



移动扫码阅读

赵鑫,马桂敏,尹娟,等.电纺漆酶催化降解水中双酚A性能研究[J].能源环境保护,2022,36(6):88-93.
ZHAO Xin, MA Guimin, YIN Juan, et al. Catalytic degradation performance of electrospun laccase for bisphenol A in water[J]. Energy Environmental Protection, 2022, 36(6): 88-93.

电纺漆酶催化降解水中双酚A性能研究

赵鑫^{1,2}, 马桂敏¹, 尹娟¹, 王正川¹, 李赫龙¹, 徐强¹

(1. 深圳市广汇源环境水务有限公司, 广东深圳 518011; 2. 广东省城市水环境与水务信息化工程技术研究中心, 广东深圳 518011)

摘要:以模拟地表水中的双酚A(BPA)为目标污染物,采用聚乳酸-乙醇酸共聚物(PDLGA)作为纺丝材料,利用静电纺丝固定化漆酶制作载漆酶电纺纳米纤维膜,考察了BPA溶液降解效果,分析了温度、pH等影响因素。结果表明:电纺纳米纤维膜固定化漆酶对游离酶的活性保留率为78.5%;固定化漆酶对低浓度BPA(100 $\mu\text{g/L}$)和高浓度BPA(100 mg/L)的2 h降解率分别达到83.5%和31.7%;在温度为5~45 $^{\circ}\text{C}$ 的变化范围内,固定化酶和游离酶对BPA的降解率变化区间分别为31.2%~71.2%和29.8%~89.4%;在pH为1~9的变化范围内,固定化酶和游离酶对BPA的降解率变化区间分别为12.2%~64.7%和0~59.8%。

关键词:双酚A;静电纺丝;固定化漆酶;降解

中图分类号:X703

文献标识码:A

文章编号:1006-8579(2022)06-0088-06

Catalytic degradation performance of electrospun laccase for bisphenol A in water

ZHAO Xin^{1,2}, MA Guimin¹, YIN Juan¹, WANG Zhengchuan¹, LI Helong¹, XU Qiang¹

(1. Shenzhen Guanghuiyuan Environment Water Co., Ltd., Shenzhen 518011, China; 2. Guangdong Province Urban Water Environment and Water Information Engineering Technology Research Center, Shenzhen 518011, China)

Abstract: Taking bisphenol A(BHA) in simulated surface water as the target pollutant, using PDLGA as spinning materials, electrospun laccase-carrying nanofiber membranes were prepared with electrospinning immobilized laccase. The degradation performance of BPA was investigated. The influencing factors such as temperature and pH were analyzed. The results showed that the activity retention rate of laccase immobilized on electrospun nanofiber membrane to free enzyme was 78.5%. The two-hour degradation efficiencies of low concentration(100 $\mu\text{g/L}$) and high concentration(100 mg/L) of BPA by immobilized laccase reached 83.5% and 31.7%, respectively. Within the temperature range of 5 ~ 45 $^{\circ}\text{C}$, the ranges of degradation efficiency of BPA by immobilized enzyme and free enzyme were 31.2%~71.2% and 29.8% ~ 89.4%, respectively. Within the pH range of 1 ~ 9, the ranges of degradation efficiency of BPA by immobilized enzyme and free enzyme were 12.2%~64.7% and 0~59.8%, respectively.

