

辣根过氧化物酶处理酚和氯酚的 催化特性研究*

张 彤 赵庆祥 黄 慧 李 勤 张 奕

(华东理工大学资源与环境工程学院环境工程系, 上海 200237)

摘要 为了研究辣根过氧化物酶处理酚和氯酚的动力学过程, 采用人工配水试验, 测定了 pH 对酶催化反应的影响、 H_2O_2 抑制酶催化反应的动力学参数和不同底物的酶催化反应动力学参数. 结果表明, 在试验的 pH 范围内, pH 为 9 时过氧化物酶对苯酚和对氯苯酚的去除效率最高, 分别达到 99.5% 和 95%. 在较低浓度时污染物去除效率随 H_2O_2 浓度的升高而增加, 较高浓度 H_2O_2 对酶催化反应有一定的抑制效应, 但这种抑制作用对酶促反应的影响不大. 对氯苯酚、苯酚和间氯苯酚的酶催化反应米氏常数 K_m 依次增加, 对酶的亲和性逐渐降低, 间氯苯酚最难去除. 根据酶反应动力学特征判定, 辣根过氧化物酶催化酚形成自由基的氧化反应属于乒乓双双反应机制.

关键词 辣根过氧化物酶, 苯酚, 氯酚, 废水处理, 造纸废水, 酶催化反应, 动力学参数.

Kinetic Study on the Removal of Toxic Phenol and Chlorophenol from Waste Water by Horseradish Peroxidase

Zhang Tong Zhao Qingxiang Huang Hui Li Qing Zhang Yi

(Dept. of Environ. Eng., College of Resources and Environ. Eng., East China Univ. of Sci. and Tech., Shanghai 200237)

Abstract The removal of phenol and chlorophenol from waste water catalyzed by horseradish peroxidase was studied in this paper to understand the kinetic features of this reaction. The effects of pH, H_2O_2 concentration and substrate type on the removal of pollutants were discussed in detail. The results showed that the optimum pH for the removal efficiency of phenol and chlorophenol was 9.0 in the test pH range of 5.0 to 9.0. The results also indicated that there was an optimum H_2O_2 concentration for pollutants removal catalyzed by horseradish peroxidase and H_2O_2 at concentrations higher than the optimum value had inhibition effect on pollutant removal. But the inhibition effect of higher H_2O_2 concentrations was very small and had little influence on the reaction. Several substrates were compared on their affinity with horseradish peroxidase according to the kinetics parameters of reactions. The results showed that phenol and 4-chlorophenol were more easy to be removed than 3-chlorophenol. It was also concluded in this paper that oxidation reaction catalyzed by horseradish peroxidase had the characteristic of Ping-Pang reaction.

Keywords horseradish peroxidase, phenol, chlorophenol, wastewater treatment, pulp-paper wastewater, catalysis reaction, kinetic parameters.

造纸漂白废水中含的有机氯化物种类很多, 虽然浓度较低, 但毒性大、难降解^[1,2]. 现有处理方法(包括生物法和物理化学法)去除有机氯化物的效果不理想^[3,4], 所以一些研究者提出用过氧化物酶和其他酶(包括漆酶、酪氨酸酶和木质素氧化酶等)来处理这类物质. Klibanov

等人最早采用过氧化物酶去除废水中的酚类和芳香胺类化合物, 并将其用于含酚废水的脱

* 国家自然科学基金资助项目(Project of Supported by National Natural Science Foundation of China) 批准号: 29577275

张彤: 男, 30 岁, 理学硕士, 讲师

收稿日期: 1997-06-16

色^[5-7]. 近年来这一新兴酶处理技术受到广泛的关注^[8-12].

本文以苯酚和氯酚为模式化合物, 采用辣根过氧化物酶, 进行配水试验, 研究 pH 对酶催化反应的影响、 H_2O_2 抑制酶催化反应的动力学参数和不同底物的酶催化反应动力学参数, 并对酶催化反应机制进行了初步的探讨.

