 冰箱中准备在实验中使用。

### 1.3 锰过氧化物酶活力测定

用紫外-可见分光光度法, 以 DMP 为底物测定锰过氧化物酶活力。在 3.3mL 0.1mol/L 的酒石酸钠缓冲液 (pH4.5) 中加入 0.1mL 4mmol/L  $H_2O_2$ 、0.1mL 40mmol/L  $MnSO_4$  和 0.1mL 40mmol/L DMP, 在 30℃ 水浴中预平衡 10min 后, 再加入 0.4mL 酶液, 30℃ 水浴 5min, 测定其吸光值 ( $\lambda = 469nm$ ) 在单位时间内的变化<sup>[9]</sup>。固定化酶活力测定反应体系同游离酶, 取固定化酶与底物混合均匀搅拌反应 5min, 取上清于 469nm 处测光吸收值。DMP 被氧化的产物的消光系数  $\epsilon = 55000(\text{mol/L})^{-1} \text{cm}^{-1}$ , 以每分钟氧化  $1\mu\text{mol}$  DMP 的酶量定义为 1 个酶活单位。

固定化酶的活力与固定化时所加游离酶总活力的比值即为酶的活力回收率。

### 1.4 偶氮染料的脱色实验

选取 3 种偶氮染料进行脱色研究, 分别为刚果红 (Congo red, 506nm)、金橙 G (Orange G, 474nm) 和橙黄 IV (Orange IV, 440nm)。

**1.4.1 静置实验:**实验直接在分光光度计的比色皿中进行。反应体系 (4mL) 中含有 0.1mol/L 的酒石酸钠缓冲液 (pH4.5)、0.1mmol/L  $H_2O_2$ 、1mmol/L  $MnSO_4$  和 1mmol/L 染料, 加入游离酶或固定化酶, 初始酶活均为 20u/L, 上述各试剂浓度均为终浓度。每隔

5min 记录一次数据,反应 60min。

**1.4.2 摇床实验:**选取 25mL 的锥形瓶,装入 10mL 的反应液,反应体系与静置实验相同,初始酶活均为 20u/L。将锥形瓶置于摇床上以 60r/min 的转速进行反应,每隔 20min 取反应液测定吸光值,反应 120min。使用后的固定化酶用去离子水洗涤,重复进行实验 1 次。

静置和摇床实验中,用缓冲液代替染料作为空白,以加入等质量无酶活的载体作为平行(测定载体对染料的吸附程度)。反应前后均测定固定化酶的酶活。

## 2 结果与讨论

### 2.1 锰过氧化物酶固定化条件优选

#### 2.1.1 包埋-交联法:

(1)海藻酸钠浓度对 MnP 固定化效果的影响:海藻酸钠浓度不仅影响凝珠的机械强度,还影响底物及产物的扩散,进而影响到固定化酶的活性<sup>[10]</sup>。CaCl<sub>2</sub> 浓度为 0.2mol/L 时,不同海藻酸钠浓度的固定化效果如图 1 所示。海藻酸钠与 Ca<sup>2+</sup> 反应形成凝胶,当海藻酸钠浓度较低时,凝胶孔径较大,凝胶内的酶分子容易流失;当海藻酸钠浓度过大时,凝胶孔径太小,此时底物和产物的扩散受到限制,因此,载体浓度应控制在适当的范围内。最终确定海藻酸钠的浓度为 1%。

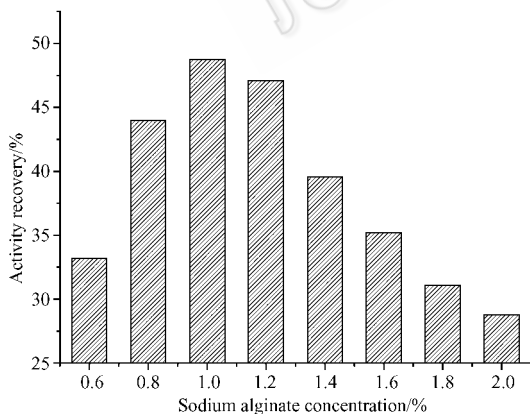


图 1 海藻酸钠浓度对 MnP 固定化的影响

Fig.1 Effect of sodium alginate concentration on the MnP immobilization

Immobilization conditions :CaCl<sub>2</sub> concentration = 0.2mol/L , glutaraldehyde concentration = 0.