Key Words: Bisphenol A; Electrospinning; Immobilized laccase; Degradation

0 引言

双酚A(Bisphenol A, BPA),即2,2-双(4-羟

基苯基)丙烷,是一种具有内分泌干扰性的类雌性激素,属于难挥发、疏水性有机污染物^[1]。BPA被广泛应用于制造聚碳酸酯、环氧树脂等高分子材

收稿日期:2022-07-07;责任编辑:金丽丽

第一作者简介:赵鑫(1979—),男,山西寿阳人,博士,主要研究方向为流域水环境生态过程模拟及污染防治技术研究。

E-mail: zhaoxin@mail.bnu.edu.cn

料,也可用于生产粘合剂、抗老化剂、粉末涂料等工业制品。由于应用广泛,BPA 可通过多种途径进入水体,污染地表水和地下水。BPA 对脊椎动物具有激动雌激素受体的作用,可诱导脊椎产生前凸反应,引起假早熟^[2];对于两栖类动物,可引发性逆转;对于哺乳动物,则会导致子代变异效应,如子代的畸形、死胎、体重下降、肝多核细胞增加及纤维性骨萎缩等现象。BPA 进入人体内后会干扰体内正常激素的分泌,从而影响生殖功能,导致恶性肿瘤的产生^[3-4]。

漆酶可以用于降解水中 BPA。漆酶(Laccase, EC 1.10.3.2)是含有 4 个铜离子的多酚氧化酶,能催化多种芳香族化合物,如各种酚类染料、氯酚、硫酚、多氯联酚、BPA、芳香胺、杀虫剂等降解,可与之作用的底物相当广泛^[5]。与直接利用微生物的水处理技术相比,酶催化反应本身具有分解效率高、毒性小、操作简便、使用范围宽的优点。然而,由于漆酶本身易溶于水、不可重复使用、容易变性失活、价格偏高,使它在实际中的应用受到了限制,而通过酶的固定化技术,则可以实现酶的重复连续使用。漆酶的固定化是指将水溶性漆酶以物理或化学的方法固定在有机或无机的载体上,形成不溶于水的具有酶活性的酶衍生物,使其仍具有催化活性,并可回收及重复使用的方法与技术^[6-7]。与游离酶相比,固定化漆酶易从反应体系中分离出来,可以重复使用,提高酶的化学稳定性,能够严格控制酶反应过程,同时易从使用环境中分离,提高了酶的使用效率,降低其使用成本^[8]。

本研究采用静电纺丝纤维膜作为漆酶固定化的载体,利用包埋法固定化漆酶。借助静电纺丝包埋漆酶,形成核-壳结构载酶纳米纤维,先在聚合物溶液中加入一定量的表面活性剂,再加入酶溶液混合形成均匀的乳液,然后将乳液引入静电纺丝装置中进行电纺,从而得到载酶纤维膜^[9]。本研究重点考察了载酶纤维膜的催化活性和稳定性,评价了其在降解模拟地表水中 BPA 的过程中的实际应用价值。

1 实验方法

1.1 纺丝液和游离漆酶溶液的制备

称取 1.8 g 聚乳酸-乙醇酸共聚物(PDLGA), 0.2 g 嵌段聚醚 F108 和 20 g 二氯甲烷,经磁力搅拌器震荡 2 h,至充分溶解即制成纺丝液。其中,

加入与聚合物 PDLGA 质量比为 10% 的 F108 作为乳化剂。使用超纯水制备漆酶(真菌漆酶, CAS 80498-15-3, 西宝生物科技, 在 30 ℃、pH 6.5、3 mL 反应体积中,以丁香醛连氮为底物时,1 个单位每分钟将产生的 Δa_{530} 为 0.001) 溶液,将漆酶与超纯水按照一定比例混合,经过震荡使之充分溶解,分别制成 5 mg/L 和 15 mg/L 的漆酶水溶液。漆酶溶液现配现用,以防止酶失活。5 mg/L 漆酶溶液用于做游离漆酶降解实验,15 mg/L 漆酶溶液则用于制备载酶电纺纤维膜。

1.2 漆酶的固定化和电纺纤维膜制备

按照上述步骤制备纺丝液后,在纺丝液中加入 0.5 mL、15 mg/L 的漆酶溶液充分震荡混合形成均匀溶液,即制成载漆酶纺丝液。将 0.5 mL 漆酶溶液替换为 0.5 mL 超纯水按同样方法震荡混合制成空白膜纺丝液。载漆酶纺丝液现配现用。

