

## 过氧化物酶-辅酶 NADH 催化 $O_2/H_2O_2$ 产生羟基自由基 研究及其氯苯处理初探

李海涛<sup>1,2</sup>, 李玉平<sup>2</sup>, 曹宏斌<sup>2\*</sup>, 李鑫钢<sup>1</sup>, 薛占强<sup>3</sup>

1. 天津大学化工学院, 天津 300072
2. 中国科学院过程工程研究所, 绿色过程与工程重点实验室, 北京 100190
3. 鞍山钢铁股份有限公司化工总厂, 辽宁 鞍山 114021

**摘要** 利用光谱学和波谱学手段研究 HRP-NADH- $O_2/H_2O_2$  体系中自由基生成机理及 HRP 状态的变化, 并应用该酶体系对有机污染物氯苯进行初步处理研究。紫外可见光谱表明酶-辅酶体系在过氧化氢的氧化下, 产生了强氧化性的化合物 III, 说明可能产生羟基自由基。分别选用 DMPO 和 POBN 两种自由基捕获剂, 通过电子自旋顺振(EPR)检测到 HRP+NADH 体系在  $O_2$  和  $H_2O_2$  存在下产生超氧阴离子自由基( $O_2^{\cdot-}$ )和羟自由基( $\cdot OH$ )。在开始 10 min 内过氧化物酶主要以化合物 III 形式存在, 随后转化为 HRP, 同时检测出较高浓度的  $\cdot OH$ 。 $O_2$  存在条件下产生  $\cdot OH$  浓度大约是单独  $H_2O_2$  存在条件下的 4 倍。超氧化物歧化酶(SOD Zn-Cu)在 HRP+NADH+ $O_2$  体系中能消除由 NADH 还原  $O_2$  产生的  $O_2^{\cdot-}$ , 从而抑制  $\cdot OH$  生成。HRP+NADH 体系相对于传统酶法处理能提高 20% 左右的酶活力, 说明酶-辅酶体系能够提高酚类化合物的去除效率。实验条件下 HRP+NADH+ $H_2O_2$  和 HRP+NADH+ $H_2O_2+O_2$  体系对于非酚类污染物氯苯的去除率分别到达了 24.6% 和 48.2%, 远高于传统酶法的 1.42%, 突破了传统酶处理只能处理酚类污染物的局限性。

**关键词** 羟基自由基; 辣根过氧化物酶; 辅酶; 电子自旋共振; 废水处理

中图分类号: O433.3 文献标识码: A DOI: 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)11-3119-05

### 引言

酶技术由于具有反应条件温和、处理速率快、不需要微生物生长条件等优点在水处理领域日益受到关注<sup>[1-3]</sup>。酶技术主要应用过氧化物酶在过氧化氢的氧化下, 形成活性基团 FerreyHeme[Fe(IV)=O](化合物 I)和 FerreyHeme[Fe(IV)=O](化合物 II), 从而将酚类或胺类化合物氧化成二聚体或多聚体, 通过沉淀或其他分离方法得到去除。所以, 传统酶法常只对酚类或胺类有机物化合物去除效果较好, 而对大多数持久性有机污染物的处理难以奏效, 极大限制了酶法的应用范围<sup>[4-8]</sup>。

有研究发现<sup>[9-12]</sup>, 生物体内辅酶 NADH 能够将氧气还原为超氧阴离子自由基, 生成的超氧阴离子能将 HRP 转化

为化合物 III, 化合物 III 在一定条件下可能转化为羟基自由基。基于羟基自由基( $\cdot OH$ )因其有极高的氧化电位(2.8 V)具有强氧化性, 能不加选择性将有机物氧化分解, 从而使得酶技术处理非酚类的持久性有机污染物成为可能。但是, 此类研究主要集中在自由基对生物体损伤和抗氧化剂筛选等方面等生物医学研究, 未能涉及污染治理, 更谈不上对有机物的降解机理研究。

本文将辣根过氧化物酶与辅酶结合形成新的酶处理系统, 通过光谱学和波谱学手段研究酶-辅酶体系中自由基生成机理, 证明了新酶处理过程中羟基自由基的产生, 并初步应用于非酚胺类的模拟污染物氯苯处理, 取得良好结果。酶法新体系将传统酶技术的处理范围有望拓展到其他非酚类持久性有机污染物处理, 丰富酶法处理机理, 同时对难降解有机物在生物体内的降解机理提供一定的指导意义。

