

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2012 年 8 月 23 日 (23.08.2012)



(10) 国际公布号
WO 2012/109818 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 11/02 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2011/073631
- (22) 国际申请日: 2011 年 5 月 4 日 (04.05.2011)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201110038368.3 2011 年 2 月 15 日 (15.02.2011) CN
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 南京大学 (NANJING UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省南京市汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。
- (72) 发明人: 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 潘丙才 (PAN, Bingcai) [CN/CN]; 中国江苏省南京市汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。 张孝林 (ZHANG, Xiaolin) [CN/CN]; 中国江苏省南京市汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。 吕路 (LV, Lu) [CN/CN]; 中国江苏省南京市汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。 何锴 (HE, Kai) [CN/CN]; 中国江苏省南京市汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。 张炜铭 (ZHANG, Weiming) [CN/CN]; 中国江苏省南京市汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。 张全兴 (ZHANG, Quanxing) [CN/CN]; 中国江苏省南京市汉口路 22 号, Jiangsu 210093 (CN)。
- (74) 代理人: 南京知识律师事务所 (ZHISHI LAW FIRM OF INTELLECTUAL PROPERTY); 中国江苏

省南京市新模范马路 5 号南京科技广场 B 座 9 楼, Jiangsu 210009 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

— 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: RESIN-ENZYME COMPLEX CATALYST AND PREPARATION METHOD THEREOF

(54) 发明名称: 一种树脂-酶复合催化剂及其制备方法

(57) Abstract: A resin-enzyme complex catalyst and a preparation method thereof are provided. Said method comprises the steps of: (1) dissolving target enzyme in neutral phosphate buffer solution to obtain solution A with a concentration of 0.2-10 mg/mL; (2) selecting macroporous ion exchange resin as carrier according to isoelectric point of enzyme, (3) mixing solution A and selected resin at room temperature at a ratio of 10-500 mL/g, and (4) taking the resin out, washing with neutral phosphate buffer solution, and drying in the shade. Said method has the advantages of easy operation, easy control, and low loss of enzyme activity. Said resin-enzyme complex catalyst has high stability and good leaching resistance within a wide pH range, and can be used in an aqueous phase.

(57) 摘要:

一种树脂-酶复合催化剂及其制备方法。该方法包括如下步骤: (1)将目标酶溶解于中性的磷酸缓冲液中得到浓度范围为 0.2-10mg/mL 的溶液 A; (2)根据酶分子的等电点,选择大孔型离子交换树脂作为载体; (3)按照 10-500mL/g 的比例将溶液 A 和所选择的树脂在室温下混合, 和 (4) 取出树脂, 用中性磷酸缓冲液冲洗, 再将树脂阴干。所述的方法具有操作简单、易于控制和酶活损失小的优点。所述树脂-酶复合催化剂具有高稳定性和良好的较大 pH 范围内的抗淋溶性, 并且可在水相体系中应用。

WO 2012/109818 A1

说明书

一种树脂-酶复合催化剂及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种复合催化剂及其制备方法，更具体的说是一种树脂-酶复合催化剂及其制备方法。

背景技术

酶是一种高效生物催化剂，具有反应速度快、条件温和、反应彻底、对底物具有专一性等优点。但在常见的溶液反应体系中，酶催化反应存在酶难以回收和反复利用、抗反应条件（温度、pH、盐度等）冲击能力差、易失活、产物难以分离等缺点，这些缺点极大地限制了酶在生物催化领域的直接推广应用。为克服这些缺点，科学家开始将酶进行固载制备载体-酶复合催化剂，至今已有诸多报道。目前常见的酶复合催化剂载体包括介孔硅材料、活性炭、硅藻土、壳聚糖、树脂等。

就固定方法而言，应用最多的是共价交联的方法。此方法通过化学桥联法将酶分子与载体通过交联剂进行共价键联，常用载体包括分子筛、树脂等，制得的复合催化剂一般固载量较大，结构稳定；但固定过程中化学反应往往较为激烈，操作复杂，反应程度难以控制，很多酶在固载过程中会有非常大的活性损失(Lee CH, Lin TS, Mou CY. Mesoporous materials for encapsulating enzymes. *Nano Today*, 2009, 4: 165-179)。另一种常见的物理吸附法固定条件简单，易于操作，常见的载体包括介孔硅材料、活性炭、硅藻土、壳聚糖等，制得的复合催化剂酶活损失较小，但酶分子与载体结合不稳定，在反应溶液中易淋失。Wang YJ 等人以介孔硅材料 BMS 为载体，通过物理吸附法制备的载体-酶复合材料，超过 70%的酶分子会在溶液中再次溶出 (Mesoporous silica spheres as supports for enzyme immobilization and encapsulation. *Chemistry of Materials* 2005, 17: 953-961)。如何开发简单、温和的制备方法实现酶的稳定化固载已成为制备高性能酶复合催化剂时亟需克服的技术瓶颈。

大孔型离子交换树脂具有优良的机械强度、丰富的孔结构、良好的离子交换能力，在水处理、工业催化、环境保护等领域得到了广泛应用，这些结构特性也使其具备了优良的载体材料基本条件。近年来，南京大学潘丙才教授课题组以大孔离子交换树脂作为载体，通过内表面沉积技术将纳米氧化铁、氧化锰颗粒等无

机颗粒固载于树脂孔道内，研制成功系列有机-无机纳米复合吸附剂，成功解决了水体中微量重金属、砷、硒、磷、锑等多种污染物的深度净化难题。其所制备的复合吸附剂由于树脂纳米孔结构特有的网聚限域效应，使其在溶液中具有优良的抗淋失性能（Pan BJ et al. Development of polymer-based nanosized hydrated ferric oxides (HFOs) for enhanced phosphate removal from water effluents. *Water Res.* 2009, 43: 4421- 4429; 专利公开号 CN101804333A; CN101643289）。该课题组也曾将高分子有机物聚乙烯亚胺(PEI)通过简单的浸渍法固定于大孔阳离子交换树脂 D001 上并用于铜离子的深度去除，这一复合吸附材料由于静电作用、范德华力及载体与 PEI 高分子链之间的空间缠绕等因素，同样具有十分优良的抗淋失性能，相关成果已发表于国际学术刊物 *Environ. Sci. Technol.* (2010, 44 (9), 3508) 上。