乳液电纺的步骤如图 1 所示,使用的装置是自制的静电纺丝装置,由直流高压电源、喷丝头和接收装置组成。静电纺丝采用 20 kV 高压电场,纺丝液喷射针尖及收集器之间的距离为 15 cm。使用塑料滴管手动将纺丝液引入纺丝容器中,调节各参数获得稳定连续的喷射,喷射出的纤维用铝箔纸进行收集。在纺织载酶膜时注意避光。待纤维膜厚度达到 0.5~1.0 mm 时,停止纺丝。一般情况下,纺一张足够厚的膜需要 40 min。纺织完成的膜放置在干燥避光处待其晾干。空白膜可储存在 4 ℃ 的条件下以备下次试验使用,载酶膜须现纺现用,防止酶失活。

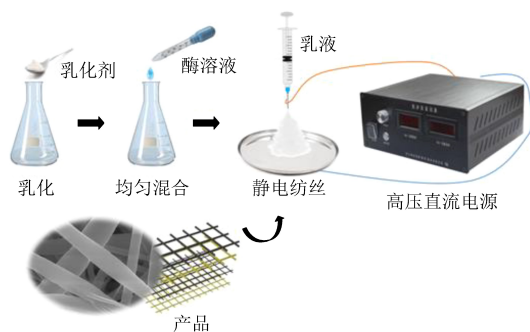


图 1 乳液电纺流程图

Fig.1 Flow chart of emulsion electrospinning

1.3 电纺纤维膜形态结构的表征

固定化漆酶电纺纤维膜的形态特征采用场发射扫描电子显微镜(FESEM S-4800, Hitachi)来观察表征。在静电纺丝过程中,电纺纤维用激光共聚焦扫描显微镜(LCSM LSM510, ZEISS)观察。固定化漆酶电纺纤维膜的比表面积和孔体积的测定

采用是比表面孔分布测定仪 (ASAP2020, Micromeritics)。为了验证漆酶是否已经被包埋入电纺纤维之中,使用配制好的纺丝液加入等量的未作标记的漆酶溶液和用异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的漆酶溶液分别进行静电纺丝,静电纺丝之后均在激光共聚焦扫描显微镜 (LCSM) 下观察其包埋情况^[10]。

1.4 游离漆酶及电纺纤维膜固定化漆酶酶活性的测定

通过紫外可见分光光度计测定漆酶催化氧化 2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS) 过程中的吸光度变化来确定漆酶活性,测量波长为 420 nm^[11]。游离漆酶和电纺纤维膜固定化漆酶的酶活稳定性和持久性通过 30 d 的连续测定得到,在此期间,游离漆酶及固定化漆酶样品均在 4 ℃ 下,储存在 pH 为 3.5 的磷酸盐缓冲溶液中。为了减小实验误差,每次实验之前电纺纤维膜均经磷酸盐缓冲液淋洗 3 次,再与 ABTS 溶液反应。每个反应重复 10 次。

1.5 游离漆酶和固定化漆酶对水中双酚 A 的降解实验

分别量取 0.01、0.05、0.10、0.50、1.00、5.00、10.00 mL 的 1 000 mg/L BPA 标准液于 100 mL 容量瓶中,定容,配制成为 100 μg/L、500 μg/L、1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、50 mg/L、100 mg/L 的 BPA 水溶液。称取一定量漆酶固体与超纯水混合,震荡至完全溶解,形成 5 mg/mL 的漆酶溶液。每个反应瓶中加入 30 mL 不同浓度的 BPA 水溶液和 20 μL、5 mg/L 的漆酶溶液,每个浓度各设置 3 组平行样。将反应器放入恒温振荡箱中进行反应,振荡箱温度设置为 25 ℃,转速设为 160 r/min。取样时间为 5 min、10 min、20 min、30 min、1 h、1.5 h、2 h。从每个反应器中吸取等体积的反应液置于液相色谱进样瓶中,每个样品取完后立即加入 20 μL、0.1 mol/L 的 Na₂S₂O₃ 溶液,以抑制酶活性。