收稿日期: 2009-10-14, 修订日期: 2010-04-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(20607023)和国家高技术研究发展计划项目(2007AA06Z327)资助

作者简介: 李海涛, 1981 年生, 天津大学化工学院在读博士

\* 通讯联系人 e-mail: lihaitao103904@126.com

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

辣根过氧化物酶(HRP)、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)购于美国 Sigma 公司; 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH) 购于美国 Roche 公司; DMPO(美国 Aladdin 公司); POBN(美国 Sigma 公司); 4-氨基安替吡啉(4-AAP)、结晶紫、苯酚、氯苯、 $H_2O_2$  (30%)、 $K_2HPO_4$ 、 $KH_2PO_4$ 、 $H_3PO_4$ 、 $Na_3PO_4$  均为分析纯购于国药集团化学试剂北京有限公司, 各种溶液均采用 Milli-Q 纯水机的超纯水配制。

### 1.2 仪器与方法

美国 Lab Tech 公司(UV-2000)的双光束紫外可见分光光度仪, 扫描波长 190~800 nm; 德国 Bruker E-500 电子顺磁共振(EPR)波谱仪, X 波段, 调制频率 100 kHz, 扫描宽度 100 G, 微波功率 20 mW, 时间常数 0.040 96 s, 磁场范围 3 434~3 530 G, 中心磁场 3 480 G; 酶活力的测定(Metelitzka, D. I., 1991)采用苯酚、过氧化氢和 4-AAP 反应生成红色物质, 在 510 nm 吸光度和酶活力呈线性关系, 一个酶活力(1 U)定义为在 pH7.4 和 25 °C 下 1 min 内催化 1  $\mu$ mol  $H_2O_2$  需要的 HRP 的量(反应体系中含有 10 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 苯酚、2.4 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 4-AAP 和 0.2 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>  $H_2O_2$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酶-辅酶体系中 HRP 的存在形态的光谱学分析

辣根过氧化物酶各种氧化还原形态的光谱图如图 1 所示, HRP-为原始形态; Comp I-化合物 I (10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>  $H_2O_2$  和 10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> HRP 反应 5 min); Comp II-化合物 II (100  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>  $H_2O_2$  和 10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> HRP 反应 5 min); Comp III-化合物 III (0.5mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> NADH 加入含饱和溶解氧的 10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> HRP 溶液中)。HRP 的特征吸收峰为 402, 498 和 640 nm; 化合物 I 在 600~650 nm 之间有较强的吸收峰; 化合物 II 特征吸收峰为 418, 530 和 554 nm; 化合物 III 的特征吸收峰为 418, 544 和 578 nm。一般认为在 452 nm 处吸光值增加可以用来表明有化合物 III 的生成(其他