1 材料和方法

1.1 仪器

pHS-3 型精密数显酸度计, 721 型分光光度计, 独轴旋转式摇瓶机, TG328A 型电光分析天平, 752 紫外光栅分光光度计, 81-2 型恒温磁力搅拌器, PX-250 型生化培养箱.

1.2 试剂

辣根过氧化物酶(EC 1.11.1.7), R. Z=3.0(250u/mg 酶), 上海丽珠东风生物技术有限公司出品. 30% H_2O_2 溶液、苯酚(分析纯)、对氯苯酚(化学纯)、间氯苯酚(分析纯)、磷酸盐缓冲溶液(改变磷酸二氢钠和磷酸氢二钠比例使 pH 在 5 到 9 之间变化)、酚类分析试剂和高分子絮凝剂 H-E.

1.3 酶活性的测定方法^[13]

20 下, 取 2 支试管依次分别加入 0.05ml H_2O_2 , 磷酸盐缓冲液(空白管为 2.9ml, 试验管为 2.8ml), 0.05ml 焦性没食子酸(0.0176mol/L), 最后在样品管中加入 0.10ml 的酶液(8600u/L), 反应总体积为 3.0ml. 用 1cm 光径的比色杯, 采用 721 分光光度计在波长 436nm, 以重蒸水校正 0 点, 每隔 30s 读取各管吸光度(A), 共读 3min, 以 A 对时间作图, 取反应最初线性部分, 计算出每 min A 的增加值为: $\Delta A_{436nm}/min = \Delta A_{样}/min - \Delta A_{空}/min$, 由吸光度的变化速度可以判断酶活性的大小. 速度越快, 酶活性越大.

1.4 酶催化氧化反应实验

取 150ml 的锥形瓶, 加入 20ml 的磷酸盐缓冲液, 控制 pH 值为 7.5(特别标出的除外), 然后依次加入相应量的酚或氯酚溶液, 酶溶液和 H_2O_2 溶液, 反应液总体积为 50ml(不足部分

用去离子水补充). 用恒温培养箱控制温度为 20 ± 1 (特别标出的除外). 从 H_2O_2 加入开始计时, 反应时间除特别说明外, 均为 60min. 需要中止反应时, 加浓 H_2SO_4 快速调节至 $pH < 2$, 使酶变性中止反应, 然后加 NaOH 调回至 7.5, 用带有滤膜(0.45 μ)的 20ml 注射器过滤取样, 分析滤液中苯酚和对氯酚的浓度. 有的试验中, H_2O_2 加入前投加一定量的絮凝剂 H-E, 其余步骤同上.

1.5 分析方法

苯酚的分析采用 4-氨基安替比林比色法^[14]. 对氯酚不采用上述方法进行测定, 它是取代芳香烃, 分子内有共轭双键存在, 在紫外区域具有特征波长的吸收, 2 种氯酚的紫外吸光曲线见图 1. 用液相色谱分析酶反应产物, 确证酶反应过程中不产生干扰测定的物质, 因此用紫外光栅分光光度计在 226nm(对氯苯酚)和 218nm(间氯苯酚)直接测定吸光度, 由标准曲线查得各物质浓度. 在使用的浓度范围内, 酶、 H_2O_2 和絮凝剂对上述 2 种方法不产生干扰.

