

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第33卷 第8期

Vol.33 No.8

2012

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

南海北部大气气相多溴联苯醚的含量及来源 李琦路,李军,刘向,徐维海,张干 (2533)

河北张家口市大气污染观测研究 邵平,王莉莉,安俊琳,周彦丽,王跃思 (2538)

大气中丙烷光氧化臭氧生成活性的烟雾箱模拟 黄丽华,莫创荣,徐永福,贾龙 (2551)

膜生物反应器处理甲苯性能及机制 叶杞宏,魏在山,肖盼,李华琴,张再利,樊青娟 (2558)

厨余垃圾堆肥过程中恶臭物质分析 张红玉,邹克华,杨金兵,李国学,杨青原,张锋 (2563)

北京城市生态系统地表水硝酸盐污染空间变化及其来源研究 徐志伟,张心昱,任玉芬,孙晓敏,王效科,王升忠 (2569)

枯、平、丰水期长江3条支流表层水中多氯联苯的分布特征及风险评价 李昆,赵高峰,周怀东,曾敏,廖柏寒,吴正勇,张盼伟,柳敏 (2574)

三峡库区丰水期表层水中酚类的分布特征及潜在风险 吴正勇,赵高峰,周怀东,李科林,李昆,张盼伟 (2580)

东湖表层水体中全氟辛酸和全氟辛磺酸空间分布特征 陈静,王琳玲,朱湖地,王贝贝,刘黄诚,曹梦华,苗竹,胡丽,陆晓华,刘光虹 (2586)

三峡库区大宁河与磨刀溪重金属污染特征 安立会,张艳强,郑丙辉,刘玥,宋双双,李子成,陈浩,赵兴茹,林进 (2592)

长江水系表层沉积物重金属污染特征及生态风险性评价 王岚,王亚平,许春雪,安子怡 (2599)

江苏如东滩涂贝类养殖区表层沉积物中重金属来源分析及其潜在生物毒性 李磊,王云龙,蒋玫,袁骥,沈新强 (2607)

扰动强度对太湖沉积物中磷释放及其形态转化的影响 李大鹏,黄勇 (2614)

干流倒灌异重流对香溪河库湾营养盐的补给作用 张宇,刘德富,纪道斌,杨正健,陈媛媛 (2621)

常年淹水和干旱对三峡库区消落带菖蒲生长恢复的影响 李强,高祥,丁武泉,朱启红,欧媛,刘瑜 (2628)

温州城市降雨径流磷的负荷及其初始冲刷效应 周栋,陈振楼,毕春娟 (2634)

沂蒙山区典型小流域降雨径流的磷素输出特征 于兴修,李振炜,刘前进,井光花 (2644)

城郊农业区小流域土地利用结构对氮素输出的影响 杨峰,王鹏举,杨珊珊,吴金水,胡荣桂 (2652)

基于 AnnAGNPS 模型四岭水库小流域氮磷流失特征的模拟研究 边金云,王飞儿,杨佳,俞洁,楼莉萍,俞丹萍 (2659)

基于 GIS 和 L-THIA 模型的深圳市观澜河流域非点源污染负荷变化分析 白凤姣,李天宏 (2667)

黄土丘陵区坡面水蚀对降雨和下垫面微观格局的响应 卫伟,贾福岩,陈利顶,吴东平,陈瑾 (2674)

强化混凝对腐殖酸和富里酸去除对比研究 周玲玲,张永吉,叶河秀,张一清 (2680)

九龙江下游水源水中新发病原微生物和抗生素抗性基因的定量 PCR 检测 王青,林惠荣,张舒婷,于鑫 (2685)

布吉河丰水期总细菌和氨氧化细菌的定性和定量研究 孙海美,白姣姣,孙卫玲,邵军 (2691)

曝气生物滤池工艺脱氮性能及反硝化细菌群落结构特征研究 彭晓兰,刘聪,陈吕军 (2701)

城市污水处理厂氧化沟工艺微生物种群分析 郭云,杨殿海,卢文健 (2709)

IC 反应器处理啤酒废水的效能及其微生物群落动态分析 朱文秀,黄振兴,任洪艳,阮文权 (2715)

原子力显微镜液池成像技术应用于微絮凝过滤工艺过程中的实验条件优化 郑蓓,葛小鹏,于志勇,原盛广,张文婧,孙景芳 (2723)

UV/H₂O₂ 法对印染废水生化出水中不同种类有机物的去除效果 李新,刘勇弟,孙贤波,徐宏勇,钱飞跃,李欣珏,李暮 (2728)

蛋白核小球藻 *Chlorella pyrenoidosa*-15 的异养培养条件优化及污水养殖 王秀锦,李兆胜,邢冠岚,李卓凝,袁红莉,杨金水 (2735)

“Fe⁰/优势脱氯菌”体系降解 2,4,6-TCP 特性及机制研究 戴友芝,郭丽丽,史雷,刘智勇,高宝钗 (2741)

树脂 D201 上粗漆酶的固定化及对孔雀石绿的脱色 戚绪亮,刘翔,刘波,王林,王小春,方超 (2747)

TiO₂/PS/Fe₃O₄ 光催化剂的低温制备及其光催化和磁回收性能 王雪姣,任学昌,念娟妮,肖举强,王刚,常青 (2752)

微波加热下苯的催化氧化性能研究 张钰彩,卜龙利,王晓晖,刘海楠,张浩 (2759)

纳米磁粉协同解偶联剂作用下活性污泥性能的研究 高丽英,汤兵,梁玲燕,黄绍松,付丰连,罗建中 (2766)

好氧颗粒污泥沉降选择实验研究与定量描述 苏德足,邓绣坤,郑丽,王畅,金旺红,沈俊 (2773)

超声波促进好氧/缺氧污泥消化过程中水解酶活性变化研究 叶运弟,孙水裕,郑莉,刘宝建,许燕滨,占星星,刘敬勇 (2780)

微生物营养剂浓度对生物沥浸法促进城市污泥脱水性能的影响 宋永伟,刘奋武,周立祥 (2786)

实验室条件下蓝藻结皮对低温光照胁迫的响应与微结构变化 饶本强,李华,熊瑛,兰书斌,李敦海,刘永定 (2793)