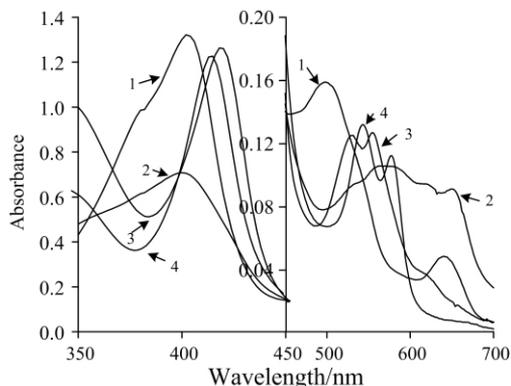


Fig 1 UV-Vis spectroscopy of different HRP states

1: HRP native state; 2: Compound I;  
3: Compound II; 4: Compound III

形态在次波长下吸光值基本没有变化)。

将过氧化氢原位加入到酶-辅酶体系中, 进行不同时刻的光谱扫描和特征波长动力学测定, 结果分别如图 2 和图 3 所示。从图 2 和图 3 可看出, 体系在开始的 1 min 内 418 nm 吸光值迅速增加, 同时 452 nm 处吸光值也迅速增大, 通过与图 1 中 HRP 不同形态光谱图比对, 说明有化合物 III 生成, 但是不能排除有化合物 II 存在的可能。从图 3 可看出, 在 1~5 min 之间化合物 II 和 III 浓度维持稳定, 5 min 后开始出现衰减, 所以我们认为在这段时间内应该有较高浓度的羟基自由基生成, 可以作为 EPR 技术捕获自由基最佳时间段的依据。在 20 min 后 HRP 在 402, 498 和 640 nm 的特征吸收峰开始出现明显增加, 同时在 418 和 452 nm 吸光值开始明显减弱, 说明这时大部分的化合物 II 和 III 转化为 HRP, 当时间延迟到 60 min 时, 已经全部转化为 HRP。

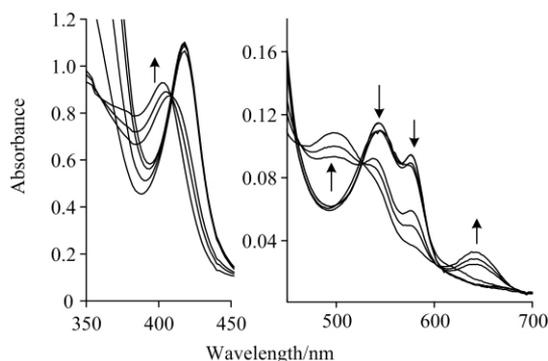


Fig 2 UV-Vis spectroscopy of HRP with reaction time (0, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 60 min) in the presence of NADH and  $H_2O_2$  (10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> HRP, 1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> NADH, 100  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>  $H_2O_2$ , 0.02 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> PBS, pH 6.0)

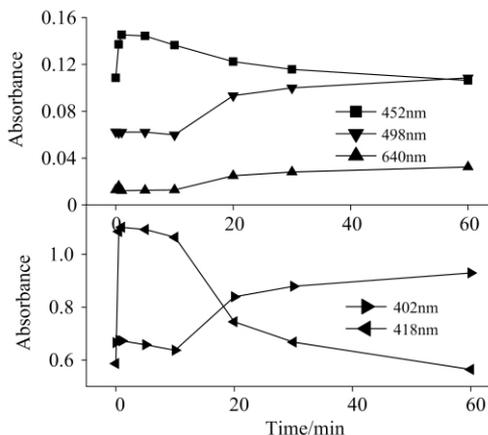


Fig 3 Special wavelength of HRP with reaction time in the presence of NADH and  $H_2O_2$  (10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> HRP, 1 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> NADH, 100  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>  $H_2O_2$ , 0.02 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> PBS, pH 6.0)

### 2.2 酶-辅酶体系中羟自由基产生的 ESR 分析

图 4 给出了 DMPO 作为自由基捕获剂时不同体系的 ESR 图。从图中可以看出, HRP-NADH- $H_2O_2$  体系在 5 min

时生成了近似 1:1:1:1 的超氧自由基的信号峰(曲线 *b*), 典型的羟自由基 1:2:2:1 的信号峰(曲线 *a*)难以明显辨认, 但中间有如图 5 中 *a* 标注的 1 和 2 两个小峰, 可能有羟自由基生成, 但被较高浓度的超氧自由基信号掩盖所致。20 min 时(曲线 *c*)超氧自由基的特征峰开始减弱, 有类似羟自由基的波谱出现, 说明体系中部分超氧自由基在 HRP 催化作用下生成化合物 III, 并进一步向羟自由基转化, 但此过程速度较慢。从图 3 光谱分析结果也可以看出, 在 5 min 时化合物 III 开始向 HRP 转化, 此过程可能伴随羟自由基生成。而单独 HRP-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 体系(曲线 *d*)有一些微弱的信号峰, 可能是化合物 I 或 II 产生的, 并没有观察到超氧自由基和羟自由基的信号峰。曲线 *e* 表征了在酶-辅酶体系中加入超氧化物歧化酶(SOD, 一种能够将超氧阴离子分解为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 O<sub>2</sub> 的歧化酶)后的 ESR 谱图, 从图中可看出, 没有检测到超氧阴离子自由基和羟自由基的信号, 说明超氧自由基的消除抑制了羟自由基的生成, 表明超氧自由基的产生促进了羟自由基生成。

