

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

钟平方^{1,2}, 彭惠民^{1*}, 彭方毅³, 蔡强², 何苗⁴

(1. 重庆医科大学基础医学院, 重庆 400016; 2. 浙江清华长三角研究院生态环境研究所, 嘉兴 314000; 3. 重庆理工大学化学与生物工程学院, 重庆 400050; 4. 清华大学环境科学与工程系, 北京 100084)

摘要: 含酚、苯胺类废水是环境中水污染的重要来源之一. 本研究以漆酶分析酚类及苯胺类底物的动力学特性为基础, 建立酚类、苯胺类化合物的分析方法. 以分光光度法测定漆酶催化 0~10 mg/L 酚类及苯胺类底物的反应速率, 作出底物浓度与反应速率的标准曲线, 采用漆酶筛查并检测了 3 种焦化废水中非挥发酚类含量. 结果表明, 漆酶的酚类及苯胺类底物主要以多元酚、氨基酚及多元胺为主, 其中酚类的最适 pH 在 7.0 左右, 苯胺类在 4.5~5.0 之间, 各底物 K_m 值大小在 0.4~10 mmol/L 之间. 除联苯胺外, 分光光度法所得到的标准曲线均具有较好的一级反应动力学线性关系, 相关系数 R^2 在 0.96 以上. 3 种焦化废水中邻苯二酚含量分别为 190.5、265.8 和 155.3 mg/L, 回收率介于 91.9%~115.8% 之间.

关键词: 漆酶; 酚类; 苯胺类; 分光光度法; 邻苯二酚

中图分类号: X502 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)11-2673-05

Kinetic Analysis of Laccase Catalyze Phenolic and Aniline Compounds and Detecting Catechol in Wastewater

ZHONG Ping-fang^{1,2}, PENG Hui-min¹, PENG Fang-yi³, CAI Qiang², HE Miao⁴

(1. Faculty of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Research Institute For Environment, Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University, Jiaxing 314000, China; 3. Chemical and Biological Engineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400050, China; 4. Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Phenolic or aniline compounds were important pollutants in the industrial wastewaters to seriously polluted water environment. This research developed a detecting method of phenolic and aniline compounds based on the kinetic parameters of the substrates of laccase. Catalytic reaction between laccase and phenolic and aniline compounds was characterized using spectrophotometric method, which resulted 0-10 mg/L substrate reaction rate and calibration curve of substrate concentration and reaction rate. And then the non-volatile phenols in three kinds of coking wastewater were screened and the contents were detected. The result showed that polyhydric phenol, multi-amine and aminophenol were the main substrates of laccase. The optimum pH of phenols was around 7.0 and anilines 4.5-5.0, K_m values of each substrates was 0.4-10 mmol/L. The calibration curve performed good first order kinetics linear relationship except benzidine with correlation coefficients above 0.96. Using laccase method, the contents of catechol in three kinds of coking wastewater were respectively detected to be 190.5, 265.8 and 155.3 mg/L with recoveries ranged from 89.9% to 115.8%.

Key words: laccase; phenolic compounds; aniline compounds; spectrophotometric method; catechol

漆酶 (laccase, EC 1.10.3.2) 是一种含铜的多酚氧化酶, 广泛存在于高等植物、真菌、昆虫和某些细菌中^[1]. 漆酶的底物主要包括酚类及其衍生物、苯胺及其衍生物、羧酸及其衍生物、甾体激素、生物色素金属有机化合物及其他非酚类底物等六大类^[2,3]. 由于漆酶对底物有较强的催化降解能力, 因此广泛用于造纸工业^[4]、食品加工^[5]、染料脱色^[6]、环境保护^[7]、生物传感器^[8]等方面研究. 尤其在含酚工业废水、印染废水、多环芳烃 (PAHs)、杀虫剂和农药的降解^[9]等方面, 具有很大的应用潜力. 含酚废水中的邻苯二酚、对苯二酚、焦性没食子酸 (连苯三酚) 等均是漆酶的重要底物, 因此可以采用漆酶

检测废水中的酚类化合物含量. 与传统的高效液相色谱法^[10]和气相色谱-质谱法^[11]相比, 利用漆酶检测酚类及苯胺类化合物不需要昂贵的仪器, 操作简便快捷, 适于快速筛查分析.

目前对漆酶的研究主要集中于漆酶传感器^[12,13]和漆酶催化与降解等方面, 对不同底物的催

收稿日期: 2009-12-28; 修订日期: 2010-03-03

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2007AA062419); 浙江省重点科技计划项目 (2006C23069); 浙江省自然科学基金项目 (Y507081)

作者简介: 钟平方 (1983~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为环境监测, E-mail: zpfhn@126.com

* 通讯联系人, E-mail: penghuimin6@sohu.com

化特性差异,尚缺少分析,造成漆酶对酚类和苯胺类进行定性及定量分析困难.本研究采用分光光度法分析研究漆酶催化酚类、苯胺类化合物的动力学特性,作出标准曲线,并检测工业废水中某种或某几种酚类化合物含量,以期反映其总体污染程度提供快速方便准确的依据.