西南地区紫色水稻土活性碳库的季节动态 吴艳,江长胜,郝庆菊 (2804)

典型设施菜地土壤抗生素污染特征与积累规律研究 尹春艳,骆永明,滕应,章海波,陈永山,赵永刚 (2810)

土壤铜硒复合污染中金属形态转化及其对生物有效性的影响 胡斌,梁东丽,赵文龙,缪树寅 (2817)

土壤微生物群落对多环芳烃污染土壤生物修复过程的响应 张晶,林先贵,刘魏魏,尹睿 (2825)

可可毛色二孢菌对焦化厂土壤多环芳烃污染修复 张志远,王翠苹,刘海滨,孙红文 (2832)

广西茶山梯矿尾砂中微量元素的淋滤实验研究 蔡永兵,李玲,魏晓飞,张国平,李海霞,付志平 (2840)

北京市近郊区土壤砷累积特征 戚浩,王美娥,汪自强,欧阳志云 (2849)

抗氧化酶基因作为多环麝香污染分子标志物研究 陈春,周启星,刘潇威 (2855)

臭氧污染对不同品种小麦干物质与生物量碳积累与分配的影响 寇太记,于伟伟,朱建国,朱新开 (2862)

尿素分解共沉淀法中反应时间对 ZnAl 类水滑石结构和磷吸附性能的影响 陆英,程翔,邢波,孙中恩,孙德智 (2868)

铅和铜离子在纳米羟基磷灰石上的竞争吸附动力学研究 胡田田,仓龙,王玉军,司友斌,周东美 (2875)

pH 和 Ni²⁺ 对人工纳米氧化硅吸附菲的影响 罗沛,孙红文,张鹏 (2882)

铀在凹凸棒石上的吸附特性与机制研究 刘娟,陈迪云,张静,宋刚,罗定贵 (2889)

环丙沙星在潮土中的吸附特性 崔皓,王淑平 (2895)

中高温区水合肼 SNCR 脱硝反应机制和特性研究 洪塗,陈德珍,王渡,黄慷 (2901)

H₂S 选择性催化氧化工艺及催化剂研究现状 郝郑平,姜广玉,张鑫,曲思秋 (2909)

《环境科学》征稿简则 (2550) 《环境科学》征订启事 (2568) 信息 (2684,2714,2848,2916)

树脂 D201 上粗漆酶的固定化及对孔雀石绿的脱色

戚绪亮^{1,2}, 刘翔^{2*}, 刘波¹, 王林², 王小春², 方超²

(1. 南京大学环境学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京 210093; 2. 江苏必格新能源有限公司, 南京 210093)

摘要: 云芝粗漆酶以 3 种方法, 即静电吸附法 (D201-Lac-I)、先吸附后交联法 (D201-Lac-II)、戊二醛处理树脂后吸附法 (D201-Lac-III) 固定到大孔阴离子交换树脂 D201 上. 与静电吸附法相比, D201-Lac-II 的漆酶固载量大幅提升至 4.65 倍, 漆酶比活力却严重受损, 只有前者的 4.8%; D201-Lac-III 的漆酶固载量略有下降, 为静电吸附法的 0.51 倍, 漆酶比活力却显著提高至静电吸附法的 2.99 倍. 利用电子透射电镜 (TEM) 可明显观察到 D201-Lac-III 漆酶分子聚合体的阴影. 用 D201-Lac-III 对孔雀石绿进行了连续多批次脱色试验, 在长达 210 h 的连续操作中, 其脱色效率未观察到有下降趋势, 一直稳定在 40%~55% 之间, D201-Lac-III 的酶活亦未观察到下降, 同等条件下游离的漆酶活力已损失至 20% 以下, 证明 D201-Lac-III 具有显著提升的稳定性和优良的重复利用性. 考虑到粗漆酶廉价易得, D201-Lac-III 在水处理应用中可能大有前景.

关键词: 粗漆酶; 阴离子树脂; 固定化; 稳定性; 脱色

中图分类号: X52 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2012)08-2747-05

Immobilization of Crude Laccase onto Anion Exchange Resin and Its Application in Decoloration of Malachite Green

QI Xu-liang^{1,2}, LIU Xiang², LIU Bo¹, WANG Lin², WANG Xiao-chun², FANG Chao²

(1. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2. Jiangsu BG New Energy Co. Ltd., Nanjing 210093, China)

Abstract: Crude laccase from *Trametes versicolor* was immobilized onto anion exchange resin D201 by three methods, i. e., direct electrostatic adsorption (D201-Lac-I), crosslinking after electrostatic adsorption (D201-Lac-II) and electrostatic adsorption after treating D201 with glutaraldehyde (D201-Lac-III). Compared to direct electrostatic adsorption, the immobilized laccase amount of D201-Lac-II increased by 4.65 times but the laccase activity was decreased to 4.8%, while the laccase activity on D201-Lac-III increased by 2.99 times, with the immobilization amount decreased to 51%. Shadows of laccase aggregation on D201-Lac-III were found by transmission electron microscopy (TEM). Continuous batch decoloration of malachite green demonstrated that the decoloration efficiency of D201-Lac-III remained in the range of 40% to 55% for more than 210 hours, in addition, the enzyme activity on D201-Lac-III maintained unchanged while the activity of free laccase declined to less than 20% under the same condition. All of the results above indicated that D201-Lac-III had a significantly enhanced stability and good reusability. Considering the low price and simple production procedure of crude laccase, D201-Lac-III could be promising for water treatment purpose.

Key words: crude laccase; anion exchange resin; immobilization; stability; dye decoloration

漆酶 (Laccase, ρ -diphenoloxidase, EC 1.10.3.2) 是一类含铜原子的多酚氧化酶, 在真菌及植物体内有大量分布. 来源于真菌的漆酶可以有效地降解多种酚类化合物^[1~3]. 只要加入合适的介体, 比如 2,2'-连氮-双(3-乙基并噻-6-磺酸, ABTS)、1-羟基苯并 3 氮唑 (Hobt) 等, 漆酶降解的底物范围会进一步扩大^[4,5]. 值得注意的是, 真菌漆酶在染料废水的脱色方面经常会有很出色的表现^[6~11]. 因为漆酶催化降解的产物为 CO₂ 和水, 因此使用漆酶对难降解染料废水进行处理是一种很有吸引力的绿色脱色工艺.