按上述步骤,将游离漆酶降解 BPA 实验中加入的 20 μL、5 mg/L 漆酶溶液替换为 3 片经裁剪称量完毕的载酶膜即为固定化漆酶降解 BPA 实验。

1.6 不同温度下游离酶和固定化漆酶对双酚 A 的降解实验

采用浓度为 5 mg/L 的 BPA 溶液进行实验,首先量取一定量 1 000 mg/L 的 BPA 标准液与超纯水混合,配制 5 mg/L 的 BPA 水溶液。每个反

应器中加入 30 mL 配制完毕的 BPA 水溶液,并加入 20 μL、5 mg/L 的漆酶溶液。将反应器放置于恒温振荡箱中分批次进行反应,箱内温度分别设为 5、15、35、45 ℃,转速均设为 160 r/min,取样时间及样品保存方法同上。进一步地,按上述步骤,将游离漆酶溶液替换为 3 片经裁剪称量完毕的载酶膜即为不同温度下固定化漆酶对 BPA 的降解实验。

1.7 水中双酚 A 的浓度检测

采用高效液相色谱 (HPLC, Waters 1525) 测定 BPA 浓度,检测器为 UV (Dual λ Absorbance Detector, Waters 2487), C18 反向液相色谱柱为,流动相体积比为乙酸水溶液:无水甲醇=2:8,检测波长为 280 nm,流速为 1 mL/min,进样量为 10 μL。

2 结果与讨论

2.1 电纺纤维膜形貌的表征

运用静电纺丝技术能够使水-油型 (W/O 型) 或油-水型 (O/W 型) 乳液形成核-壳结构纤维^[12],作为水相的漆酶可以直接包埋进入电纺纤维的核心,并且核-壳结构纤维能够有效保护包埋入的蛋白质,使其保持结构完整性和生物活性^[13]。

图 2 为放大 100、2 000、10 000、22 000 倍后,在场发射扫描电子显微镜 (SEM) 下电纺纤维的照片。从图中可以看出,电纺纳米纤维膜形态类似无纺布,纤维成无序状态排列。增大放大倍数之后,可以清晰地看到,每一根电纺纳米纤维表面均疏松多孔,孔隙率高,与一般的超细纤维相比,具

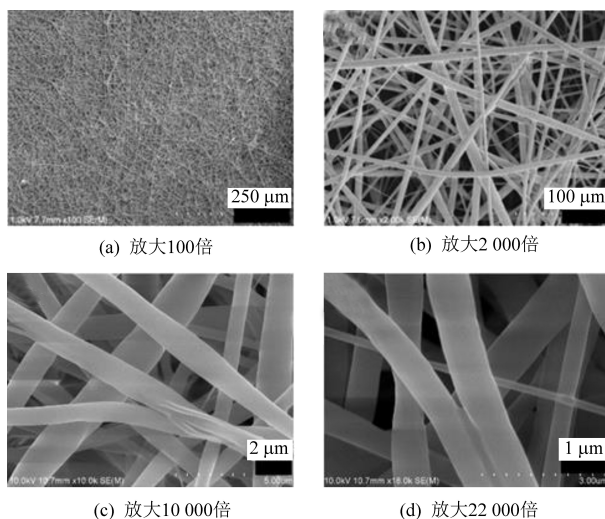


图 2 电纺纤维的 SEM 图

Fig.2 SEM diagrams of electrospun fibers

有更大的比表面积,有利于反应底物的附着和反应的进行。

图 3 为用经 FITC 标记的载酶纺丝液静电纺丝后得到的电纺纳米纤维膜在激光共聚焦扫描显微镜(LCSM)下的照片。图中电纺纤维内部有带红色荧光的部分,即为带 FITC 标记的漆酶。如图 3 可知,漆酶溶液已经成功包埋于电纺纳米纤维之中,形成壳-核结构。