目前已有将酶固载于树脂上的报道。报道中大多采用的方法有以下几种：先将树脂与酶液混合，反应一段时间后再用戊二醛进行交联（*J. Agric. Food. Chem.* 2010, 58, 488; 材料导报：研究篇. 2009 年 9 月（下）23 卷第 9 期,50）；先将树脂用戊二醛处理，然后再与酶液混合（*食品与发酵工业*，2004 年 30 卷第 2 期，10；）；先对树脂进行修饰，接上一些氯甲基、氨基或羧基等基团，再通过这些基团与酶分子的共价结合使酶固定到树脂上（*J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2003, 78, 891; *Applied Catalysis B: Environmental.* 2003, 42, 131; *Food Chemistry.* 2009, 112, 992）。可以看出，这些方法均有操作复杂、反应剧烈且程度难以控制、酶结构影响大、酶活损失严重等缺点。

除此以外，也有通过简单吸附法将酶固载于树脂的报道，这些方法可归纳如下：采用疏水性的非极性大孔吸附树脂作为载体通过吸附法固定酶，此法无论合成还是应用，均局限于有机溶剂的体系中，对水分含量有严格的要求，限制了其在水相中的应用（*生物工程学报*，2006 年 22 卷 1 期，114；*河南工业大学学报（自然科学版）*，2007 年第 28 卷 3 期，68；*农产品加工·学刊*，2010 年 3 期，23）；在水相中采用大孔吸附树脂为载体，通过吸附法固定酶，主要通过氢键、范德瓦耳力固定酶，此方法树脂极性越强，固定效果越差，难以应用于水相系统，且对酶稳定性提高较小（*化学工程*，2009 年 37 卷 4 期，8）；以树脂二乙胺基乙基羟乙酯（DEAE-E/H）为载体，主要通过氢键作用固定酶，其制备的复合催化

剂对酶稳定性的提高较小,且易受溶液 pH 及离子强度影响而使酶淋失到溶液中,因而同样不适宜在水相系统中应用(化学反应工程与工艺,2005 年 21 卷 1 期,60)。而利用作用较强的静电作用力,通过简单浸渍法将酶固定到强极性的大孔离子交换树脂上从而获得高稳定性、可应用于水相系统、抗淋失性能优异的复合催化剂却尚未见公开报道。

发明内容

1. 发明要解决的技术问题

目前制备载体-酶复合催化剂的主要方法包括共价交联法和物理吸附法。共价交联法制得的复合催化剂结构较为稳定,但方法复杂、酶活损失大;物理吸附法虽然操作简单,但制得的复合催化剂抗淋溶性能差、稳定性不高。本发明的目的是提供一种大孔离子交换树脂-酶复合催化剂及其制备方法,该制备方法简单,制备得到的大孔离子交换树脂-酶复合催化剂固定量大、机械强度好、可应用于水相系统、抗淋失性能优异、稳定性较强。

2. 技术方案

本发明原理:将大孔型离子交换树脂作为酶的载体材料,树脂丰富的孔结构可以方便大分子酶进入其孔道内部,树脂表面的荷电基团可与酶分子之间产生静电作用力,其特有的网状纳米孔结构可以使酶的分子链与其相互缠绕而进行更加稳定的结合,这些因素可能为酶分子的稳定化固载提供重要基础。通过简单的浸渍法将酶分子固载于大孔离子交换树脂载体上,制备成功一种固定量大、机械强度好、可应用于水相系统的、抗淋失性能优异、反应稳定性强的树脂-酶复合催化剂。

本发明的技术方案如下:

一种树脂-酶复合催化剂及其制备方法,其步骤是:

- (1) 将目标酶溶解于 pH 值为中性的磷酸缓冲液中得到溶液 A,其浓度范围为 0.2-10 mg/mL;
- (2) 根据酶分子的等电点,选择合适的大孔型离子交换树脂作为载体;
- (3) 将溶液 A 与树脂载体于室温下混合搅拌,平均每克树脂需要溶液 A 的体积为 10-500 mL;
- (4) 取出离子交换树脂,用 pH 值为中性的磷酸缓冲液冲洗树脂表面,再

将树脂阴干得到树脂-酶复合催化剂。

步骤（1）和步骤（4）中的 pH 值为中性通常是指 pH=7.0。

步骤（1）中特定的酶为分子量大于 10 k 道尔顿，等电点 ≤ 5.5 或 ≥ 8.0 的生物蛋白，如漆酶、胆碱氧化酶、氯过氧化物酶、有机磷水解酶、细胞色素 C 等；

步骤（2）中选择树脂载体的方法为：对等电点 ≤ 5.5 的酶（如漆酶、胆碱氧化酶、氯过氧化物酶、木质素过氧化物酶等），可选择大孔型阴离子交换树脂为载体，优选 D201 树脂、D301 树脂、IRA900 树脂；对等电点 ≥ 8.0 的高分子酶（如有机磷水解酶，细胞色素 C 等），可选择大孔阳离子交换树脂为载体，优选 D001 树脂、D101 树脂、Amberlite 200 树脂、Lewatit Sp-210 树脂。

3.有益效果

本发明提供的大孔离子交换树脂-酶复合催化剂及其制备方法相比于已有的载体-酶复合催化剂及其制备方法，具有一些突出的优势：（1）相比于共价交联法，本发明提供的制备方法操作简单、易于控制、酶活损失小；（2）相比于普通载体如介孔硅材料、活性炭、硅藻土、壳聚糖等通过物理吸附法制备的载体-酶复合催化剂，本发明制备的复合催化剂具有优良的抗淋失性能、较高的操作稳定性；（3）相比于非极性大孔吸附树脂及弱碱性离子交换树脂通过氢键、范德瓦耳力制备的载体-酶复合催化剂，本发明制备的复合催化剂由于利用作用更强的静电作用而具有更高的稳定性，同时具有很好的亲水性可方便地应用于水相系统，并可在较宽的 pH 范围和较高的离子强度下拥有较强的抗淋失性能。