然而, 目前漆酶在工业上的应用依然受到很大的限制, 这主要是因为漆酶对环境因子 (如温度、pH 等) 变化极其敏感, 很容易失活甚至变性. 另外,

漆酶本身是水溶性的, 很难回收及再次利用. 针对这些问题, 将漆酶固定到多孔载体内部是行之有效的解决方法^[12,13]. 为了使漆酶顺利固定并保证最终获得的复合催化剂具有较高的酶活力, 目前将漆酶固定到载体上的研究几乎无一例外地使用商业化的纯酶或经过复杂纯化过程制得的酶^[5,14~18], 这无疑大大增大了漆酶的成本.

大孔树脂是一类化学性质稳定、机械强度高、比表面积大且孔结构丰富的聚合物, 是酶固定的优良载体^[19,20]. 本研究尝试使用大孔阴离子树脂

收稿日期: 2011-10-29; 修订日期: 2011-12-06

作者简介: 戚绪亮 (1986~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为树脂及膜的应用, E-mail: mg0925081@126.com

* 通讯联系人, E-mail: ndliuxiang@163.com

D201 直接对漆酶发酵液进行固定. D201 是一种以聚苯乙烯为骨架,季铵基为功能基的树脂.之所以选用 D201,是因为真菌漆酶等电点较低,在接近中性的环境中带有大量的负电荷, D201 对其具有较高选择性,因此有可能不需要对其进行任何纯化即可获得较好的固定效果.同时, D201 较大的孔径也方便漆酶分子的进入.除此之外, D201 在工业上已经获得广泛的应用,因此选用 D201 作为载体具有很强的现实意义.

在制备方法上,本研究分析了静电吸附、先吸附后交联以及戊二醛处理载体后吸附这 3 种固定方法对粗漆酶的固定效果.静电吸附法是后面两种方法的基础.孔雀石绿是一种使用广泛且对水生生物具有较大毒性的三苯甲烷类染料,因而被本研究采用以评价固定化漆酶的脱色性能及其重复利用性能.

1 材料与方 法

1.1 材 料

杂色云芝 (*Trametes versicolor*, 曾用名: *Coriolus versicolor*) 漆酶 (69 kD, pI 3~4) 发酵液由南京林业大学微生物技术实验室赵林果教授惠赠,发酵方法见文献[21],除简单过滤外,未经过其他任何处理,保存在 -20°C 中.

D201 购自杭州争光树脂科技有限公司(杭州,中国),在使用前, D201 经过乙醇抽提以除去可能的杂质并在 45°C 中烘干,过筛后取直径在 0.6~0.7 mm 的树脂供研究之用.

2,6-二甲氧基苯酚(DMP), Hobt, 孔雀石绿均为分析纯,均购自 Sigma-Aldrich 公司.其他常用药品均为国产分析纯试剂.

1.2 漆酶酶活的测定方法

酶活的测定方法参考文献[16]所述.用紫外-可见分光光度法,以 DMP 为底物测定漆酶活力.一个酶活单位(U)为 30°C 下每 min 氧化 $1\ \mu\text{mol}$ DMP 所需要的酶量. DMP 氧化产物在 470 nm 处有最大吸收,其摩尔消光系数为 $49.6\ \text{mmol}\cdot(\text{L}\cdot\text{cm})^{-1}$.

游离漆酶的测定:在 30°C 的情况下,取 1.0 mL 用蒸馏水稀释到合适倍数的酶液,与 5.0 mL 含有 $1.2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMP 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液 (pH 5.0, $20\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 充分混合,以试剂空白为参比,使用紫外-可见分光光度法测定 470 nm 处吸光度在一定时间内的变化,求出反应初速度.

固定化漆酶的测定:在 30°C 的情况下,取 10 mg

固定化漆酶,与 10.0 mL 含有 $1.2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DMP 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲溶液 (pH 5.0, $20\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 充分混合,搅拌的情况下测定 470 nm 处吸光度在一定时间内的变化,求出反应初速度.

1.3 漆酶的固定化

将漆酶粗酶液用一定体积的磷酸缓冲液 (pH 7.0, $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 稀释到约 $100\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$,再按照如下 3 种方法进行固定.

静电吸附:取 0.2 g D201,与 20 mL 漆酶粗酶液在 10°C 下混合搅拌 24 h,取出树脂,标记为 D201-Lac-I.

先吸附再交联:取 0.2 g D201,与 20 mL 漆酶粗酶液在 10°C 下混合搅拌 6 h 后,加入 5 mL 戊二醛溶液 (25%),继续搅拌至 24 h,取出树脂,标记为 D201-Lac-II.

戊二醛处理载体后吸附:取 0.2 g D201,与 25 mL 戊二醛溶液 (5%) 充分混合, 10°C 下搅拌 6 h,取出树脂,用蒸馏水简单冲洗数遍后与 20 mL 漆酶粗酶液在 10°C 下继续混合搅拌至 24 h,取出树脂,标记为 D201-Lac-III.

每次取出树脂后,用 5.0 mL 磷酸缓冲液 (pH 7.0, $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 多次冲洗树脂以除去树脂表面可能残存的漆酶,直至冲洗液与上清液合并后的总体积接近 250 mL 为止,将其定容至 250 mL 备用.获得的固定化漆酶经冷冻干燥后保存在 4°C 下,漆酶固载量通过计算固载前与固载后溶液中的酶含量(以酶活单位 U 表示)之差得到.

1.4 固定化漆酶连续多批次脱色试验

取 50 mg 固定化漆酶 D201-Lac-III,加入 50 mL 孔雀石绿溶液 ($50\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),再向溶液中加入 0.4 mL Hobt 溶液 ($1.0\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),然后在 30°C 下混合搅拌(此时溶液的 pH 约为 4.5).对照组用 50 mg D201 替代 D201-Lac-III,其他条件均保持同一.每隔一段时间,取出 0.5 mL 溶液通过紫外-可见分光光度法测定孔雀石绿的含量,其最大吸收峰为 618.0 nm.当溶液中的孔雀石绿浓度达到平衡时,将溶液倒出,加入 50 mL 新鲜的孔雀石绿溶液 ($50\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 0.4 mL Hobt 溶液 ($1.0\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),继续搅拌,开始新的循环.