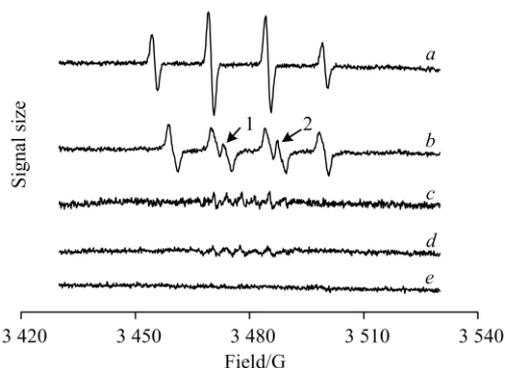


Fig 4 EPR spectroscopy for radicals determination with DMPO as a spin-trapper

Condition: 0.5 mL 1 mmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.02 mol · L<sup>-1</sup> PBS, pH 6.0), 0.2 mL 0.4 mol · L<sup>-1</sup> DMPO, 0.2 mL 2 mg · mL<sup>-1</sup> HRP (or 0.5 mM Fe<sup>2+</sup>-EDTA), 0.2 mL 2 mg · mL<sup>-1</sup> NADH, room temperature.

*a*: Fenton (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Fe<sup>2+</sup>-EDTA, 1 min); *b*: HRP-NADH-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5 min; *c*: HRP-NADH-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 20 min; *d*: HRP-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5 min; *e*: addition 0.2 mg · mL<sup>-1</sup> SOD in HRP-NADH-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5 min

由于 DMPO 能同时捕获超氧自由基和羟基自由基形成加合物, 选择性较低, 在羟自由基浓度不高时, 信号容易被干扰。POBN 只能捕获羟自由基, 而不能捕获超氧阴离子自由基, 能消除超氧自由基干扰。图 5 给出了不同体系在 POBN 作为捕获剂时的 ESR 图。从图中可以看出, HRP-NADH-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 体系在 2 min 内已经有明显的羟自由基加合物的 ESR 峰生成(曲线 *b*), 但没有 Fenton 反应产生的浓度高(曲线 *a*), 说明超氧自由基的生成速度比羟自由基较快, 只是在初始阶段含有较高浓度的超氧自由基, 采用 DMPO 对羟自由基的捕获量相对超氧自由基较少, 在波谱图中没有表现出来。从曲线 *c* 看出, 通入 10 mg · L<sup>-1</sup> 氧气后, 羟基自由基产生量迅速增加, HRP-NADH-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> 体系是 HRP-NADH-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 体系羟基自由基含量约 4 倍。现场 ESR 试验

中可以发现, HRP-NADH-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> 体系中羟基自由基加合物峰在 2~8 min 内保持一个稳定浓度, 10 min 后才较明显的衰减。这是因为在 NADH 存在情况下, 氧气被还原为超氧阴离子自由基, 产生的超氧阴离子一部分与 HRP 反应生成化合物 III, 还有一部分发生歧化反应产生过氧化氢和氧气, 生成过氧化氢与化合物 III 反应产生羟自由基; 而开始加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可能产生大量的化合物 II, 可能不利于 ·OH 的产生。

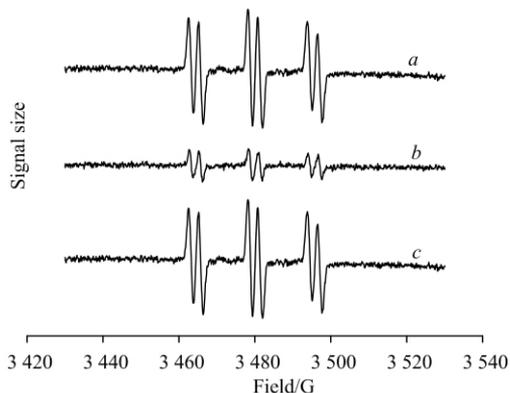


Fig 5 EPR spectroscopy for hydroxyl radical determination with POBN as spin-trapper