(2)戊二醛浓度的确定:向海藻酸钠与酶液的混合液中加入等体积不同浓度的戊二醛溶液,戊二醛的最终浓度为 1% ~ 5%。均匀混合约 10min,在浓

度为 0.2mol/L CaCl<sub>2</sub> 溶液中造粒。戊二醛含有二个醛基,可与蛋白质中的氨基、酚基、巯基发生 Schiff 反应,相互交联而使固定化酶硬化,这种交联对酶活力的损失并不大,但却能达到使固定化酶的使用时间延长、机械强度增大、稳定性提高的效果。确定戊二醛的浓度最佳为 3%,活力回收率为 42%。

(3)CaCl<sub>2</sub> 浓度对 MnP 固定化效果的影响:配制 0.05 ~ 0.5mol/L 不同浓度的 CaCl<sub>2</sub> 溶液,在同一条件下进行固定化酶处理,固定时间为 0.5h。结果表明,当 CaCl<sub>2</sub> 浓度达到 0.1mol/L 时,固定化酶的活力回收率最高,而后呈快速下降趋势。这是因为当 CaCl<sub>2</sub> 浓度过小时,海藻酸钙凝胶固化不充分,锰过氧化物酶包埋不完全,容易流失;当 CaCl<sub>2</sub> 浓度过大时,Ca<sup>2+</sup> 会与锰过氧化物酶作用,使锰过氧化物酶活力下降。因此,固定化时 CaCl<sub>2</sub> 的最佳浓度为 0.1mol/L,活力回收率为 70%。

#### 2.1.2 明胶吸附-交联法:

(1)明胶微粒与酶液的质量体积比对 MnP 固定化效果的影响:固定化酶量直接关系到固定化酶的活性。酶液浓度越高,反应所需时间越短,反应速度越快<sup>[10]</sup>。将明胶微粒与酶液的质量体积比(g/mL)调整为 2:1、1:1、1:2、1:4 和 1:6,进行吸附 30min 后,用去离子水洗涤后,测定固定化酶的活力回收率。结果表明,质量体积比为 1:1 时最佳,活力回收率为 26.8%。

(2)戊二醛浓度对 MnP 固定化效果的影响:实验中,先将明胶微粒与酶液 1:1(g/mL)吸附 30min,然后用不同浓度的戊二醛溶液交联 10min,用去离子水洗涤后,测定固定化酶的活力回收率,结果如图 2 所示。戊二醛的浓度为 0.2% 时最佳,活力回收率为 66.8%。

(3)交联时间对 MnP 固定化效果的影响:交联时间是明胶微粒与锰过氧化物酶的混合液在浓度为 0.2% 的戊二醛溶液中的反应时间。交联时间对固定化酶收率的影响见图 3。随着交联时间的增加,固定化酶的收率显著降低。交联时间确定为 10min。

#### 2.1.3 壳聚糖吸附-交联法:

(1)壳聚糖浓度的确定:随着 pH 值的升高,壳聚糖溶液会形成沉淀,根据该原理制取壳聚糖微球。此法是将酸性壳聚糖溶液滴入以水和甲醇为溶剂的 NaOH 溶液中制备壳聚糖微球,甲醇是壳聚糖非溶性溶剂,能促进壳聚糖微球的形成<sup>[11]</sup>。实验中将壳

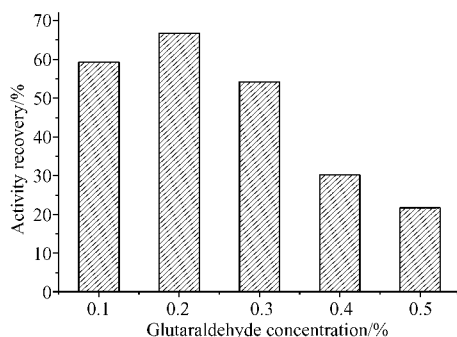


图2 戊二醛浓度对 MnP 固定化的影响

Fig.2 Effect of glutaraldehyde concentration on the MnP immobilization

Immobilization conditions : gelatin/MnP ratio = 1g/1mL , adsorption time = 30min , cross-linking time = 10min .