1.5 材料表征

对 D201 以及制得的 D201-Lac-III 均通过电子透射电镜(TEM)对其形貌进行表征.仪器型号为日本产的 JEM-200CX,在南京大学分析中心拍摄.

2 结果与讨论

2.1 漆酶固定效果的比较

由表 1 可以看出,与静电吸附法相比,先吸附后交联法使漆酶的固载量大大提高至 4.65 倍,这种提高与许多研究报道是一致的^[22,23].这可能是因为交联使得本来只是粘附在树脂孔道表面的漆酶也被固定住,同时,交联使得酶分子团聚在一起,从而在树脂内部留下更多的空间让更多的漆酶分子进入孔道内被固定.然而,此方法制得的固定化漆酶的活力却大大受损,酶活回收率仅为静电吸附法的 4.8%,这可能是由于漆酶分子过分交联而使其空间构型发生明显改变所致,同时,也有可能是酶交联后团聚的体积过大,使树脂孔道堵塞,底物难以与漆酶分子接触,进而影响了酶的活力.对先吸附后交联法而言,这种因过分交联而导致酶活损失过大的缺陷已经被很多研究者观察到^[24].总之,先吸附后交联制得的固定化漆酶最终的酶活仅为直接吸附法的 0.22 倍,与直接静电吸附法相比并无优势.

戊二醛处理载体后吸附的方法,其漆酶的固载量有一定下降,仅为静电吸附法的 0.51 倍,然而,其酶活回收率却有很明显的提高,为直接吸附法的 2.99 倍,整体的酶活也为其 1.53 倍(11.70/7.65).与前 2 种方法相比,其固载量下降可能是因为如下原因:此种方法树脂孔道内预先残留少量的戊二醛,

因此,漆酶在被吸附进入孔道的同时就已经被戊二醛交联形成较大的聚合体形式,“堵”在孔道入口附近的位置,使得其他的漆酶分子无法进入,影响了固载量.其酶活回收率有大幅度上升,可能是因为戊二醛的含量很少,使得漆酶分子交联反应的程度较弱,空间构型的改变较小;另一方面,漆酶分子都集中在孔道入口附近的位置,底物与漆酶分子接触的空间阻力较小.此种酶活力的提高与很多文献报道的结果也是一致的^[22,23].此种方法获得的固定化漆酶相比前 2 种,具有很大的优势.

表 1 3 种固定化漆酶的比较

固定化漆酶类别	相对固载量 ¹⁾	酶活力/ $U \cdot g^{-1}$	相对酶活回收 ²⁾
D201-Lac- I	1.00	7.65	1.00
D201-Lac- II	4.65	1.71	0.048
D201-Lac- III	0.51	11.70	2.99

1) 固载量的单位为 $U \cdot g^{-1}$,相对固载量以 D201-Lac- I 的固载量为 1.00; 2) 酶活回收率为固定化漆酶的活力与等量游离漆酶活力的比值,相对酶活回收以 D201-Lac- I 的酶活回收率为 1.00

表 2 是 D201-Lac- III 与其他研究报道的固定化漆酶的比较.从中可以看出,D201-Lac- III 与许多文献报道的固定化漆酶相比,在酶活力上不具劣势,这说明本研究利用漆酶发酵液成功固定了高活力的粗漆酶.由于粗漆酶相对于纯酶具有极低的成本,且 D201-Lac- III 制备时操作较为简便,因此其可能具有更大的应用潜力.

表 2 本研究与其他研究固定化漆酶酶活的比较

Table 2 Comparison of enzyme activities of immobilized laccase in this study and other studies reported

漆酶类型	载体	酶活测定方法	酶活/ $U \cdot g^{-1}$	备注	文献
云芝漆酶,已纯化	硅石,蒙脱石,阴离子树脂 IRA-400,玻璃珠	丁香醛连氮为底物, pH 5.0, 30°C	<12	最大固载量为 $12 U \cdot g^{-1}$ 载体	[12]
云芝漆酶,商业化纯酶	纳米多孔金	DMP 为底物, pH 4.4, 30°C	6~13	酶活测量值略高于本研究方法	[25]
杂色云芝漆酶,纯酶	磁性介孔硅材料	ABTS 为底物, pH 4.5, 20°C	31,16	酶活测量值略高于本研究方法	[26]
多带革孔菌 (<i>Coriolopsis polyzona</i>) 漆酶,已纯化	硅藻土载体 Celite® R-633	ABTS 为底物, pH 3.0, 20°C	<11.7	酶活测量值略高于本研究方法	[5]
云芝漆酶,未经任何纯化的粗酶液	大孔阴离子交换树脂 D201	DMP 为底物, pH 5.0, 25°C	11.7		本研究 (D201-Lac- III)

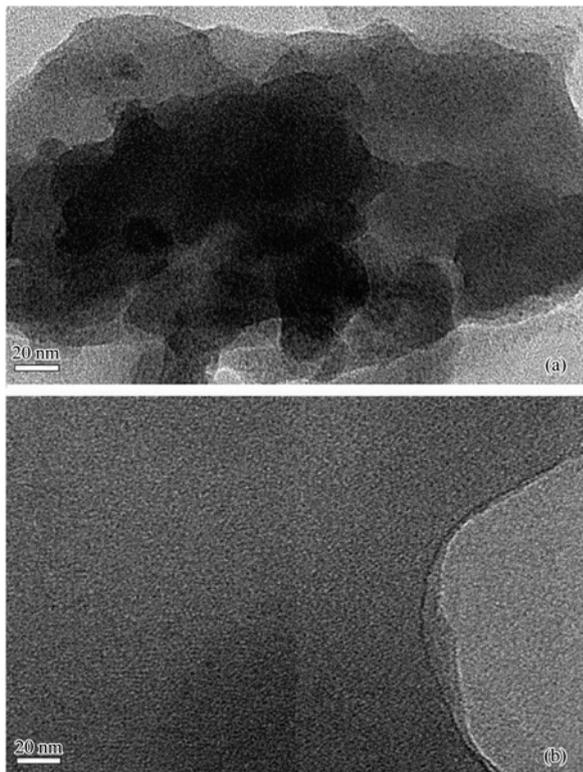
2.2 TEM 表征

由图 1 可以看出,与 D201 相比,D201-Lac- III 上可以明显看到很多斑点状阴影,其直径在 20~30 nm 之间.漆酶单分子的大小约为 $6.5 nm \times 5.5 nm \times 4.5 nm$ ^[25],这些阴影应当是多个漆酶分子的聚集体,这与戊二醛对树脂的预处理是相一致的.这说明,漆酶已经以聚合体的形式被成功固定了.