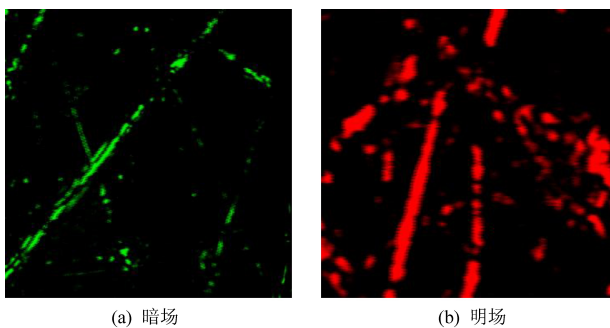
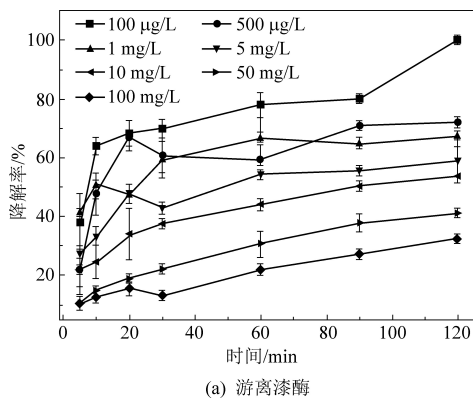


图 3 经 FITC 标记的载酶电纺纳米纤维膜激光共聚焦扫描显微镜照片

Fig.3 Confocal scanning microscopy images of FITC-labeled enzyme-loaded electrospun nanofiber membranes

相比一般方法制备的纤维膜,通过静电纺丝获得的超细纤维膜具有极大的比表面积和多孔结构,有利于提高反应底物对漆酶的结合位点的传输速率,以及其优越的机械性能,使得超细纤维膜易从反应液中恢复,可二次使用。同时,静电纺丝制备纤维膜操作简单,制备成本低,制备的电纺纤维膜持久耐用,易于分离回收。因此,静电乳液电纺纤维



膜可以认为是以包埋法固定化漆酶的理想载体。

2.2 漆酶活性评价

经紫外可见分光光度计测定漆酶催化氧化 ATBS 过程中的吸光度的变化,电纺纳米纤维膜固定化漆酶对游离酶的活性保留率为 78.5%。从这个结果可以看出,电纺纤维具有良好生物相容性的聚合物外壳,既保持了酶的活性,又保护了内部的漆酶分子不受外界环境变化的影响。纤维表面的多孔结构便于反应基团与漆酶分子的结合与分离,增加了漆酶的活性。电纺纳米纤维膜这种特殊的结构提高了纤维内部漆酶活性的稳定性。

以 PDLGA 材料制备电纺纤维膜,且在相同条件下对 100 µg/L 和 500 µg/L 的 BPA 溶液进行反应,考察吸附性。结果表明,PDLGA 制备的电纺纤维膜对水中 BPA 无明显吸附。经 5 h 的反应之后,各组对两种浓度的 BPA 溶液的吸附率均在 20%以内,故本研究不考虑膜本身对 BPA 的吸附,只考察游离酶及固定化酶对 BPA 的降解作用。20 µL、5 mg/L 的漆酶溶液与 30 mL 不同浓度的 BPA 水溶液反应 2 h,降解率随时间变化如图 4 (a) 所示。通过静电纺丝制备电纺纤维膜,并载入漆酶。每一张约 45 cm × 45 cm、厚 0.5 ~ 1.0 mm 的膜载有 0.5 mL、15 mg/L 的漆酶溶液。将膜剪成 1.5 cm × 1.5 cm 小方块之后,每 30 mL BPA 溶液加入 3 片小方块膜反应 2 h,其降解率随时间变化如图 4(b) 所示。