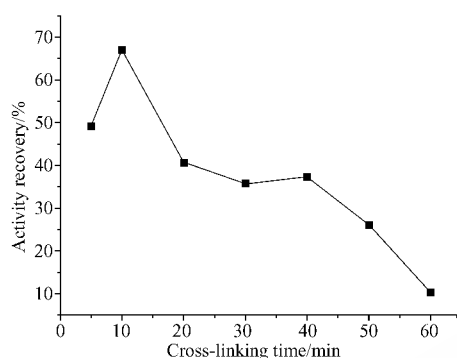


图3 交联时间对 MnP 固定化的影响

Fig.3 Effect of cross-linking time on the MnP immobilization  
Immobilization conditions : gelatin/MnP ratio = 1g/1mL , glutaraldehyde concentration = 0.2% , adsorption time = 30min .

聚糖溶于 1% 的乙酸溶液 , 形成 1% ~ 5% 的不同浓度的壳聚糖溶液。用注射器滴入含有 20% 的 NaOH、30% 的 CH<sub>3</sub>OH 的凝结液中 , 形成小球所制微球 , 滤去凝结液 , 用去离子水反复清洗至中性。当壳聚糖浓度为 1% 时 , 形成的凝胶强度较弱 , 呈扁球状 , 极软易破。随着壳聚糖浓度的增加 , 溶液粘度逐渐增大 , 在相同挤压孔径下 , 挤压越来越难。浓度大于 4% 后 , 浓度过大 , 不仅操作困难 , 滴入凝结液也易拖尾。考虑成球的情况和操作的难易度 , 确定壳聚糖的浓度为 3%。

(2) 戊二醛浓度对 MnP 固定化效果的影响 : 将用 3% 壳聚糖制成的微球与酶液 0.6:1 (g/mL) 吸附 30min , 然后在 0.1% ~ 0.5% 的戊二醛中交联 10min , 测定固定化酶的活力回收率。当吸附了 MnP 的球形壳聚糖加入到戊二醛溶液中时 , 壳聚糖上的自由氨基与戊二醛的一个醛基通过加成消去反应 , 使戊二醛接枝到壳聚糖上 , 经接枝后的壳聚糖上的游离醛基再与 MnP 上的活性基团(如氨基等)发生化学

反应 , 这样 MnP 就被固定到壳聚糖载体上了。整个过程中戊二醛起手臂作用(即戊二醛的一端连接壳聚糖的自由氨基 , 另一端连接酶分子的活性基团)<sup>[12]</sup>。戊二醛不仅是交联剂同时也是变性剂 , 在浓度较大时 , 交联度过大 , 结合位点紧密 , 产生空间结构障碍 , 酶活力损失也较大。可能由于交联的原故 , 所制得的微球的机械强度也有所增强。确定戊二醛的浓度为 0.2% , 活力回收率为 12.4%。

(3) 微球与酶液的质量体积比对 MnP 固定化效果的影响 : 其它条件不变 , 取 7 份壳聚糖微球 , 与酶液分别以 0.6:1、0.8:1、1.0:1、1.2:1、1.4:1、1.6:1 和 1.8:1 的质量体积比 (g/mL) 制备固定化酶 , 并测定其活力回收率。当微球与酶液以 1.4:1 (g/mL) 混合时 , 制备的固定化酶的活力回收率基本上达到最大值 52.8% , 其后随着使用的酶浓度的升高固定化酶活力缓慢下降 , 也就是说一定量载体的结合容量是固定的 , 随给酶量的增加其活性虽也不断增大 , 但当达到饱和载量后 , 过多结合的酶使空间位阻增加、扩散限制增大 , 底物和酶、产物不能充分接触与转移 , 从而影响酶活力 , 同时过多的结合酶也易使酶活性中心改变 , 影响酶活力。

(4) 交联时间对 MnP 固定化效果的影响 : 固定其它条件 , 将交联时间控制为 10 ~ 90min , 并测其相对活力 , 结果如图 4 所示。延长交联时间 , 固定化酶活力升高 , 但到一定时间后 , 载体上结合的酶接近饱和 , 趋于稳定 , 所以选用固定化时间为 70min。

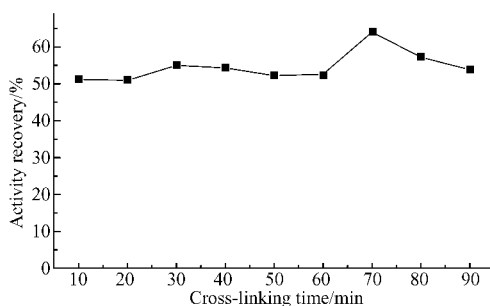


图4 交联时间对 MnP 固定化的影响

Fig.4 Effect of cross-linking time on the MnP immobilization

Immobilization conditions : chitosan/MnP ratio = 1.4g/1mL , glutaraldehyde concentration = 0.2% , adsorption time = 30min .