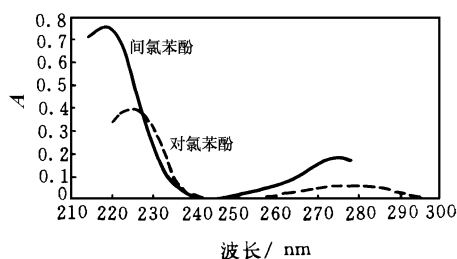


图 1 2 种氯酚的紫外吸收曲线

2 结果与讨论

2.1 pH 值对酶催化效率的影响

从图 2 可见, 随着 pH 值从 5.0 上升到 9.0, 酚和对氯苯酚的去除率都逐渐上升, 分别从 52% 和 57% 提高到 99% 和 93%. 在实验的 pH 范围内, pH 为 9 时去除率最大. 但该酶在一个很宽的 pH 值范围内都保持较高催化效率, 这与文献报道相一致^[5,10]. 对于将辣根过氧化物酶应用于 pH 变化较大的实际废水处理, 这一点具有较重要的意义.

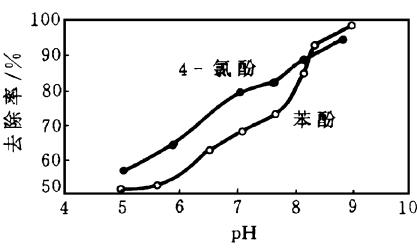


图2 pH对酚类去除率的影响

酚= 96.8mg/L 酶= 2064u/L H_2O_2 = 2.4mmol/L
对氯苯酚= 52.5mg/L 酶= 500u/L H_2O_2 = 1mmol/L

Klibanov 等人报道^[6], 辣根过氧化物酶催化对氯苯酚的最佳 pH 为 5.5, 催化邻氯苯酚和间氯苯酚的最佳 pH 为 7. 本研究以焦性没食子酸为底物测定辣根过氧化物酶活性的最佳 pH 为 7(图 3), 这与图 2 的最佳 pH 为 9 结果不一致. 其原因在于影响酶催化反应最佳 pH 的因素很多, 包括反应底物的化学结构和浓度、酶活性以及反应温度等. 例如 Dec 等人通过试验测定出辣根过氧化物酶催化对氯苯酚、2, 4-二氯酚、2, 4, 5-三氯酚和五氯酚的最佳 pH 分别为 9、7、6.3 和 5.3^[10]. 本试验中还发现, 反应时间对最佳 pH 的确定也有影响, 有待进一步的试验研究.

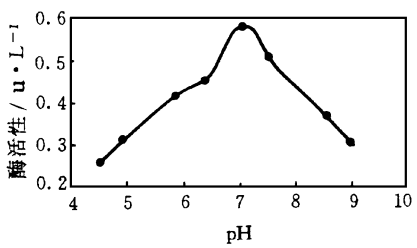


图3 以焦性没食子酸为底物时 pH 对酶活性的影响

2.2 H_2O_2 浓度对酶催化效率的影响

从图 4 可以看出, 在低浓度下, 辣根过氧化物酶催化对氯苯酚的去除效率随 H_2O_2 浓度增加而增加, 在 $0.6\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时已接近 95%, 即将 1mol 的对氯苯酚彻底氧化仅需要大约 2mol 的 H_2O_2 , 这个用量明显低于用铁作催化剂时的用量 (14mol) .

与化学催化不同的是, H_2O_2 浓度超过一定量时, 去除率呈下降趋势, 开始出现底物抑制现

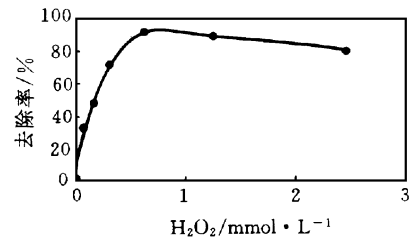
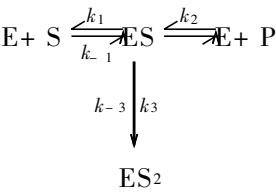


图4 H_2O_2 投加量对酶催化对氯苯酚效率的影响

对氯苯酚= $52.5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 酶= $100\text{u} \cdot \text{L}^{-1}$ $E=5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