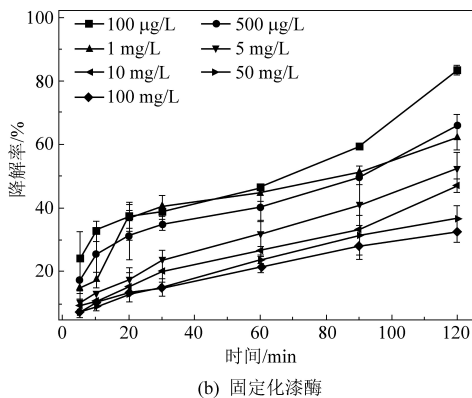


图 4 游离漆酶及固定化漆酶降解水中不同浓度 BPA 的降解效率-时间曲线

Fig.4 Degradation efficiency-time curves for the degradation of different concentrations of BPA in water by free enzyme and immobilized enzyme

此游离酶和载酶膜对 BPA 的降解实验旨在比较游离酶和固定化酶对水中 BPA 降解率的高低及随时间的变化。从图中可以看出,总体上来说,在 2 h 的反应时间内,对各浓度的 BPA 溶液,

游离酶的降解率要高于固定化酶。游离酶对 100 µg/L 的 BPA 溶液在 2 h 内可以全部降解,而固定化酶对其的降解率可达 83.5%。由于固定化的过程中对酶活不可避免地会产生一定的损失,且酶

固定化后,与反应物的接触面积比游离酶小,故固定化酶在相同时间内对 BPA 的降解率低于游离酶。从时间上来看,游离酶及固定化酶对各浓度 BPA 的降解率均随时间递增。相同酶量的游离酶和固定化酶对不同浓度的 BPA 溶液的降解率随 BPA 的浓度增加而降低。对于高浓度(100 mg/L)的 BPA 溶液,游离酶及固定化酶的降解率分别为 32.4% 和 31.7%。

2.3 温度和 pH 对漆酶活性的影响

一般来说,生物酶产品受环境温度和 pH 的影响较大,因此本研究重点考察温度和 pH 对酶活的影响以及酶固定化前后活性和稳定性的变化。本研究比较了 5 个温度梯度下相同酶量对 5 mg/L BPA 溶液的降解作用(如图 5 所示)。从图 5 可以看出,漆酶对高温的耐受性较好,对低温的耐受性

较差。5 ℃ 条件下,2 h 内游离酶对 BPA 的降解率为 29.8%,固定化酶在此温度下的降解率为 31.2%,游离酶降解率不如固定化酶。在 45 ℃ 条件下,游离酶的降解率可达 89.4%,固定化酶为 71.2%,游离酶随温度升高降解率波动比固定化酶剧烈。总体来说,固定化酶对 BPA 的降解率随温度变化在 31.2%~71.2% 范围内波动,而游离酶则在 29.8%~89.4% 范围内波动,故漆酶固定化后受温度影响比游离漆酶要小,即固定化酶对温度变化的耐受能力强于游离酶。

H_3PO_4 和 NaOH 溶液调节 30 mL、5 mg/L BPA 溶液的反应体系溶液 pH 为 1、3、5、7、9 后,加入 20 μL 、5 mg/mL 的游离漆酶溶液或 3 片 1.5 cm×1.5 cm 的载酶膜小方块反应 2 h,BPA 降解率随时间变化如图 6 所示。

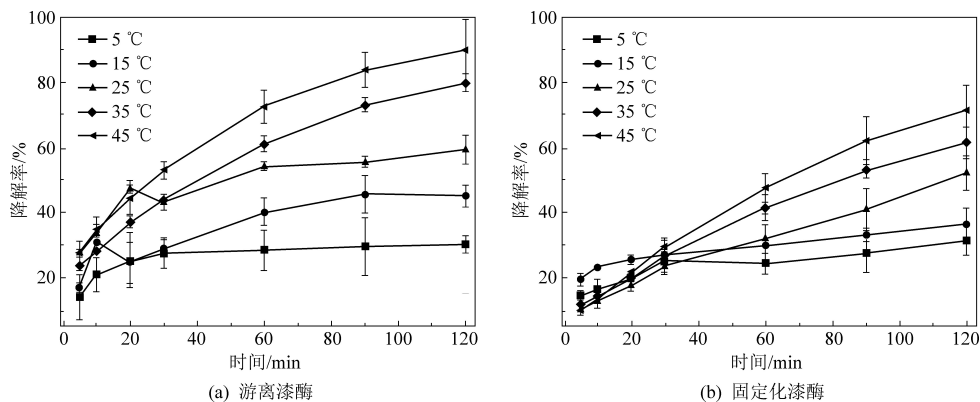


图 5 不同温度下游离漆酶和固定化漆酶对 BPA 降解率随时间变化

Fig.5 The degradation efficiency of BPA over time by free laccase and immobilized laccase at different temperatures