## 2.2 固定化锰过氧化物酶性质的研究

2.2.1 最适反应 pH 配制 pH 2.2 ~ 8.0 的 McIlvaine 缓冲溶液 , 按 1.3 的步骤测定在各种 pH 下的游离酶与固定化酶的酶活 , 结果如图 5 所示。图中酶活用各种 pH 下的酶活占最适 pH 酶活的比率表示。游离酶作用底物的最适 pH 值为 7.0 , 而 3 种固定化酶

均向酸性方向移动了 2~4 个 pH。

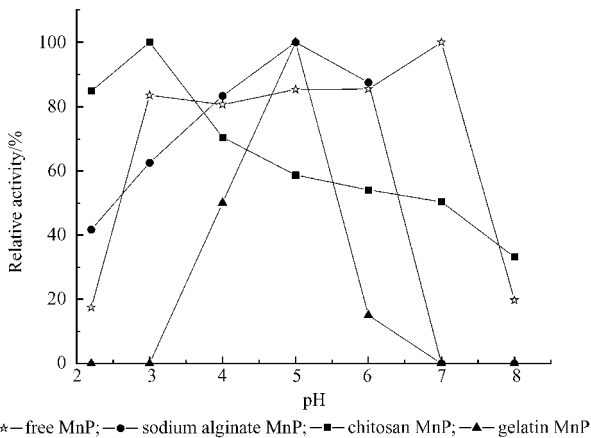


图 5 自由酶和固定化酶的最适反应 pH

Fig.5 The optimum pH of free and immobilized enzyme

**2.2.2 最适反应温度** 在不同温度的水浴中,按 1.3 的步骤测定酶活,结果如图 6 所示。图中酶活用各种温度下的酶活占最适温度酶活的比率表示。游离酶作用底物的最适温度为 35℃,而用明胶制成的固定化酶的最适反应温度为 55℃,另两种载体制成的固定化酶的最适反应温度均达到了 75℃。

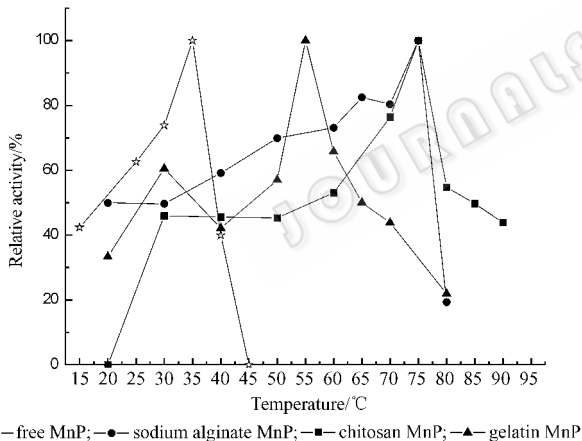


图 6 自由酶和固定化酶的最适反应温度

Fig.6 The optimum temperature of free and immobilized enzyme

**2.2.3 热稳定性** 为比较游离酶和固定化酶的热稳定性,我们将游离酶和固定化酶在各种温度下保温 1h,立刻冰浴冷却后测定酶活力。结果表明,游离酶在 25℃、30℃、35℃未失活,而 40℃时就只剩下一半的活力。用海藻酸钠制成的固定化酶在 30℃、40℃、50℃、60℃均未失活,70℃时保温 0.5h 仍保存一半的活力。用明胶制成的固定化酶在 30℃、40℃、50℃未失活,60℃时保温 0.5h 仍保存一半的活力。用壳聚糖制成的固定化酶直到 80℃保温 1h 仍未失活。说明 3 种固定化酶的耐热性均得到显著提高。

**2.2.4 酸碱稳定性** 为比较游离酶和固定化酶的酸碱稳定性,我们将游离酶和固定化酶在各种 pH 下 25℃保温 1h 后,测定酶活力。游离酶在 pH4~7 未失活,pH 3 还剩下半的活力。用海藻酸钠和明胶制成的固定化酶仅在 pH 4 和 pH 5 保持稳定,pH 6 还剩下半的活力。壳聚糖在 pH 2.2~11.0 中均未失活,显示出极好的酸碱耐受性。