Condition: 0.5 mL 10 mg · L<sup>-1</sup> O<sub>2</sub> (or 1 mmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in 0.02 mol · L<sup>-1</sup> PBS (pH 6.0), 0.2 mL 10 mmol · L<sup>-1</sup> POBN (in 0.2 mol · L<sup>-1</sup> ethanol solution), 0.2 mL 4 mg · mL<sup>-1</sup> HRP (or 0.5 mmol · L<sup>-1</sup> Fe<sup>2+</sup>-EDTA), 0.2 mL 7 mg · mL<sup>-1</sup> NADH, 2 min, room temperature

*a*: Fenton (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Fe<sup>2+</sup>); *b*: HRP-NADH-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; *c*: HRP-NADH-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-O<sub>2</sub>

### 2.3 酶-辅酶体系对有机污染物的催化降解

利用苯酚作为目标物, 考察辅酶 NADH 对 HRP 的酶活力的影响, 如图 6 所示。在试验条件下, 酶活力提高了 20% 左右。这是由于酶-辅酶体系中生成了氧化能力更强的羟自由基, 提高了苯酚的氧化速率, 说明酶-辅酶过程提高了酚类污染物的去除效果, 这是因为酶-辅酶过程中除了传统的酶处理途径外, 还产生了羟基自由基等强氧化性活性物种, 能提高苯酚的氧化速率。

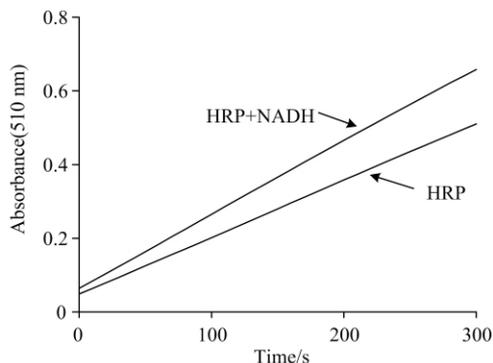


Fig 6 Effect of NADH on enzymatic activity for phenolic substrates removal

1 μmol · L<sup>-1</sup> IRP, 100 μmol · L<sup>-1</sup> NADH, 0.2 mmol · L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2.4 mmol · L<sup>-1</sup> 4-AAP, 0.02 mol · L<sup>-1</sup> PBS (pH7.4), 21 °C

**Table 1** Effect of enzyme systems on removal of chlorobenzene

不同试验条件	氯苯去除率/%
HRP-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.42
HRP-NADH-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	24.6
HRP-NADH-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -O <sub>2</sub>	48.2

实验条件: pH 7; 氯苯浓度 1.0 mg · L<sup>-1</sup>; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度 1 mmol · L<sup>-1</sup>; HRP 浓度 1 μmol · L<sup>-1</sup>; NADH 浓度 100 μmol · L<sup>-1</sup>。

为了探讨酶-辅酶体系对废水中非酚类有机污染物的去除, 扩展酶催化体系的应用领域, 选取典型的持久性有机污染物氯苯作为模拟污染物, 利用传统酶(HRP-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)体系和本研究的酶-辅酶体系分别进行处理, 结果如表 1 所示。氯苯的稳定性较强, 难以被常规氧化剂氧气或过氧化氢氧化, 但是能被羟基自由基氧化分解。由于传统酶处理过程(HRP-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)是利用化合物 I 和化合物 II 将酚类或芳香胺类有机物氧化形成多聚物沉淀, 化合物 I 和化合物 II 的氧化性较弱, 难以氧化非酚胺的污染物氯苯, 从而氯苯的去除率很低(1.42%)。加入辅酶 NADH 后, 氯苯去除率迅速提高到 24.6%, 说明酶-辅酶过程产生的羟基自由基将氯苯氧化分

解; 在通入氧气的酶-辅酶体系中, 氯苯的去除率达到了 48.2%, 说明 HRP-NADH-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> 体系产生的羟基自由基浓度更高, 这与前述以 POBN 为捕获剂的 ESR 研究一致。研究结果表明, 新的酶-辅酶体系能够利用过程产生的羟基自由基或超氧自由基, 对非酚胺的有机污染物氧化分解, 这对拓展酶处理范围和丰富酶处理理论提供有益思路。