具体实施方式

以下通过具体的实施例进一步说明本发明。

实施例 1

将漆酶（分子量 69kD，等电点 3~4）溶解于 pH=7.0 的磷酸缓冲液中得到漆酶溶液，浓度为 2mg/mL；取 0.20 g 大孔阴离子交换树脂 D201 与 20mL 漆酶溶液混合，在室温下搅拌 48 h；而后取出大孔阴离子交换树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面，再将树脂室温下阴干得到树脂-酶复合催化剂。

通过傅里叶变换红外光谱（FT-IR）扫描，发现该复合催化剂与 D201 相比，在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中室温下震荡 7 天，其最大损失的

酶量为<1-15%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天, 损失的酶量<1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液混合 8 天, 其相对酶活无明显损失(同样条件下游离漆酶活性已损失至初始时的 50%以下); 在 40℃下静置 20 h, 其酶活亦无明显损失(同样条件下游离漆酶已损失约 40%的活性)。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 孔雀石绿染料在 25℃下搅拌(加入 0.08mL 1mM 的小分子介体 1-羟基-苯并-三氮唑), 在 24h 内脱色 40%。同样条件下的 D201 对孔雀石绿染无任何脱色作用。重复使用 25 次, 脱色率没有明显下降。

实施例 2

基本步骤同实施例 1, 具体为: 取 0.20 g 大孔阴离子交换树脂 D301, 与 20mL 含 2mg/mL 漆酶(分子量 69kD, 等电点 3~4)、pH =7.0 的磷酸缓冲液混合, 在室温下搅拌 48 h, 而后取出大孔阴离子交换树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面, 再将树脂室温下阴干得到树脂-酶复合催化剂。

通过傅里叶变换红外光谱(FT-IR)扫描, 发现该复合催化剂与 D301 相比, 在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中室温下震荡 7 天, 其最大损失的酶量为<1-10%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天, 损失的酶量<1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液混合 8 天, 其相对酶活无明显损失(同样条件下游离漆酶活性已损失至初始时的 50%以下); 在 40℃下静置 20 h, 其酶活亦无明显损失(同样条件下游离漆酶已损失约 40%的活性)。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 孔雀石绿染料在 25℃下搅拌(加入 0.08mL 1mM 的小分子介体 1-羟基-苯并-三氮唑), 在 24h 内脱色 60%。同样条件下的 D301 对孔雀石绿染无任何脱色作用。重复使用 25 次, 脱色率没有明显下降。

实施例 3

基本步骤同实施例 1, 具体为: 0.20 g 大孔阴离子交换树脂 Amberlite IRA900, 与 20mL 含 2mg/mL 漆酶(分子量 69kD, 等电点 3~4)、pH =7.0 的磷酸缓冲液混合, 在室温下搅拌 48 h 而后取出大孔阴离子交换树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面, 再将树脂室温下阴干得到树脂-酶复合催化剂。通过

傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 扫描, 发现该复合催化剂与 Amberlite IRA900 相比, 在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中室温下震荡 7 天, 其最大损失的酶量为<1-18%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天, 损失的酶量<1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液混合 8 天, 其相对酶活无明显损失 (同样条件下游离漆酶活性已损失至初始时的 50%以下); 在 40℃下静置 20 h, 其酶活亦无明显损失 (同样条件下游离漆酶已损失约 40%的活性)。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 孔雀石绿染料在 25℃下搅拌 (加入 0.08mL 1mM 的小分子介体 1-羟基-苯并-三氮唑), 在 24h 内脱色 55%。同样条件下的 Amberlite IRA900 对孔雀石绿染无任何脱色作用。重复使用 25 次, 脱色率没有明显下降。

实施例 4

基本步骤同实施例 1, 具体为: 0.20 g 大孔阴离子交换树脂 D201, 与 20mL 含 0.5mg/mL 漆酶 (分子量 69kD, 等电点 3~4)、pH=7.0 的磷酸缓冲液混合, 在室温下搅拌 48 h, 而后取出树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面, 再将树脂室温下阴干即制备得到树脂-酶复合催化剂。通过傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 扫描, 发现该复合催化剂与 D201 相比, 在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中室温下震荡 7 天, 其最大损失的酶量为<1-8%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天, 损失的酶量<1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液混合 8 天, 其相对酶活无明显损失 (同样条件下游离漆酶活性已损失至初始时的 50%以下); 在 40℃下静置 20 h, 其酶活亦无明显损失 (同样条件下游离漆酶已损失约 40%的活性)。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 孔雀石绿染料在 25℃下搅拌 (加入 0.08mL 1mM 的小分子介体 1-羟基-苯并-三氮唑), 在 24h 内脱色 30%。同样条件下的 D201 对孔雀石绿染无任何脱色作用。重复使用 25 次, 脱色率没有明显下降。

实施例 5

基本步骤同实施例 1, 具体为: 0.20 g 大孔阴离子交换树脂 D201, 与 20mL

含 10mg/mL 漆酶（分子量 69kD，等电点 3~4）、pH=7.0 的磷酸缓冲液混合，在室温下搅拌 48 h，而后取出树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面，再将树脂室温下阴干即制备得到树脂-酶复合催化剂。通过傅里叶变换红外光谱（FT-IR）扫描，发现该复合催化剂与 D201 相比，在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中室温下震荡 7 天，其最大损失的酶量为<1-20%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天，损失的酶量<1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液混合 8 天，其相对酶活无明显损失（同样条件下游离漆酶活性已损失至初始时的 50%以下）；在 40℃下静置 20 h，其酶活亦无明显损失（同样条件下游离漆酶已损失约 40%的活性）。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 孔雀石绿染料在 25℃下搅拌（加入 0.08mL 1mM 的小分子介体 1-羟基-苯并-三氮唑），在 24h 内脱色 70%。同样条件下的 D201 对孔雀石绿染无任何脱色作用。重复使用 25 次，脱色率没有明显下降。