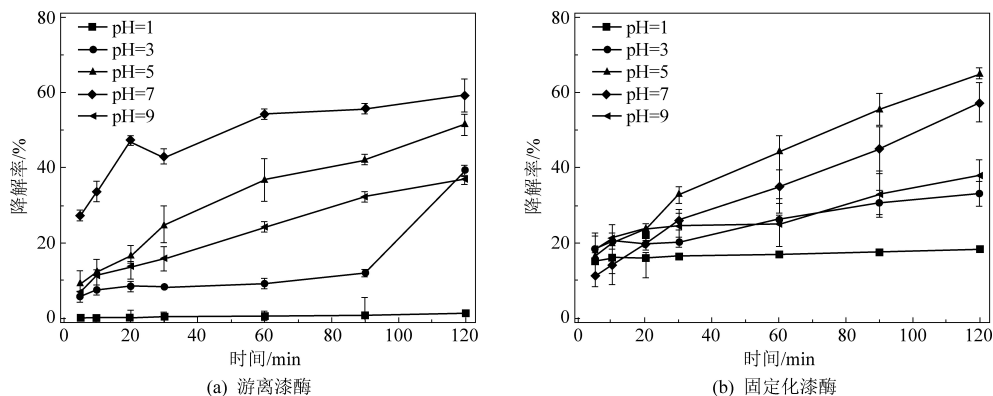


图 6 不同 pH 下游离漆酶和固定化漆酶对 BPA 降解率随时间变化

Fig.6 The degradation efficiency of BPA over time by free laccase and immobilized laccase at different pH values

与温度类似,漆酶的活性受 pH 影响也较大。不同来源的漆酶,最适 pH 也不同。本实验同样对比了 5 个 pH 梯度下游离酶和固定化酶对 5 mg/L BPA 溶液的降解率和随时间变化规律。从图中可以看出,游离酶降解率最高的 pH 为 7,此时对应

的 2 h 降解率为 59.8%,而固定化酶最佳 pH 为 5,此时对应的降解率为 64.7%。此外,固定化酶对 pH 变化的耐受性要远远强于游离酶。当 pH 为 1 时,游离酶的降解率为 0,而固定化酶在 pH=1 时仍有 12.2% 的降解率。在 pH=9 时,游离酶与固

定化酶的降解率均为 37.2%。总体来说,固定化酶对 BPA 的降解率随 pH 变化在 12.2% ~ 64.7% 范围内波动,而游离酶则在 0 ~ 59.8% 范围内波动。总体来说,固定化酶的稳定性优于游离酶,在特定条件下的催化活性也有一定优势。

3 结 论

(1) 漆酶以壳-核结构成功包埋于电纺纳米纤维之中,该固定化漆酶对游离酶的活性保留率为 78.5%。

(2) 2 h 内,固定化酶对 100 $\mu\text{g/L}$ 的 BPA 溶液的降解率为 83.5%,对 100 mg/L 的 BPA 降解率为 31.7%。

(3) 固定化酶对 BPA 的降解率随温度变化在 31.2% ~ 71.2% 范围内波动,游离酶随温度变化在 29.8% ~ 89.4% 范围内波动。

(4) 固定化酶对 BPA 的降解率随 pH 变化在 12.2% ~ 64.7% 范围内波动,游离酶随 pH 变化在 0 ~ 59.8% 范围内波动,故固定化酶的活性稳定性优于游离酶。