2.3 多批次脱色试验

孔雀石绿是一种被广泛使用的三苯甲烷类染料,对水生生物有很大的毒性,且其结构稳定,很难被生物降解^[9].由于单独的漆酶并不能很好地降解孔雀石绿^[9],因此需要加入一种介体,本研究选择 Hobt 作为这种介体,它可以被漆酶氧化生成一种自由基中间体 (benzotriazolyl-1-oxide radical),此自由基可以作用于孔雀石绿使其脱色降解^[12].

由图 2 可以看出,D201 对孔雀石绿几乎没有脱



(a) D201-Lac-III; (b) D201

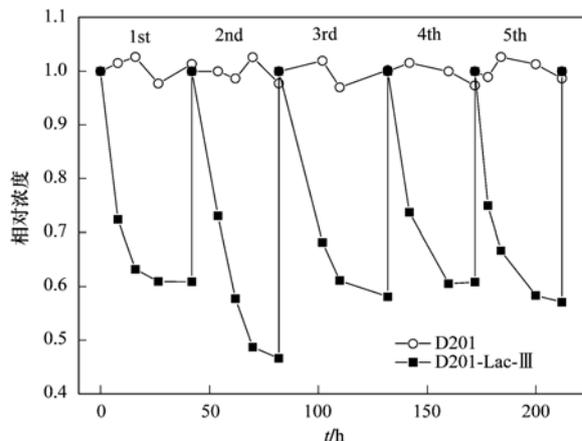
图 1 固定化漆酶 D201-Lac-III 与树脂载体 D201 的电子透射 (TEM) 照片

Fig. 1 TEM photograph of D201-Lac-III and D201

色效果,这是因为孔雀石绿是一种阳离子型染料,不会被阴离子树脂吸附.既然 D201 对孔雀石绿几乎没有吸附作用,D201-Lac-III 对孔雀石绿的去除就完全是因为漆酶的降解作用.

从图 2 可以看出,每一个批次脱色中,孔雀石绿的浓度都是先迅速下降,然后减缓,在 20 h 左右达到平衡.在高于 210 h 的 5 批次连续脱色中,D201-Lac-III 对孔雀石绿的去除率一直稳定在 40% ~ 55% 之间,其去除率并未观察到有下降的趋势.连续 5 批次脱色试验后,对 D201-Lac-III 的酶活性进行测定,其酶活亦未观察到下降,而同样温度下存放 210 h 的游离漆酶,其活性已降至初始时的 20% 以下(数据未显示).

通过连续多批次的脱色试验,可以看出 D201-Lac-III 对环境因子的稳定性有显著的提升,并可以很好地重复利用.这可能是因为树脂载体 D201 对漆酶有很好的保护作用,使得其空间构型不易发生改变而不易失活;同时,也有可能是因为树脂母体上大量的季铵基对质子有明显的排斥作用,所以虽然漆酶作用的环境是酸性环境,但树脂孔道内的 pH 却会相对偏中性, pH 环境会温和很多.除此以外,



50 mg D201-Lac-III 或 D201, 50 mL $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 孔雀石绿染料, 加入 0.4 mL $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hobt 溶液, 30°C

图 2 固定化漆酶 D201-Lac-III 及树脂母体 D201 对孔雀石绿染料的连续多批次脱色

Fig. 2 Continuous batch decoloration of malachite green (MG) by D201-Lac-III and D201

还可能是因为树脂母体本身独特网状结构的作用,树脂母体的网状结构是柔性的,因此可能与漆酶分子缠绕并将其固定起来,此种固定一方面使酶分子构象不易发生大的改变,因此不易变性失活;另一方面,它不像刚性孔那样使酶分子在小范围内的自由度受到过分影响,漆酶分子可以为其催化过程发生一些必要的小的构象改变.总之,D201-Lac-III 在连续多批次脱色试验中具有很优良的表现,考虑到其制备方法的简便、粗漆酶制备的方便及廉价,D201-Lac-III 在未来的应用上可能会有很大的优势.

3 结论

本研究利用 3 种方法将粗漆酶固定到大孔阴离子树脂 D201 上并比较了其固载效果,选择了效果最好的 D201-Lac-III 对孔雀石绿进行连续多批次脱色试验.本研究立足于应用,期望获得对染料废水能实现长期稳定去除效果的固定化漆酶,因此并未研究 D201-Lac-III 对单一环境因子(如 pH、温度等)的稳定性,而着重考察了其在实际操作中的稳定性.通过多批次连续脱色试验,可以看到 D201-Lac-III 基本实现了固定化漆酶提高稳定性、实现重复利用的目的,且其可直接利用粗漆酶进行固定,成本极其低廉,因而具有很大的潜在应用价值.

参考文献:

- [1] Karam J, Nicell J A. Potential applications of enzymes in waste treatment [J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 1997, 69(2): 141-153.