实施例 6

基本步骤同实施例 1，具体为：0.20 g 大孔阴离子交换树脂 D201，与 50mL 含 2mg/mL 漆酶（分子量 69kD，等电点 3~4）、pH =7.0 的磷酸缓冲液混合，在室温下搅拌 48 h，而后取出树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面，再将树脂室温下阴干即制备得到树脂-酶复合催化剂。通过傅里叶变换红外光谱（FT-IR）扫描，发现该复合催化剂与 D201 相比，在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中室温下震荡 7 天，其最大损失的酶量为<1-18%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天，损失的酶量<1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液混合 8 天，其相对酶活无明显损失（同样条件下游离漆酶活性已损失至初始时的 50%以下）；在 40℃下静置 20 h，其酶活亦无明显损失（同样条件下游离漆酶已损失约 40%的活性）。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 孔雀石绿染料在 25℃下搅拌（加入 0.08mL 1mM 的小分子介体 1-羟基-苯并-三氮唑），在 24h 内脱色 80%。同样条件下的 D201 对孔雀石绿染无任何脱色作用。重复使用 25 次，脱色率没有明显下

降。

实施例 7

基本步骤同实施例 1，具体为：0.20 g 大孔阴离子交换树脂 D201，与 80mL 含 10mg/mL 漆酶（分子量 69kD，等电点 3~4）、pH=7.0 的磷酸缓冲液混合，在室温下搅拌 48 h，而后取出树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面，再将树脂室温下阴干即制备得到树脂-酶复合催化剂。通过傅里叶变换红外光谱（FT-IR）扫描，发现该复合催化剂与 D201 相比，在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中室温下震荡 7 天，其最大损失的酶量为<1-20%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天，损失的酶量<1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液混合 8 天，其相对酶活无明显损失（同样条件下游离漆酶活性已损失至初始时的 50%以下）；在 40℃下静置 20 h，其酶活亦无明显损失（同样条件下游离漆酶已损失约 40%的活性）。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 孔雀石绿染料在 25℃下搅拌（加入 0.08mL 1mM 的小分子介体 1-羟基-苯并-三氮唑），在 24h 内脱色 80%。同样条件下的 D201 对孔雀石绿染无任何脱色作用。重复使用 25 次，脱色率没有明显下降。

实施例 8

基本步骤同实施例 1，具体为：0.20 g 大孔阴离子交换树脂 D201，与 80mL 含 5mg/mL 漆酶（分子量 69kD，等电点 3~4）、pH =7.0 的磷酸缓冲液混合，在室温下搅拌 48 h，而后取出树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面，再将树脂室温下阴干即制备得到树脂-酶复合催化剂。通过傅里叶变换红外光谱（FT-IR）扫描，发现该复合催化剂与 D201 相比，在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中室温下震荡 7 天，其最大损失的酶量为<1-14%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天，损失的酶量<1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液混合 8 天，其相对酶活无明显损失（同样条件下游离漆酶活性已损失至初始时的 50%以下）；在 40℃下静置 20 h，其酶活亦无明显损失（同样条件下游离漆酶已损失约 40%的活性）。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 孔雀石绿染料在 25℃下搅拌（加入 0.08mL 1mM 的小分子介体 1-羟基-苯并-三氮唑），在 24h 内脱色 60%。同样条件下的 D201 对孔雀石绿染无任何脱色作用。重复使用 25 次，脱色率没有明显下降。

实施例 9

基本步骤同实施例 1，具体为：0.20 g 大孔阴离子交换树脂 D201，与 20mL 含 2mg/mL 木质素过氧化物酶（分子量 40kD，等电点 3.5）、pH =7.0 的磷酸缓冲液混合，在室温下搅拌 48 h，而后取出树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面，再将树脂室温下阴干即制备得到树脂-酶复合催化剂。通过傅里叶变换红外光谱（FT-IR）扫描，发现该复合催化剂与 D201 相比，在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中室温下震荡 7 天，其最大损失的酶量为<1-9%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天，损失的酶量<1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液混合 8 天，其相对酶活无明显损失（同样条件下游离木质素过氧化物酶活性已损失至初始时的 40%以下）；在 40℃下静置 20 h，其酶活亦无明显损失（同样条件下游离木质素过氧化物酶已损失约 30%的活性）。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 2,6-二氯酚在 25℃下搅拌（加入 0.08mL 约 1mM 的过氧化氢），在 5h 内降解>95%。同样条件下的 D201 对 2,6-二氯酚仅去除<5%。重复使用 25 次，降解率没有明显下降。

实施例 10

基本步骤同实施例 1，具体为：0.20 g 大孔阴离子交换树脂 D201，与 50mL 含 2mg/mL 木质素过氧化物酶（分子量 40kD，等电点 3.5）、pH =7.0 的磷酸缓冲液混合，在室温下搅拌 48 h，而后取出树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面，再将树脂室温下阴干即制备得到树脂-酶复合催化剂。通过傅里叶变换红外光谱（FT-IR）扫描，发现该复合催化剂与 D201 相比，在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中室温下震荡 7 天，其最大损失的酶量为<1-13%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天，损失的酶量<1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液混合 8 天，其相对酶活无明显损失（同样条件下游离木质素

过氧化物酶活性已损失至初始时的 40%以下); 在 40℃下静置 20 h, 其酶活亦无明显损失(同样条件下游离木质素过氧化物酶已损失约 30%的活性)。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 2,6-二氯酚在 25℃下搅拌(加入 0.08mL 约 1mM 的过氧化氢), 在 5h 内降解>95%。同样条件下的 D201 对 2,6-二氯酚仅去除<5%。重复使用 25 次, 降解率没有明显下降。

实施例 11

基本步骤同实施例 1, 具体为: 0.20 g 大孔阴离子交换树脂 D201, 与 50mL 含 0.5 mg/mL 木质素过氧化物酶(分子量 40kD, 等电点 3.5)、pH=7.0 的磷酸缓冲液混合, 在室温下搅拌 48 h, 而后取出树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面, 再将树脂室温下阴干即制备得到树脂-酶复合催化剂。通过傅里叶变换红外光谱(FT-IR)扫描, 发现该复合催化剂与 D201 相比, 在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中室温下震荡 7 天, 其最大损失的酶量为<1-7%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天, 损失的酶量<1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液混合 8 天, 其相对酶活无明显损失(同样条件下游离木质素过氧化物酶活性已损失至初始时的 40%以下); 在 40℃下静置 20 h, 其酶活亦无明显损失(同样条件下游离木质素过氧化物酶已损失约 30%的活性)。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 2,6-二氯酚在 25℃下搅拌(加入 0.08mL 约 1mM 的过氧化氢), 在 5h 内降解>95%。同样条件下的 D201 对 2,6-二氯酚仅去除<5%。重复使用 25 次, 降解率没有明显下降。