**2.2.5 重复操作性** 固定化酶的重复使用性实验是在 30℃连续测定其活力,每次测定之后将固定化酶用去离子水洗涤几次。实验发现,使用海藻酸钠制成的固定化酶重复使用 6 次,使用明胶制成的固定化酶重复使用 9 次,使用壳聚糖制成的固定化酶重复使用 6 次,酶活损失均小于 5%。可见,本文方法制备的 3 种固定化 MnP 重复使用性好。

### 2.3 偶氮染料脱色实验

静置实验结果如图 7A 所示,图中纵坐标是根据各测定时刻的吸光度与初始吸光度的比值绘制,其中测定时刻的吸光度已经扣除了因载体吸附作用而造成的吸光值的减少。结果表明,用明胶制成的固定化酶的脱色能力与游离酶接近,平行实验(即加入不含酶的同载体)表明明胶载体对刚果红有一定的吸附,对金橙 G 和橙黄 IV 吸附不明显。另外两种载体制成的固定化酶的脱色能力逊于游离酶,而载体对染料的吸附均不明显。可能的原因是用明胶制成的固定化酶,与另外两种固定化酶相比颗粒更为细小,能较好地与反应液进行接触。反应前后 3 种固定化酶的酶活均无损失。

摇床实验结果如图 7B 所示。用海藻酸钠制成的固定化酶,对于染料几乎没有吸附作用,并表现出与游离酶相当的脱色能力;用明胶制成的固定化酶对刚果红的吸附量加大,而对金橙 G 和橙黄 IV 吸附不明显,脱色能力与游离酶相似,而用壳聚糖制成的固定化酶,其载体对于 3 种染料均强烈吸附。用海藻酸钠制成的固定化酶在摇床实验中脱色能力增强的原因,可能是在摇动的情况下固定化酶与反应体系能够更好地接触,从而使反应更充分。重复实验的结果如图 7B,3 种固定化酶的脱色效果均与第一次相似,使用 2 次的固定化酶的酶活均无损失。

## 3 结论

(1) MnP 的 3 种耦合固定化方法的适宜条件分别为:海藻酸钠包埋-交联固定化中,海藻酸钠的浓度为 1%,戊二醛的浓度为 3%,CaCl<sub>2</sub> 的浓度为 0.1mol/L;明胶吸附-交联固定化中,明胶微粒与酶液

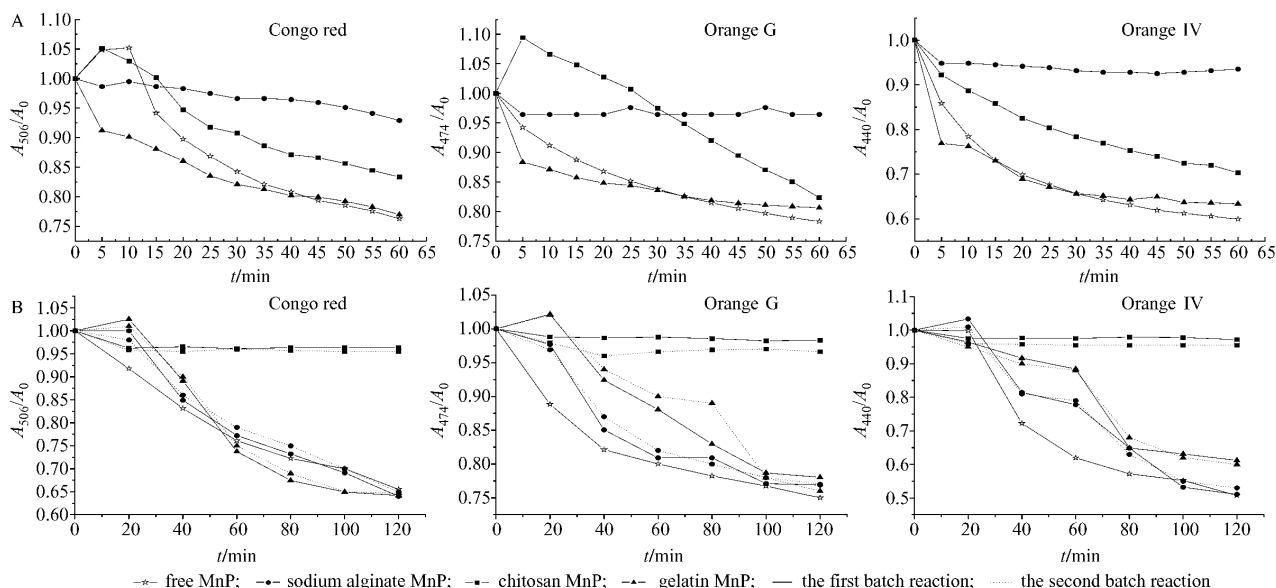


图7 游离酶与固定化酶对偶氮染料的脱色

Fig. 7 Decolorization of azo dyes by free and immobilized enzyme

A: decolorization in static situation; B: decolorization in shaky situation.