- [2] 彭丹, 谢更新, 曾光明, 等. 黄孢原毛平革菌固态发酵产漆酶的研究及应用[J]. 环境科学, 2008, **29**(12): 3568-3573.
- [3] 钟平方, 彭惠民, 彭方毅, 等. 漆酶催化酚类、苯胺类化合物的动力学分析及其测定废水中邻苯二酚的应用研究[J]. 环境科学, 2010, **31**(11): 2673-2677.
- [4] Srebotnik E, Hammel K E. Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system [J]. Journal of Biotechnology, 2000, **81**(2-3): 179-188.
- [5] Cabana H, Alexandre C, Agathos S N, *et al.* Immobilization of laccase from the white rot fungus *Corioliopsis polyzona* and use of the immobilized biocatalyst for the continuous elimination of endocrine disrupting chemicals [J]. Bioresource Technology, 2009, **100**(14): 3447-3458.
- [6] Camarero S, Ibarra D, Martínez M J, *et al.* Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, **71**(4): 1775-1784.
- [7] Khlifi R, Belbahri L, Woodward S, *et al.* Decolourization and detoxification of textile industry wastewater by the laccase-mediator system[J]. Journal of Hazardous Materials, 2010, **175**(1-3): 802-808.
- [8] 刘晓波, 闫世梁, 李宗伟, 等. 漆酶/HBT 介质系统对靛蓝染料及废水脱色的初步研究[J]. 环境污染与防治, 2008, **30**(6): 27-30.
- [9] 刘友勋, 颜克亮, 熊征, 等. 漆酶介体系统对孔雀绿的脱色研究[J]. 环境科学与技术, 2008, **31**(7): 37-39.
- [10] 杨清香, 王涛, 王栋, 等. 平菇漆酶的性质和应用研究[J]. 环境科学与技术, 2008, **31**(9): 39-41, 71.
- [11] 湛斌, 赵亮亮, 孙秋芳, 等. 红芝所产漆酶对蒽醌染料的脱色研究[J]. 环境科学与技术, 2010, **33**(11): 50-53.
- [12] Peralta-Zamora P, Pereira C M, Tiburtius E R L, *et al.* Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase [J]. Applied Catalysis B-Environmental, 2003, **42**(2): 131-144.
- [13] Rekuć A, Bryjak J, Szymańska K, *et al.* Very stable silica-gel-bound laccase biocatalysts for the selective oxidation in continuous systems [J]. Bioresource Technology, 2010, **101**(7): 2076-2083.
- [14] Wang X J, Sjöberg-Eerola P, Immonen K, *et al.* Immobilization of *Trametes hirsuta* laccase into poly (3,4-ethylenedioxythiophene) and polyaniline polymer-matrices [J]. Journal of Power Sources, 2011, **196**(11): 4957-4964.
- [15] Zhang J B, Xu Z Q, Chen H, *et al.* Removal of 2, 4-dichlorophenol by chitosan-immobilized laccase from *Corioliopsis versicolor* [J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, **45**(1): 54-59.
- [16] 邱华军, 徐彩霞, 姬广磊, 等. 漆酶在纳米多孔金上的固定化及其酶学性质研究[J]. 化学学报, 2008, **66**(18): 2075-2080.
- [17] 赵月春, 付蓉, 莫测辉, 等. Cd 对不同形态漆酶修复 DDT 污染土壤的影响[J]. 环境科学, 2008, **29**(8): 2331-2335.
- [18] 姜德生, 龙胜亚, 黄俊, 等. 漆酶在磁性壳聚糖微球上的固定及其酶学性质研究[J]. 微生物学报, 2005, **45**(4): 630-633.
- [19] 王燕华, 朱凯, 刘辉, 等. D301 树脂固定化假丝酵母脂肪酶 [J]. 生物工程学报, 2009, **25**(12): 2036-2041.
- [20] 宋宝东, 宋丽, 庞春霞, 等. 树脂吸附法固定 *Candida rugosa* 脂肪酶[J]. 化学工程, 2009, **37**(4): 8-10, 44.
- [21] 赵林果, 陆叶, 谢惠芳, 等. 碳源和氮源对彩绒革盖菌液体发酵合成漆酶的影响[J]. 微生物学杂志, 2007, **27**(5): 57-60.
- [22] Lee J, Kim J, Jia H F, *et al.* Simple synthesis of hierarchically ordered mesocellular mesoporous silica materials hosting crosslinked enzyme aggregates [J]. Small, 2005, **1**(7): 744-753.
- [23] Jung D, Paradiso M, Wallacher D, *et al.* Formation of cross-linked chloroperoxidase aggregates in the pores of mesocellular foams: characterization by SANS and catalytic properties [J]. ChemSusChem, 2009, **2**(2): 161-164.
- [24] Lee C H, Lin T S, Mou C Y. Mesoporous materials for encapsulating enzymes [J]. Nano Today, 2009, **4**(2): 165-179.
- [25] Qiu H J, Xu C X, Huang X R, *et al.* Immobilization of laccase on nanoporous gold: Comparative studies on the immobilization strategies and the particle size effects [J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2009, **113**(6): 2521-2525.
- [26] Zhu Y F, Kaskel S, Shi J L, *et al.* Immobilization of *Trametes versicolor* laccase on magnetically separable mesoporous silica spheres [J]. Chemistry of Materials, 2007, **19**(26): 6408-6413.