实施例 12

基本步骤同实施例 1, 具体为: 0.20 g 大孔阳离子交换树脂 D001, 与 20mL 含 2 mg/mL 有机磷水解酶(分子量 39kD, 等电点 8.3)、pH=7.0 的磷酸缓冲液混合, 在室温下搅拌 48 h, 而后取出树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面, 再将树脂室温下阴干即制备得到树脂-酶复合催化剂。通过傅里叶变换红外光谱(FT-IR)扫描, 发现该复合催化剂与 D001 相比, 在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中室温下震荡 7 天, 其最大损失的酶量为<1-5%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天, 损失的酶量<1%。复合材

料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中混合 8 天, 其相对酶活无明显损失 (同样条件下游离有机磷水解酶活性已损失至初始时的 30% 以下); 在 40℃ 下静置 20 h, 其酶活亦无明显损失 (同样条件下有机磷水解酶已损失约 60% 的活性)。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 对甲基对硫磷在 35℃ 下搅拌, 在 2h 内降解 >97%。同样条件下的 D201 对对甲基对硫磷去除率 <1%。重复使用 25 次, 降解率没有明显下降。

实施例 13

基本步骤同实施例 1, 具体为: 0.20 g 大孔阳离子交换树脂 D001, 与 50mL 含 2 mg/mL 有机磷水解酶 (分子量 39kD, 等电点 8.3)、pH =7.0 的磷酸缓冲液混合, 在室温下搅拌 48 h, 而后取出树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面, 再将树脂室温下阴干即制备得到树脂-酶复合催化剂。通过傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 扫描, 发现该复合催化剂与 D001 相比, 在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中室温下震荡 7 天, 其最大损失的酶量为 <1-13%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天, 损失的酶量 <1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中混合 8 天, 其相对酶活无明显损失 (同样条件下游离有机磷水解酶活性已损失至初始时的 30% 以下); 在 40℃ 下静置 20 h, 其酶活亦无明显损失 (同样条件下有机磷水解酶已损失约 60% 的活性)。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 对甲基对硫磷在 35℃ 下搅拌, 在 2h 内降解 >97%。同样条件下的 D201 对对甲基对硫磷去除率 <1%。重复使用 25 次, 降解率没有明显下降。

实施例 14

基本步骤同实施例 1, 具体为: 0.20 g 大孔阳离子交换树脂 D001, 与 50mL 含 0.5 mg/mL 有机磷水解酶 (分子量 39kD, 等电点 8.3)、pH =7.0 的磷酸缓冲液混合, 在室温下搅拌 48 h, 而后取出树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面, 再将树脂室温下阴干即制备得到树脂-酶复合催化剂。通过傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 扫描, 发现该复合催化剂与 D001 相比, 在 1600~1700、1220~

1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中室温下震荡 7 天, 其最大损失的酶量为<1-7%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天, 损失的酶量<1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中混合 8 天, 其相对酶活无明显损失(同样条件下游离有机磷水解酶活性已损失至初始时的 30%以下); 在 40℃下静置 20 h, 其酶活亦无明显损失(同样条件下有机磷水解酶已损失约 60%的活性)。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 对甲基对硫磷在 35℃下搅拌, 在 2h 内降解>97%。同样条件下的 D201 对对甲基对硫磷去除率<1%。重复使用 25 次, 降解率没有明显下降。

实施例 15

基本步骤同实施例 1, 具体为: 0.20 g 大孔阳离子交换树脂 D001, 与 20mL 含 10 mg/mL 有机磷水解酶(分子量 39kD, 等电点 8.3)、pH =7.0 的磷酸缓冲液混合, 在室温下搅拌 48 h, 而后取出树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面, 再将树脂室温下阴干即制备得到树脂-酶复合催化剂。通过傅里叶变换红外光谱(FT-IR)扫描, 发现该复合催化剂与 D001 相比, 在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中室温下震荡 7 天, 其最大损失的酶量为<1-17%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天, 损失的酶量<1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中混合 8 天, 其相对酶活无明显损失(同样条件下游离有机磷水解酶活性已损失至初始时的 30%以下); 在 40℃下静置 20 h, 其酶活亦无明显损失(同样条件下有机磷水解酶已损失约 60%的活性)。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 对甲基对硫磷在 35℃下搅拌, 在 2h 内降解>97%。同样条件下的 D201 对对甲基对硫磷去除率<1%。重复使用 25 次, 降解率没有明显下降。

实施例 16

基本步骤同实施例 1, 具体为: 0.20 g 大孔阳离子交换树脂 D101, 与 20mL 含 2 mg/mL 有机磷水解酶(分子量 39kD, 等电点 8.3)、pH =7.0 的磷酸缓冲液

混合，在室温下搅拌 48 h，而后取出树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面，再将树脂室温下阴干即制备得到树脂-酶复合催化剂。通过傅里叶变换红外光谱（FT-IR）扫描，发现该复合催化剂与 D101 相比，在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中室温下震荡 7 天，其最大损失的酶量为<1-6%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天，损失的酶量<1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中混合 8 天，其相对酶活无明显损失（同样条件下游离有机磷水解酶活性已损失至初始时的 30%以下）；在 40℃下静置 20 h，其酶活亦无明显损失（同样条件下有机磷水解酶已损失约 60%的活性）。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 对甲基对硫磷在 35℃下搅拌，在 2h 内降解>97%。同样条件下的 D101 对对甲基对硫磷去除率<1%。重复使用 25 次，降解率没有明显下降。