### 3 结 论

通过光谱学和 EPR 波谱学的研究, 验证在 O<sub>2</sub> 或 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在情况下, 酶-辅酶体系(HRP+NADH)中生成了化合物 III、O<sub>2</sub><sup>-</sup> 和 ·OH; 在酶-辅酶体系中 O<sub>2</sub> 作为氧化剂比 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 更利于 ·OH 生成。NADH 能够提高 HRP 催化酚类污染物的酶活力, 从而提高了酚类污染物的去除率。由于辅酶加入能够催化 HRP 产生氧化能力更强的 ·OH, 能够氧化分解非酚胺的有机污染物氯苯, 从而有可能成为拓展非酚胺有机污染物的新型酶处理过程。

### 参 考 文 献

- [1] Kim E Y, Choi Y J, et al. *Biotechnol. Bioproc. E.*, 2006, 11(5): 462.
- [2] Ghasempur S, Torabi S F, et al. *Environ. Sci. Technol.*, 2007, 41(20): 7073.
- [3] Morimoto K, Tatsumi K, Kuroda K I. *Soil Biol. Biochem.*, 2000, 32(8-9): 1071.
- [4] Victor M. Samokyszyn. *Chem. Res. Toxicol.*, 1995, 8(3): 349.
- [5] Chen Si-xue, Schopfer Peter. *Eur. J. Biochem.*, 1999, 260: 726.
- [6] Barry Halliwell. *Planta*, 1978, 140: 81.
- [7] Kennosuke Yokota, Isao Yamazaki. *Biochemistry*, 1977, 16(9): 1913.
- [8] Metelitz D I, Litvinchuk A V, et al. *J. Mol. Catal.*, 1991, 67: 401.
- [9] Carmen Schweikert, Anja Liskay. *Phytochemistry*, 2002, 61: 31.
- [10] Eghbal Mohammad A, Tafazoli Shahrzad, et al. *Chemico-Biological Interactions*, 2004, 151: 43.
- [11] Vesna Hadži-Taškovic Šukalovic, et al. *Plant Science*, 2003, 165: 1429.
- [12] Yang Xianqin, Ma Kesen. *Scientific Commons*, 2005, 344: 130.

## The Production of Hydroxyl Radical in HRP-NADH-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> Systems and Its Application in Chlorobenzene Removal

LI Hai-tao<sup>1,2</sup>, LI Yu-ping<sup>2</sup>, CAO Hong-bin<sup>2\*</sup>, LI Xin-gang<sup>1</sup>, XUE Zhan-qiang<sup>3</sup>

1. School of Chemical Engineering & Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

2. Key Laboratory of Green Process & Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

3. Chemical Plant, Angang Steel Co. Ltd., Anshan 114021, China

**Abstract** The mechanism of radical generation in HRP-NADH-O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> systems and state-change of horseradish peroxidase (HRP) was investigated by using ESR and UV measurements, and the novel enzyme-coenzymatic systems were performed to degrade chlorobenzene as a non-phenolic persistent organic pollutants. The UV results showed that compound III was produced from HRP oxidized by hydrogen peroxide with the catalysis of NADH, which would generate hydroxyl radical. The ESR results demonstrated the production of ·OH and O<sub>2</sub><sup>-</sup> in enzyme-coenzymatic system in the presence of O<sub>2</sub> or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with DMPO and POBN as spin-trappers, respectively. In HRP-NADH-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system, compound III was the main state of HRP in the initial 10

min, and then converted to HRP with generating hydroxyl radical; and after the addition of oxygen, the production of hydroxyl radical was promoted rapidly, as 4 times as that of the system in absence of oxygen. The addition of SOD(Zn-Cu) decreased the production of hydroxyl radical significantly, resulting from that SOD eliminated  $O_2$  reduction to  $O_2^-$  by NADH and then inhibited  $\cdot OH$  formation. The results showed that NADH could improve by about 20% enzyme activity of HRP for phenol removal. The removal of chlorobenzene with HRP-NADH- $H_2O_2$  and HRP-NADH- $H_2O_2$ - $O_2$  systems reached 24.6% and 48.2%, respectively, which was much higher than that with traditional enzymatic system (1.42%), showing a promising prospect in proposal of other non-phenol POPs in wastewater.

**Keywords** Hydroxyl radical; Horseradish peroxidase; Coenzyme; EPR; Wastewater treatment

(Received Oct. 14, 2009; accepted Apr. 8, 2010)

\* Corresponding author