CONTENTS

Levels and Sources of Gaseous Polybrominated Diphenyl Ethers in Air over the Northern South China Sea	LI Qi-lu, LI Jun, LIU Xiang, <i>et al.</i> (2533)
Observation and Analysis of Air Pollution in Zhangjiakou, Hebei	SHAO Ping, WANG Li-li, AN Jun-lin, <i>et al.</i> (2538)
Smog Chamber Simulation of Ozone Formation from Atmospheric Photooxidation of Propane	HUANG Li-hua, MO Chuang-rong, XU Yong-fu, <i>et al.</i> (2551)
Mechanism and Performance of a Membrane Bioreactor for Treatment of Toluene Vapors	YE Qi-hong, WEI Zai-shan, XIAO Pan, <i>et al.</i> (2558)
Analysis of Odor Pollutants in Kitchen Waste Composting	ZHANG Hong-yu, ZOU Ke-hua, YANG Jin-bing, <i>et al.</i> (2563)
Spatial Changes and Sources of Nitrate in Beijing Urban Ecosystem Surface Water	XU Zhi-wei, ZHANG Xin-yu, REN Yu-fen, <i>et al.</i> (2569)
Distribution Characteristics and Potential Risk of PCBs in Surface Water from Three Tributaries of Yangtze River in Different Periods	LI Kun, ZHAO Gao-feng, ZHOU Huai-dong, <i>et al.</i> (2574)
Distribution Characteristics and Potential Risks of Phenols in the Rainy Season Surface Water from Three Gorges Reservoir	WU Zheng-yong, ZHAO Gao-feng, ZHOU Huai-dong, <i>et al.</i> (2580)
Spatial Distribution of Perfluorooctanoic Acids and Perfluorinate Sulphonates in Surface Water of East Lake	CHEN Jing, WANG Lin-ling, ZHU Hu-di, <i>et al.</i> (2586)
Characteristics of Heavy Metal Pollution in Daninghe River and Modaoxi River of Three Gorges Reservoir Areas	AN Li-hui, ZHANG Yan-qiang, ZHENG Bing-hui, <i>et al.</i> (2592)
Pollution Characteristics and Ecological Risk Assessment of Heavy Metals in the Surface Sediments of the Yangtze River	WANG Lan, WANG Ya-ping, XU Chun-xue, <i>et al.</i> (2599)
Analysis of the Source, Potential Biological Toxicity of Heavy Metals in the Surface Sediments from Shellfish Culture Mudflats of Rudong Country, Jiangsu Province	LI Lei, WANG Yun-long, JIANG Mei, <i>et al.</i> (2607)
Effect of Disturbance Intensity on Phosphorus Release and Its Transformation in the Sediment from Taihu Lake	LI Da-peng, HUANG Yong (2614)
Effects of Intrusions from Three Gorges Reservoir on Nutrient Supply to Xiangxi Bay	ZHANG Yu, LIU De-fu, JI Dao-bin, <i>et al.</i> (2621)
Influence of Perennial Flooding and Drought on Growth Restoration of <i>Acorus calamus</i> in Water-level-fluctuation Zone of the Three Gorges Reservoir	LI Qiang, GAO Xiang, DING Wu-quan, <i>et al.</i> (2628)
Pollution Load and the First Flush Effect of Phosphorus in Urban Runoff of Wenzhou City	ZHOU Dong, CHEN Zhen-lou, BI Chun-juan (2634)
Output Characteristics of Rainfall Runoff Phosphorus Pollution from a Typical Small Watershed in Yimeng Mountainous Area	YU Xing-xiu, LI Zhen-wei, LIU Qian-jin, <i>et al.</i> (2644)
Influence of Land Use Structure on Nitrogen Output in the Watershed of Suburban Agriculture Regions	YANG Feng, WANG Peng-ju, YANG Shan-shan, <i>et al.</i> (2652)
Simulation of Nitrogen and Phosphorus Loss in Siling Reservoir Watershed with AnnAGNPS	BIAN Jin-yun, WANG Fei-er, YANG Jia, <i>et al.</i> (2659)
GIS and L-THIA Based Analysis on Variations of Non-point Pollution in the Guanlan River Watershed, Shenzhen	BAI Feng-jiao, LI Tian-hong (2667)
Response of Sloping Water Erosion to Rainfall and Micro-earth Pattern in the Loess Hilly Area	WEI Wei, JIA Fu-yang, CHEN Li-ding, <i>et al.</i> (2674)
Comparison Study of Enhanced Coagulation on Humic Acid and Fulvic Acid Removal	ZHOU Ling-ling, ZHANG Yong-ji, YE He-xiu, <i>et al.</i> (2680)
Real-time PCR Detection and Quantification of Emerging Waterborne Pathogens (EWPs) and Antibiotic Resistance Genes (ARGs) in the Downstream Area of Jiulong River	WANG Qing, LIN Hui-rong, ZHANG Shu-ting, <i>et al.</i> (2685)
Quantitative and Qualitative Analysis of Total Bacteria and Ammonia-oxidizing Bacteria in Buji River in Wet Season	SUN Hai-mei, BAI Jiao-jiao, SUN Wei-ling, <i>et al.</i> (2691)
Study on the Nitrogen Removal Performance and the Characteristics of Denitrification Bacterial Community Structure of Biological Aerated Filter	PENG Xiao-lan, LIU Cong, CHEN Li-jun (2701)
Analysis of Microbial Community Structure at Full-scale Wastewater Treatment Plants by Oxidation Ditch	GUO Yun, YANG Dian-hai, LU Wen-jian (2709)
Performance and Microbial Community Dynamic Characteristics of an Internal Circulation Reactor Treating Brewery Wastewater	ZHU Wen-xiu, HUANG Zhen-xing, REN Hong-yan, <i>et al.</i> (2715)
Coupling AFM Fluid Imaging with Micro-Flocculation Filtration Process for the Technological Optimization	ZHENG Bei, GE Xiao-peng, YU Zhi-yong, <i>et al.</i> (2723)
Study on Removal Effect of Different Organic Fractions from Bio-treated Effluent of Dye Wastewater by UV/H ₂ O ₂ Process	LI Xin, LIU Yong-di, SUN Xian-bo, <i>et al.</i> (2728)
Optimization of <i>Chlorella pyrenoidosa</i> -15 Photoheterotrophic Culture and Its Use in Wastewater Treatment	WANG Xiu-jin, LI Zhao-sheng, XING Guan-lan, <i>et al.</i> (2735)
Characteristics and Mechanism of 2,4,6-TCP Degradation by the "Fe ⁰ /Enriched-Bacteria" System	DAI You-zhi, GUO Li-li, SHI Lei, <i>et al.</i> (2741)
Immobilization of Crude Laccase onto Anion Exchange Resin and Its Application in Decoloration of Malachite Green	QI Xu-liang, LIU Xiang, LIU Bo, <i>et al.</i> (2747)
Low-Temperature Preparation of TiO ₂ /PS/Fe ₃ O ₄ and Its Photocatalytic Activity and Magnetic Recovery	WANG Xue-jiao, REN Xue-chang, NIAN Juan-ni, <i>et al.</i> (2752)
Study on Catalytic Oxidation of Benzene by Microwave Heating	ZHANG Yu-cai, BO Long-li, WANG Xiao-hui, <i>et al.</i> (2759)
Synergistic Effects of Nano-sized Magnetic Particles and Uncoupler to the Characteristics of Activated Sludge	GAO Li-ying, TANG Bing, LIANG Ling-yan, <i>et al.</i> (2766)
Experimental and Modeling Research on the Settlement of Aerobic Granular Sludge	SU Kui-zu, DENG Xiu-kun, ZHENG Li, <i>et al.</i> (2773)
Analysis of Hydrolytic Enzyme Activities on Sludge Aerobic/Anoxic Digestion After Ultrasonic Pretreatment	YE Yun-di, SUN Shui-yu, ZHENG Li, <i>et al.</i> (2780)
Effect of Microbial Nutrient Concentration on Improvement of Municipal Sewage Sludge Dewaterability Through Bioleaching	SONG Yong-wei, LIU Fen-wu, ZHOU Li-xiang (2786)
Response of the Artificial Cyanobacterial Crusts to Low Temperature and Light Stress and the Micro-structure Changes Under Laboratory Conditions	RAO Ben-jiang, LI Hua, XIONG Ying, <i>et al.</i> (2793)
Seasonal Dynamics of Soil Active Carbon Pool in a Purple Paddy Soil in Southwest China	WU Yan, JIANG Chang-sheng, HAO Qing-ju (2804)
Pollution Characteristics and Accumulation of Antibiotics in Typical Protected Vegetable Soils	YIN Chun-yan, LUO Yong-ming, TENG Ying, <i>et al.</i> (2810)
Transformation and Influences of Copper and Selenium Fractions on Heavy Metals Bioavailability in Co-contaminated Soil	HU Bin, LIANG Dong-li, ZHAO Wen-long, <i>et al.</i> (2817)
Response of Soil Microbial Community to the Bioremediation of Soil Contaminated with PAHs	ZHANG, Jing, LIN Xian-gui, LIU Wei-wei, <i>et al.</i> (2825)
Bioremediation of PAHs Contaminated Soil from Beijing Coking Plant by <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	ZHANG Zhi-yuan, WANG Cui-ping, LIU Hai-bin, <i>et al.</i> (2832)
Leaching Experiments on the Release of Trace Elements from Tailings of Chashan Antimony Mine, Guangxi, China	CAI Yong-bing, LI Ling, WEI Xiao-fei, <i>et al.</i> (2840)
Accumulation Characteristics of Arsenic in Suburban Soils of Beijing	QI Jie, WANG Mei-e, WANG Zi-qiang, <i>et al.</i> (2849)
Antioxidant Enzyme Gene Expression as Molecular Biomarkers of Exposure to Polycyclic Musks	CHEN Chun, ZHOU Qi-xing, LIU Xiao-wei (2855)
Effects of Ozone Pollution on the Accumulation and Distribution of Dry Matter and Biomass Carbon of Different Varieties of Wheat	KOU Tai-ji, YU Wei-wei, ZHU Jian-guo, <i>et al.</i> (2862)
Influence of Reaction Time of Urea Hydrolysis-Based Co-precipitation on the Structure of ZnAl Layered Double Hydroxides and the Phosphate Adsorption	LU Ying, CHENG Xiang, XING Bo, <i>et al.</i> (2868)
Competitive Adsorption Kinetics of Aqueous Pb ²⁺ and Cu ²⁺ on Nano-HAP Surfaces	HU Tian-tian, CANG Long, WANG Yu-jun, <i>et al.</i> (2875)
Effects of pH and Ni ²⁺ on Sorption Behavior of Phenanthrene on Engineered Nano-Silica	LUO Pei, SUN Hong-wen, ZHANG Peng (2882)
Adsorption Characteristics and Mechanism of Uranium on Attapulgite	LIU Juan, CHEN Di-yun, ZHANG Jing, <i>et al.</i> (2889)
Adsorption Characteristics of Ciprofloxacin in Ustic Cambosols	CUI Hao, WANG Shu-ping (2895)
Kinetic Mechanism and Characteristics Researches for Hydrazine-based NO _x Removal at Moderate to High Temperatures	HONG Liu, CHEN De-zhen, WANG Du, <i>et al.</i> (2901)
Current Research Situation of H ₂ S Selective Catalytic Oxidation Technologies and Catalysts	HAO Zheng-ping, DOU Guang-yu, ZHANG Xin, <i>et al.</i> (2909)