实施例 17

基本步骤同实施例 1，具体为：0.20 g 大孔阳离子交换树脂 D101，与 50mL 含 2 mg/mL 有机磷水解酶（分子量 39kD，等电点 8.3）、pH=7.0 的磷酸缓冲液混合，在室温下搅拌 48 h，而后取出树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面，再将树脂室温下阴干即制备得到树脂-酶复合催化剂。通过傅里叶变换红外光谱（FT-IR）扫描，发现该复合催化剂与 D101 相比，在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中室温下震荡 7 天，其最大损失的酶量为<1-9%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天，损失的酶量<1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中混合 8 天，其相对酶活无明显损失（同样条件下游离有机磷水解酶活性已损失至初始时的 30%以下）；在 40℃下静置 20 h，其酶活亦无明显损失（同样条件下有机磷水解酶已损失约 60%的活性）。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 对甲基对硫磷在 35℃下搅拌，在 2h 内降解>97%。同样条件下的 D101 对对甲基对硫磷去除率<1%。重复使用 25 次，降解率没有明显下降。

实施例 18

基本步骤同实施例 1，具体为：0.20 g 大孔阳离子交换树脂 D101，与 20mL 含 10mg/mL 有机磷水解酶（分子量 39kD，等电点 8.3）、pH=7.0 的磷酸缓冲液混合，在室温下搅拌 48 h，而后取出树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面，再将树脂室温下阴干即制备得到树脂-酶复合催化剂。通过傅里叶变换红外光谱（FT-IR）扫描，发现该复合催化剂与 D101 相比，在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中室温下震荡 7 天，其最大损失的酶量为<1-8%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天，损失的酶量<1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中混合 8 天，其相对酶活无明显损失（同样条件下游离有机磷水解酶活性已损失至初始时的 30%以下）；在 40℃下静置 20 h，其酶活亦无明显损失（同样条件下有机磷水解酶已损失约 60%的活性）。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 对甲基对硫磷在 35℃下搅拌，在 2h 内降解>97%。同样条件下的 D101 对对甲基对硫磷去除率<1%。重复使用 25 次，降解率没有明显下降。

实施例 19

基本步骤同实施例 1，具体为：0.20 g 大孔阳离子交换树脂 D101，与 50mL 含 0.5 mg/mL 有机磷水解酶（分子量 39kD，等电点 8.3）、pH=7.0 的磷酸缓冲液混合，在室温下搅拌 48 h，而后取出树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面，再将树脂室温下阴干即制备得到树脂-酶复合催化剂。通过傅里叶变换红外光谱（FT-IR）扫描，发现该复合催化剂与 D101 相比，在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中室温下震荡 7 天，其最大损失的酶量为<1-4%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天，损失的酶量<1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中混合 8 天，其相对酶活无明显损失（同样条件下游离有机磷水解酶活性已损失至初始时的 30%以下）；在 40℃下静置 20 h，其酶活亦无明显损失（同样条件下有机磷水解酶已损失约 60%的活性）。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 对甲基对硫磷在 35℃下搅拌，在 2h 内降解>97%。同样条件下的 D101 对对甲基对硫磷去除率<1%。重复使用 25 次，降解率没有明显下降。

实施例 20

基本步骤同实施例 1，具体为：0.20 g 大孔阳离子交换树脂 Amberlite 200，与 20mL 含 10mg/mL 有机磷水解酶（分子量 39kD，等电点 8.3）、pH=7.0 的磷酸缓冲液混合，在室温下搅拌 48 h，而后取出树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面，再将树脂室温下阴干即制备得到树脂-酶复合催化剂。通过傅里叶变换红外光谱（FT-IR）扫描，发现该复合催化剂与 Amberlite 200 相比，在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中室温下震荡 7 天，其最大损失的酶量为<1-7%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天，损失的酶量<1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中混合 8 天，其相对酶活无明显损失（同样条件下游离有机磷水解酶活性已损失至初始时的 30%以下）；在 40℃下静置 20 h，其酶活亦无明显损失（同样条件下有机磷水解酶已损失约 60%的活性）。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 对甲基对硫磷在 35℃下搅拌，在 2h 内降解>97%。同样条件下的 Amberlite 200 对对甲基对硫磷去除率<1%。重复使用 25 次，降解率没有明显下降。

实施例 21

基本步骤同实施例 1，具体为：0.20 g 大孔阳离子交换树脂 Amberlite 200，与 20mL 含 2mg/mL 有机磷水解酶（分子量 39kD，等电点 8.3）、pH=7.0 的磷酸缓冲液混合，在室温下搅拌 48 h，而后取出树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面，再将树脂室温下阴干即制备得到树脂-酶复合催化剂。通过傅里叶变换红外光谱（FT-IR）扫描，发现该复合催化剂与 Amberlite 200 相比，在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中室温下震荡 7 天，其最大损失的酶量为<1-5%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天，损失的酶量<1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的

Tris-HCl 缓冲溶液中混合 8 天, 其相对酶活无明显损失 (同样条件下游离有机磷水解酶活性已损失至初始时的 30% 以下); 在 40℃ 下静置 20 h, 其酶活亦无明显损失 (同样条件下有机磷水解酶已损失约 60% 的活性)。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 对甲基对硫磷在 35℃ 下搅拌, 在 2h 内降解 >97%。同样条件下的 Amberlite 200 对对甲基对硫磷去除率 <1%。重复使用 25 次, 降解率没有明显下降。

实施例 22

基本步骤同实施例 1, 具体为: 0.20 g 大孔阳离子交换树脂 Amberlite 200, 与 50mL 含 2mg/mL 有机磷水解酶 (分子量 39kD, 等电点 8.3)、pH = 7.0 的磷酸缓冲液混合, 在室温下搅拌 48 h, 而后取出树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面, 再将树脂室温下阴干即制备得到树脂-酶复合催化剂。通过傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 扫描, 发现该复合催化剂与 Amberlite 200 相比, 在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中室温下震荡 7 天, 其最大损失的酶量为 <1-10%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天, 损失的酶量 <1%。复合材料与 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中混合 8 天, 其相对酶活无明显损失 (同样条件下游离有机磷水解酶活性已损失至初始时的 30% 以下); 在 40℃ 下静置 20 h, 其酶活亦无明显损失 (同样条件下有机磷水解酶已损失约 60% 的活性)。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 对甲基对硫磷在 35℃ 下搅拌, 在 2h 内降解 >97%。同样条件下的 Amberlite 200 对对甲基对硫磷去除率 <1%。重复使用 25 次, 降解率没有明显下降。