象, H_2O_2 投加量存在最佳值. Maloney 在解释辣根过氧化物酶催化酚类的效率随酶浓度降低而下降的原因时曾提出过 2 种假设: ① 当 H_2O_2 /酶比例较高时, H_2O_2 是酶活性的抑制剂, 因此增加酶浓度会减小这个比例, 消除抑制, 提高底物的去除效率; ② H_2O_2 被与酶催化主反应无关的旁路反应所消耗, 该旁路反应与 H_2O_2 亲和性小于酶催化反应与 H_2O_2 的亲合力, 因而提高酶浓度可以通过增加 H_2O_2 与酶的反应而使去除率上升^[8]. 他们的试验未能提供足够的证据证明上述 2 种假设中的任何 1 种. 本试验结果表明, 确实存在 H_2O_2 对苯酚和对氯酚酶催化转化反应的抑制作用(图 5).

高浓度底物可能会与酶结合形成死端复合物, 从而抑制其自身转化为产物, 这就是底物抑制. 过量的底物分子可视为反竞争性抑制剂, 反应示意图如下:



其中, $k_1, k_{-1}, k_2, k_3, k_{-3}$ 分别是相应反应的速率常数.

令 $K_s' = k_{-3}/k_3$, $K_m = (k_2 + k_{-1})/k_1$, 则可得

$$1/V = 1/V_{\max} \cdot (1 + K_m/[S] + [S]/K_s')$$

当 $[S] \ll K_s$ 时, 上述动力学方程可化为米-曼方程式, 采用双倒数作图(图 5)可以求出 K_m 和 $V_{\max}$. 当 $[S] \gg K_m$ 时, 方程可简化为 $1/V = 1/V_{\max} \cdot (1 + [S]/K_s')$, 此时以 $1/V$ 对 $[S]$ 作图

(图略) 即可求得 K_s' 和 $V_{\max}$ 。

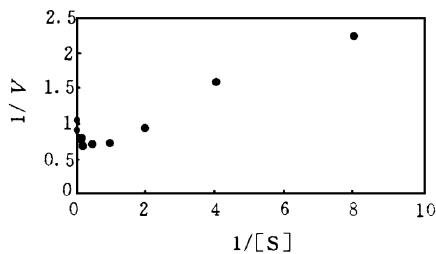


图5 底物抑制作用的双倒数图

$[S] \ll K_s'$ 苯酚= $138.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 酶= $1900 \text{ u} \cdot \text{L}^{-1}$

由表 1 可见, H_2O_2 作为底物时 $K_m = 0.0117 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 说明 H_2O_2 与辣根过氧化物酶的亲和性大, 而与 K_m 比相对较大的 K_s' 值 ($4.24 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 说明死端复合物 ES_2 的平衡浓度低, 即使生成 ES_2 也很容易分解成为 ES , 继续酶催化反应。小的 K_m 和大的 K_s' 说明 H_2O_2 的底物抑制作用很小, 对酶促反应的影响不大。

表 1 H_2O_2 底物抑制动力学参数(条件同图 5)¹⁾

参 数	$K_m/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$K_s'/\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	回归系数 R^2
$1/V-1/[S]$ 图求解	0.0117		0.976
$1/V-[S]$ 图求解		4.24	0.990

1) 表中回归系数是求解图中相应直线段的回归系数

2.3 酶促反应机制

双底物酶促反应中, 酶与底物结合形成三元络合物称为序列机制。若酶与底物不形成三元络合物则其反应为乒乓机制。Alberty 用推导出的双底物反应一般速度方程如下^[15]:

$$V_0 = \frac{V_{\max} [A] [B]}{K_m^B [A] + K_m^A [B] + [A][B] + K_s^A \cdot K_m^B}$$

式中, $V_{\max}$ 为 A、B 都饱和时的最大初速度; K_m^A 为 B 饱和, $V_0 = 1/2V_{\max}$ 时的 A 的浓度; K_m^B 为 A 饱和, $V_0 = 1/2V_{\max}$ 时的 B 的浓度; K_s^A 为酶和底物 A 的复合物 EA 的解离常数。