《环境科学》第6届编辑委员会

主 编: 欧阳自远

副主编: 赵景柱 郝吉明 田 刚

编 委: (按姓氏笔画排序)

万国江 王华聪 王凯军 王绪绪 田 刚 田 静 史培军
朱永官 刘志培 汤鸿霄 陈吉宁 孟 伟 周宗灿 林金明
欧阳自远 赵景柱 姜 林 郝郑平 郝吉明 聂永丰 黄 霞
黄 耀 鲍 强 潘 纲 潘 涛 魏复盛

环 境 科 学

(HUANJING KEXUE)

(月刊 1976年8月创刊)

2012年8月15日 33卷 第8期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 33 No. 8 Aug. 15, 2012

主 管	中国科学院	Superintended	by	Chinese Academy of Sciences
主 办	中国科学院生态环境研究中心	Sponsored	by	Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences
协 办	(以参加先后为序) 北京市环境保护科学研究院 清华大学环境学院	Co-Sponsored	by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection School of Environment, Tsinghua University
主 编	欧阳自远	Editor-in -Chief		OUYANG Zi-yuan
编 辑	《环境科学》编辑委员会 北京市2871信箱(海淀区双清路 18号, 邮政编码:100085) 电话:010-62941102, 010-62849343 传真:010-62849343 E-mail: hjkx@rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn	Edited	by	The Editorial Board of Environmental Science (HUANJING KEXUE) P. O. Box 2871, Beijing 100085, China Tel:010-62941102, 010-62849343; Fax:010-62849343 E-mail: hjkx@rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn
出 版	科 学 出 版 社 北京东黄城根北街16号 邮政编码:100717	Published	by	Science Press 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷 装 订	北京北林印刷厂	Printed	by	Beijing Bei Lin Printing House
发 行	科 学 出 版 社 电话:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com	Distributed	by	Science Press Tel:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com
订 购 处	全国各地邮电局	Domestic		All Local Post Offices in China
国外总发行	中国国际图书贸易总公司 (北京399信箱)	Foreign		China International Book Trading Corporation (Guoji Shudian), P. O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号: ISSN 0250-3301
CN 11-1895/X

国内邮发代号: 2-821

国内定价: 70.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发行