实施例 23

基本步骤同实施例 1, 具体为: 0.20 g 大孔阳离子交换树脂 Amberlite 200, 与 50mL 含 0.5mg/mL 有机磷水解酶 (分子量 39kD, 等电点 8.3)、pH = 7.0 的磷酸缓冲液混合, 在室温下搅拌 48 h, 而后取出树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面, 再将树脂室温下阴干即制备得到树脂-酶复合催化剂。通过傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 扫描, 发现该复合催化剂与 Amberlite 200 相比, 在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH

3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中室温下震荡 7 天, 其最大损失的酶量为<1-7%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天, 损失的酶量<1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中混合 8 天, 其相对酶活无明显损失(同样条件下游离有机磷水解酶活性已损失至初始时的 30%以下); 在 40℃下静置 20 h, 其酶活亦无明显损失(同样条件下有机磷水解酶已损失约 60%的活性)。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 对甲基对硫磷在 35℃下搅拌, 在 2h 内降解>97%。同样条件下的 Amberlite 200 对对甲基对硫磷去除率<1%。重复使用 25 次, 降解率没有明显下降。

实施例 26

基本步骤同实施例 1, 具体为: 0.20 g 大孔阳离子交换树脂 Lewatit Sp-210, 与 20mL 含 2mg/mL 有机磷水解酶(分子量 39kD, 等电点 8.3)、pH =7.0 的磷酸缓冲液混合, 在室温下搅拌 48 h, 而后取出树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面, 再将树脂室温下阴干即制备得到树脂-酶复合催化剂。通过傅里叶变换红外光谱(FT-IR)扫描, 发现该复合催化剂与 Lewatit Sp-210 相比, 在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中室温下震荡 7 天, 其最大损失的酶量为<1-10%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天, 损失的酶量<1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中混合 8 天, 其相对酶活无明显损失(同样条件下游离有机磷水解酶活性已损失至初始时的 30%以下); 在 40℃下静置 20 h, 其酶活亦无明显损失(同样条件下有机磷水解酶已损失约 60%的活性)。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 对甲基对硫磷在 35℃下搅拌, 在 2h 内降解>97%。同样条件下的 Lewatit Sp-210 对对甲基对硫磷去除率<1%。重复使用 25 次, 降解率没有明显下降。

实施例 27

基本步骤同实施例 1, 具体为: 0.20 g 大孔阳离子交换树脂 Lewatit Sp-210, 与 50mL 含 0.5mg/mL 有机磷水解酶(分子量 39kD, 等电点 8.3)、pH =7.0 的磷酸缓冲液混合, 在室温下搅拌 48 h, 而后取出树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲

洗树脂表面，再将树脂室温下阴干即制备得到树脂-酶复合催化剂。通过傅里叶变换红外光谱(FT-IR)扫描，发现该复合催化剂与 Lewatit Sp-210 相比，在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中室温下震荡 7 天，其最大损失的酶量为<1-8%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天，损失的酶量<1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中混合 8 天，其相对酶活无明显损失（同样条件下游离有机磷水解酶活性已损失至初始时的 30%以下）；在 40℃下静置 20 h，其酶活亦无明显损失（同样条件下有机磷水解酶已损失约 60%的活性）。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 对甲基对硫磷在 35℃下搅拌，在 2h 内降解>97%。同样条件下的 Lewatit Sp-210 对对甲基对硫磷去除率<1%。重复使用 25 次，降解率没有明显下降。

实施例 28

基本步骤同实施例 1，具体为：0.20 g 大孔阳离子交换树脂 Lewatit Sp-210，与 20mL 含 10 mg/mL 有机磷水解酶（分子量 39kD，等电点 8.3）、pH =7.0 的磷酸缓冲液混合，在室温下搅拌 48 h，而后取出树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面，再将树脂室温下阴干即制备得到树脂-酶复合催化剂。通过傅里叶变换红外光谱(FT-IR)扫描，发现该复合催化剂与 Lewatit Sp-210 相比，在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中室温下震荡 7 天，其最大损失的酶量为<1-17%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天，损失的酶量<1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中混合 8 天，其相对酶活无明显损失（同样条件下游离有机磷水解酶活性已损失至初始时的 30%以下）；在 40℃下静置 20 h，其酶活亦无明显损失（同样条件下有机磷水解酶已损失约 60%的活性）。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 对甲基对硫磷在 35℃下搅拌，在 2h 内降解>97%。同样条件下的 Lewatit Sp-210 对对甲基对硫磷去除率<1%。重复使用 25 次，降解率没有明显下降。

实施例 29

基本步骤同实施例 1，具体为：0.20 g 大孔阳离子交换树脂 Lewatit Sp-210，与 20mL 含 5 mg/mL 有机磷水解酶（分子量 39kD，等电点 8.3）、pH=7.0 的磷酸缓冲液混合，在室温下搅拌 48 h，而后取出树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面，再将树脂室温下阴干即制备得到树脂-酶复合催化剂。通过傅里叶变换红外光谱（FT-IR）扫描，发现该复合催化剂与 Lewatit Sp-210 相比，在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中室温下震荡 7 天，其最大损失的酶量为<1-9%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天，损失的酶量<1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液及 pH 7~9 的 Tris-HCl 缓冲溶液中混合 8 天，其相对酶活无明显损失（同样条件下游离有机磷水解酶活性已损失至初始时的 30%以下）；在 40℃下静置 20 h，其酶活亦无明显损失（同样条件下有机磷水解酶已损失约 60%的活性）。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 对甲基对硫磷在 35℃下搅拌，在 2h 内降解>97%。同样条件下的 Lewatit Sp-210 对对甲基对硫磷去除率<1%。重复使用 25 次，降解率没有明显下降。