的比值为 1 g/mL,戊二醛的浓度为 0.2%,交联时间为 10min;壳聚糖吸附-交联固定化中,使用浓度为 3%的壳聚糖制作微球,戊二醛的浓度为 0.2%,壳聚糖微球与酶液的比值为 1.4g/mL,交联时间为 70min。3 种耦合固定化,活力回收率分别达到了 70%、67%和 64%。

(2) B 种固定化的 MnP 机械性能优越,重复操作性好,而且稳定性大大提高。3 种固定化酶的最适反应 pH 均向酸性方向移动,最适反应温度和耐热性都显著提高。

(3) 明胶吸附-交联制备的固定化酶对 3 种偶氮染料的脱色作用,无论是静置实验还是摇床实验,都达到了与游离酶相同的水平,在重复进行完 2 个批次的摇床脱色实验后,酶活没有损失,具有良好的应用前景。

## REFERENCES (参考文献)

[ 1 ] Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos SN. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol Adv*, 2003, **21**(1-2): 161-187.

[ 2 ] Sasaki T, Kajino T, Li B, et al. New pulp biobleaching system involving manganese peroxidase immobilized in a silica support with controlled pore sizes. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(5): 2208-2212.

[ 3 ] Grabski AC, Coleman PL, Drtina GJ, et al. Immobilization of manganese peroxidase from *Lentinula edodes* on Azlactone-functional polymers and generation of  $Mn^{3+}$  by the enzyme-polymer complex. *Appl Biochem Biotechnol*, 1995, **55**(1): 55-73.

[ 4 ] Crabski AC, Rasmussen JK, Coleman PL, et al. Immobilization of manganese peroxidase from *Lentinula edodes* on alkylaminated Emphaze AB 1 polymer for generation of  $Mn^{3+}$  as an oxidizing agent. *Appl Biochem Biotechnol*, 1996, **60**(1): 1-17.

[ 5 ] Grabski AC, Grimek HJ, Burgess RR. Immobilization of manganese peroxidase from *Lentinula edodes* and its biocatalytic generation of  $Mn^{3+}$ -chelate as a chemical oxidant of chlorophenols. *Biotechnol Bioeng*, 1998, **60**(2): 204-215.

[ 6 ] Peralta-Zamora P, de Moraes SG, Esposito E, et al. Decolorization of pulp mill effluents with immobilized lignin and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Environ Technol*, 1998, **19**(8): 521-528.

[ 7 ] Song SF, Luan YX, Su XR. Studies on manganese peroxidase immobilized in gelatin-containing microemulsion-based gels. *Chem Res Chinese U*, 2005, **21**(4): 423-425.

[ 8 ] Zhang ZH(张志华), Jiang CM(江昌明). Latest researches in co-immobilization technology for enzyme catalysts. *Industrial Catalysis (工业催化)*, 2005, **13**(1): 5-8.

[ 9 ] Field JA, de Jong E, Feijoo CG, et al. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white-rot fungi. *Appl Environ Microbiol*, 1992, **58**(7): 2219-2226.

[ 10 ] Wang YI(王亚林), Yan JR(严建芳), Wu LY(吴灵英), et al. Studies on the immobilization of cells producing cellulases. *Journal of Wuhan Polytechnic University(武汉工业学院学报)*, 1999, **18**(4): 1-3.

[ 11 ] Chang MY, Juang RS. Activities, stabilities and reaction kinetics of three free and chitosan AAAAAA clay composite immobilized enzymes. *Enzyme Microb Technol*, 2005, **36**(1): 75-82.

[ 12 ] Zhang J(张剑), Zhang KC(张开诚), Fang H(方华), et al. Comparative research on the immobilization of saccharifying enzyme by using four kinds of  $\alpha$ -chitosan as carriers. *Liquor-making Science & Technology(酿酒科技)*, 2006, **139**(1): 35-38.