此类反应在固定一个底物浓度而改变另一底物浓度时服从米氏方程。固定 $[B_0]$ (或 $[A_0]$) 时, 以 $1/V_0-1/[A]$ 作图可得一条直线。在序列机制中, 直线斜率为 $(K_m^A + K_s^A \cdot K_m^B/[B_0]) \cdot (1/V_{\max})$, 截距为 $(1 + K_m^B/[B_0]) \cdot (1/V_{\max})$, 因

此, 固定的底物浓度 $[B_0]$ 取一系列不同的数值时, 作图得到的几条直线的斜率和截距都会发生变化。而在乒乓双双机制中, 由于在初速度范围内释放的产物浓度极低, 逆过程可忽略, 故 $K_s^A = 0$, 因此 $K_s^A \cdot K_m^B = 0$, 固定的底物浓度 $[B_0]$ 取一系列不同的数值时, 作图得到的几条直线的斜率 $(K_m + V_{\max})$ 是一常数。根据在不同固定底物浓度下, 动力学曲线是否平行可以区分出酶促反应是序列机制还是乒乓机制^[15]。

本文中固定 H_2O_2 浓度, 改变苯酚浓度进行酶促反应机制的研究, 实验结果见表 2。由表 2 可见, 固定 H_2O_2 浓度而改变苯酚浓度时, Alberty 一般速度方程相应的双倒数作图为线性, 并且所得到的一系列直线基本平行(斜率= $K_m + V_{\max}$), 符合乒乓反应机制的特征。因此可以初步判定, 酚类在过氧化物酶催化下发生的反应属于“乒乓机制”, 当然, 这还需要用其它方法进一步验证。

表 2 H_2O_2 浓度不同时酶催化苯酚反应的动力学参数
(酶浓度为 $996 \text{ u} \cdot \text{L}^{-1}$, $T = 25 \pm 1^\circ\text{C}$, $t = 10 \text{ min}$)

H_2O_2 / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	$V_{\max}$ / $\text{mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{min})^{-1}$	K_m / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$K_m + V_{\max}$	R^2
0.5	4.86	18.5	3.81	0.996
2	6.86	27.08	4.04	0.994
5	4.91	19.05	3.88	0.996

推测其反应机理如图 6 所示。

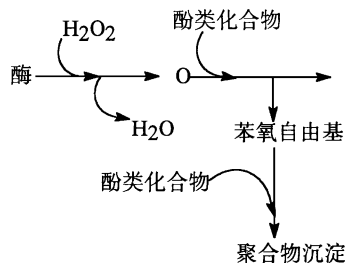


图 6 辣根过氧化物酶催化酚类化合物
氧化耦合反应的机理

2.4 不同底物的酶催化反应动力学特性

氯原子属于吸电子基团, 取代苯酚的氢原子后, 对邻位和对位基团的影响效果一致, 能增加该基团的化学活性, 对间位基团的作用则相

反。 K_m 值是酶反应的特征常数之一,其大小反映出酶与底物的亲和力, K_m 值越小,酶与底物的亲和力越大,反应容易向生成物的方向进行,在底物浓度低时也有相对较高的反应速度. 辣根过氧化物酶对 3 种底物的 K_m 值中(表 3),对氯苯酚的 K_m 值最小,与辣根过氧化物酶的亲和性最大,酶催化反应最容易进行完全. 间氯苯酚的 K_m 值最大,它与底物的结合能力小,不易将酶促反应进行完全.