参考文献

- [1] Wang Q, Liu C, Zhou D M, et al. Degradation of bisphenol a using peroxymonosulfate activated by single-atomic cobalt catalysts: Different reactive species at acidic and alkaline pH [J]. Chemical Engineering Journal, 2022, 439 (1): 135002.
- [2] Fang R Y, Yang S H, Gu X Z, et al. Early-life exposure to bisphenol A induces dysregulation of lipid homeostasis by the upregulation of SCD1 in male mice [J]. Environmental Pollution, 2022, 304: 119201.
- [3] 罗黄世, 覃国飞, 王献, 等. 固相萃取-高效液相色谱-质谱联用法检测环境水样中五种持久性有机污染物 [J]. 能源环境保护, 2016, 30 (2): 42-45.
LUO Huangshi, QIN Guofei, WANG Xian. Determination of 5 persistent organic pollutants in environmental water samples using solid-phase extraction and high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Energy Environmental Protection, 2016, 30 (2): 42-45.
- [4] Kim K B, Seo K W, Kim Y J, et al. Estrogenic effects of phenolic compounds on glucose-6-phosphate dehydrogenase in

- MCF-7 cells and uterine glutathione peroxidase in rats [J]. Chemosphere, 2003, 50 (9): 1167-1173.
- [5] Thurston C F. The structure and function of fungal laccase [J]. Microbiology, 1994, 140: 19-20.
 - [6] 罗开昆, 彭红, 龚跃法. 漆酶的固定化及其在废水处理中的应用 [J]. 工业水处理, 2005, 25 (5): 14-17.
LUO Kaikun, PENG Hong, GONG Yuefa. Immobilization of laccase and its application to wastewater treatment [J]. Industrial Water Treatment, 2005, 25 (5): 14-17.
 - [7] 李晔. 酶的固定化及其应用 [J]. 分子催化, 2008, 22 (1): 86-96.
LI Ye. Immobilization of enzyme and its application [J]. Journal of Molecular Catalysis (China), 2008, 22 (1): 86-96.
 - [8] 吕健, 陈亚, 吴逾格, 等. 超声辅助氨解预处理对纤维素酶解餐厨垃圾的影响研究 [J]. 能源环境保护, 2010, 24 (4): 13-15.
LV Jian, CHEN Ya, WU Yuge, et al. Effect of ultrasonic assisted ammonolysis pretreatment on cellulase enzymatic hydrolysis of kitchen waste [J]. Energy Environmental Protection, 2010, 24 (4): 13-15.
 - [9] Yunrong Dai, Junfeng Niu, Jia Liu, et al. In situ encapsulation of laccase in microfibers by emulsion electrospinning: Preparation, characterization, and application [J]. Bioresource Technology, 2010, 101: 8942-8947.
 - [10] Yunrong Dai, Lifeng Yin, Junfeng Niu. Laccase-carrying electrospun fibrous membranes for adsorption and degradation of PAHs in shoal soils [J]. Environmental Science & Technology, 2011, 45: 10611-10618.
 - [11] Edoamodu C E, Nwodo U U. Decolourization of synthetic dyes by laccase produced from *Bacillus sp. NU2* [J]. Biotechnology Biotechniques, 2022, 36 (1): 94-105.
 - [12] Kim J I, Kim J Y, Kook S H, et al. A novel electrospinning method for self-assembled tree-like fibrous scaffolds: Micro-environment-associated regulation of MSC behavior and bone regeneration [J]. Journal of Materials Science & Technology, 2022, 115: 52-70.
 - [13] 代云容, 牛军峰, 殷立峰, 等. 静电纺丝纳米纤维膜固定化酶及其应用 [J]. 化学进展, 2010, 22 (9): 1808-1817.
DAI Yunrong, NIU Junfeng, YIN Lifeng, et al. Electrospun nanofiber membranes as supports for enzyme immobilization and its application [J]. Progress in Chemistry, 2010, 22 (9): 1808-1817.