实施例 30

基本步骤同实施例 1，具体为：0.20 g 大孔阴离子交换树脂 IRA900，与 30mL 含 2mg/mL 漆酶（分子量 69kD，等电点 3~4）、pH =7.0 的磷酸缓冲液混合，在室温下搅拌 48 h，而后取出树脂用 pH=7.0 的磷酸缓冲液冲洗树脂表面，再将树脂室温下阴干即制备得到树脂-酶复合催化剂。通过傅里叶变换红外光谱（FT-IR）扫描，发现该复合催化剂与 IRA900 相比，在 1600~1700、1220~1330、600-700 cm^{-1} 处均多出了酰胺基的特征吸收峰。该材料在 pH 3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中室温下震荡 7 天，其最大损失的酶量为<1-9%。在 1M 的 NaCl 溶液中室温震荡 7 天，损失的酶量<1%。复合材料与 pH3~7 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液混合 8 天，其相对酶活无明显损失（同样条件下游离漆酶活性已损失至初始时的 50%以下）；在 40℃下静置 20 h，其酶活亦无明显损失（同样条件下游离漆酶已损失约 40%的活性）。

取 10 mg 复合催化剂与 10mL 50mg/L 孔雀石绿染料在 25℃下搅拌（加入 0.08mL 1mM 的小分子介体 1-羟基-苯并-三氮唑），在 24h 内脱色 60%。同样条件

下的 IRA900 对孔雀石绿染无任何脱色作用。重复使用 25 次，脱色率没有明显下降。

权 利 要 求 书

1. 一种树脂-酶复合催化剂及其制备方法，其步骤为：
 - (1) 将目标酶溶解于 pH 值为中性的磷酸缓冲液中得到溶液 A，其浓度范围为 0.2-10 mg/mL；
 - (2) 根据酶分子的等电点，选择合适的大孔型离子交换树脂为载体；
 - (3) 将溶液 A 与大孔型离子交换树脂于室温下混合搅拌，平均每克树脂需要溶液 A 的体积为 10-500 mL；
 - (4) 取出大孔型离子交换树脂，用 pH 值为中性的磷酸缓冲液冲洗树脂表面，再将树脂室温下阴干得到树脂-酶复合催化剂。
2. 根据权利要求 1 所述的制备方法，其特征是步骤 (1) 中的酶为分子量大于 10 K 道尔顿、等电点 ≤ 5.5 或 ≥ 8.0 的生物蛋白。
3. 根据权利要求 2 所述的制备方法，其特征是步骤 (2) 中树脂载体的选择依据是：对等电点 ≤ 5.5 的酶，选择大孔型阴离子交换树脂；对等电点 ≥ 8.0 的酶，选择大孔型阳离子交换树脂。
4. 根据权利要求 3 所述的制备方法，其特征是步骤 (2) 中大孔型阴离子交换树脂为 D201 树脂、D301 树脂或 Amberlite IRA900 树脂；大孔型阳离子交换树脂为 D001 树脂、D101 树脂、Amberlite 200 树脂或 Lewatit Sp-210 树脂。
5. 根据权利要求 3 或 4 所述的制备方法，其特征是步骤 (2) 中等电点 ≤ 5.5 的酶为漆酶、胆碱氧化酶、氯过氧化物酶或木质素过氧化物酶；等电点 ≥ 8.0 的酶为有机磷水解酶或细胞色素 C。
6. 权利要求 1 所述制备方法制备得到的大孔离子交换树脂-酶复合催化剂。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/073631

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 11/02 (2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC:C12N 11/-, C12N9/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, CA, enzyme?, resin, ion 2w resin, exchange w resin, immobili+, buffer, catalyst?

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WANG, Yan Hua et al., Immobilization of Candida sp. Lipase on Resin D301, Chinese Journal Of Biotechnology, 25 Dec. 2009, Vol.25, No. 12, pages 2037-2040	1-5
X		6
Y	WANG, Jia Xing, Immobilized Enzymes and Ion-exchange Resin, Technology of Water Treatment, Aug. 1985, Vol. 11, No. 4, pages 2-4	1-5
Y	CN1493696A (UNIVERSITY OF SHANGHAI FOR SCIENCE & TECHNOLOGY)05 May 2004 (05.05.2004) claim 1	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 19 Oct. 2011 (19.10.2011)	Date of mailing of the international search report 17 Nov. 2011 (17.11.2011)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451	Authorized officer YUAN, Haibin Telephone No. (86-10)82245712

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/073631

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN101560511A (JIANGNAN UNIVERSITY)21 Oct.2009(21.10.2009) claim 1	1-5
Y	JP2009125038A(GUNEI KAGAKU KOGYO KK) 11 Jun.2009 (11.06.2009) paragraphs [0006]-[0015]	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2011/073631

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN1493696A	05.05.2004	CN1243824C	01.03.2006
CN101560511A	21.10.2009	CN101560511B	05.01.2011
JP2009125038A	11.06.2009	NONE	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2011/073631

A. 主题的分类

C12N 11/02 (2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC:C12N 11/-, C12N9/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, CA, 酶, 树脂, 离子交换树脂, 固定, 缓冲, 催化剂, enzyme?, resin, ion 2w resin, exchange w resin, immobili+, buffer, catalyst?

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	王燕华等, D301 树脂固定化假丝酵母脂肪酶, 生物工程学报, 25.12 月 2009, 第 25 卷, 第 12 期, 第 2037-2040 页	1-5
X		6
Y	王佳兴, 固定化酶与离子交换树脂, 水处理技术, 8 月 1985, 第 11 卷, 第 4 期, 第 2-4 页	1-5
Y	CN1493696A (上海理工大学)05.5 月 2004 (05.05.2004) 权利要求 1	1-5
Y	CN101560511A (江南大学) 21.10 月 2009 (21.10.2009) 权利要求 1	1-5
Y	JP2009125038A (GUNEI KAGAKU KOGYO KK) 11.6 月 2009 (11.06.2009) 说明书第[0006]-[0015]段	1-5



其余文件在 C 栏的续页中列出。



见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

19.10 月 2011 (19.10.2011)

国际检索报告邮寄日期

17.11 月 2011 (17.11.2011)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

袁海宾

电话号码: (86-10) **82245712**

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2011/073631

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN1493696A	05.05.2004	CN1243824C	01.03.2006
CN101560511A	21.10.2009	CN101560511B	05.01.2011
JP2009125038A	11.06.2009	无	