表 3 不同底物的酶促反应动力学参数^①

底 物	苯 酚	对氯苯酚	间氯苯酚
$V_{max}/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	6.86	4.10	2.26
$K_m/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	27.8	17.8	30.9
$V_{max}/K_m/\text{min}$	0.247	0.230	0.073
R^2	0.994	0.985	0.990

① $T = 25 \pm 1$, H_2O_2 浓度为 $2\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 7.5$, $t = 10\text{min}$

K_m 仅能表示底物与酶亲和性,判断污染物是否是酶催化反应的最适底物和在处理过程中是否容易去除,需要采用 V_{max}/K_m 比值,根据表 3 中的 V_{max}/K_m ,可知辣根过氧化物酶催化反应的最适底物是苯酚和对氯苯酚,而间氯苯酚在 3 者中较难去除. Klibanov 和 Dec 等人的研究结果也说明,对氯苯酚在一氯酚中最容易被酶催化去除,间氯苯酚最难去除^[6,10].

3 结 论

(1) 辣根过氧化物酶在较大的 pH 范围内都能保持较高的活性. 在实验的 pH 范围内 (5.0—9.0), 酚和氯酚的去除率随 pH 值升高而增加, $\text{pH} = 9$ 时最大.

(2) H_2O_2 浓度存在一个最佳值,超过该值后, H_2O_2 表现出一定的底物抑制效应. 小的 K_m 和大的 V_{max} 说明 H_2O_2 的抑制作用很小,对酶促反应的影响不大.

(3) 辣根过氧化物酶催化酚类化合物氧化的反应属于双底物乒乓双双机制.

(4) 氯原子在对位的取代,有利于辣根过氧化物酶催化的酚类氧化反应进行彻底,而间位取代后酚类化合物的酶催化反应活性降低.

参 考 文 献

1 Paasivirta J. Lignin and organic chlorine compounds in lake water and role of the chlorbleaching effluents. *Chemosphere*, 1988. **17**(1): 147—158

2 Garden S. Baseline levels of absorbable organic halogen in treated wastewaters from bleached kraft pulp mills in Ontario. *Chemosphere*, 1990. **20**(10—12): 1695—1700

3 Gokcay CF. Treatment of effluents from hemp-based pulp and paper industry. *Wat. Sci. Technol.*, 1994, **29**(9): 165—168

4 Jokela JK. Effect of biological treatment on halogenated organics in bleached kraft pulp mill effluents studied by molecular weight distribution analysis. *Environ. Sci. & Technol.*, 1993, **27**(3): 547—557

5 Klibanov AM. Peroxidase catalyzed removal of phenol from coal conversion wastewater. *Science*, 1983, **221**: 259—261

6 Klibanov AM. Enzymatic removal of toxic phenols and anilines form wastewaters. *Journal of Applied Biochemistry*, 1980, **2**: 414—421

7 Klibanov AM. Horseradish peroxidase for the removal of carcinogenic aromatic amines from water. *Enzyme Microb. Technol.*, 1981, **3**: 119—122

8 Maloney SW. Transformation of trace organic compounds in drinking water by enzymatic oxidative coupling. *Environ. Sci. Technol.*, 1986, **20**: 249—253

9 Davis S. Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases. *Applied and Microbiology Biotechnology*, 1990, **32**: 721—726

10 Dec J. and Bollay JM. Detoxification of substituted phenols by oxidoreductive enzymes through polymerization reactions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1990, **19**: 543—550

11 Zhang Tong, Zhao qingxiang, Huang hui, Li qin and Zhang yi. Removal of toxic phenol and chlorophenol from waste water by horseridish peroxidase. *Chemosphere*, 1997, **34**(4): 893—903

12 Nakamoto S. Phenol removal from aqueous solutions by peroxidase-catalyzed reaction using additives. *Wat. Sci. Technol.*, 1992. **20**(1): 49—54

13 蔡传葵. 工具酶的活力测定. 上海: 上海科技出版社, 1982: 38—40

14 APHA-AWWA-WPCP. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 16th edition. American Public Health Association. Washington, D. C., U. S. A. 1985

15 袁勤生, 赵健, 王维育. 应用酶学. 上海: 华东理工大学出版社, 1995: 81—118