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

LC-2010A 液相色谱仪 (SHIMADZU),包括 SPK-6AUV 检测器, Echrom 98 色谱数据处理工作站 (大连依利特科学仪器有限公司), Hypersil ODS 色谱柱 (4.6 mm × 200 mm, ID 5 μm); UV-2450 紫外可见分光光度计 (SHIMADZU); AL204-IC 电子天平 (Mettler-Toledo); 6173 酸碱度/氧化还原/温度台式测试仪 (Jenco); Milli-Q Academic 超纯水器 (Millipore); 88-I 型定时恒温磁力搅拌器 (上海司乐仪器有限公司).

实验所用试剂:漆酶 (EC 1.10.3.2, 商品号: 40452, Sigma-Aldrich); 2,6-二甲氧基苯酚 (DMP) (Sigma-Aldrich)、对苯基苯酚 (Alfa-Aesar); 甲醇 (CNW) 为色谱纯; 对甲酚、间苯二酚、苯胺、焦性没食子酸、对苯二酚、苯酚、邻联甲苯胺、联苯胺均为分析纯; 2-二甲氧基酚、2-氨基酚、4-氨基酚、间甲酚、邻甲酚、邻苯二胺、对苯二胺、邻甲苯胺、邻苯二酚均为化学纯.

1.2 酶促动力学分析

室温下 (以下全部步骤均在室温 25℃ 下进行), 2.95 mL 的底物溶液 (0.05 mol/L 乙酸盐缓冲液配制) 加入 50 μL 酶液 (5 mg/mL) 混匀后, 分光光度计下从 200 ~ 900 nm 以 0.5 nm 为间隔进行多次光谱扫描, 检出吸收峰.

分别以 pH 3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、7.8 的乙酸盐缓冲液, 配制成不同 pH 的相同浓度底物溶液, 加入酶液混匀, 分光光度计下以 0.5 s 的时间间隔扫描 3 min, 得到时间-吸光值变化曲线, 曲线斜率即酶反应速率.

在最适 pH 下, 测定 5 个梯度浓度 (0.40、0.50、0.67、1.00、2.00 mol/L) 的底物溶液反应速率, 作出双倒数图, 求出 K_m 值.

标准曲线测定: 与 K_m 测定相似, 配制 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 mg/L 和 0、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60、0.70、0.80、0.90、1.00 mg/L 共 2 组底物溶液, 加

入酶液混匀, 经 10 s 反应稳定后测定反应速率, 作出反应速率 (吸光值变化速率) 与浓度的曲线图.

1.3 废水检测

漆酶检测废水中非挥发酚: 水样经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后, NaOH 调 pH 至 7.0, 乙酸盐缓冲液稀释至适当的浓度, 加入酶液, 光谱扫描, 测定反应速率, 操作方法同底物测定一致. 在 3 组样品中添加不同量的已知含量的标准品, 加入酶液检测反应速率, 计算平均加标回收率.

高效液相色谱 (HPLC) 测定邻苯二酚含量: 柱温 25℃; 流速 0.9 mL/min; 流动相为甲醇: 0.2% 乙酸 = 50:50 (体积比); 检测波长: 277 nm; 进样量: 20 μL; 定量分析方法为外标法. 甲醇配制 1.0、5.0、10.0、15.0 和 20.0 mg/L 的邻苯二酚标准品. 水样经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 调 pH 至 4.0, 稀释至适当浓度.

2 结果与讨论

2.1 底物选择性分析

本研究按照功能基团, 将可能底物分成一元酚、多元酚、单氨基一元酚、甲氧基酚、多苯环酚类、一元胺、二元胺、双氨基双苯环苯胺类. 通过光谱分析表明, 苯酚、甲酚以及对苯基苯酚等一元酚基本都不能被漆酶氧化或是能氧化但反应速率极低, 不适合快速和低浓度检测; 苯胺和邻甲苯胺等一元胺也不能被催化氧化. 根据基团定位效应, 邻位和对位定位基的苯环上电子云密度高, 使苯环活化, 有给电子共轭效应, 易被氧化, 间位的苯环上电子云密度较低, 使苯环钝化, 有吸电子共轭效应和吸电子诱导效应, 所以二元酚的间苯二酚不能被催化氧化, 检测不到吸收峰. 其它酚类如对苯二酚、邻苯二酚、焦性没食子酸、2-氨基酚、4-氨基酚、DMP、邻甲氧基苯酚、甲氧基酚均能与漆酶快速反应. 从漆酶催化底物的基团来看, 底物主要带有多羟基或多氨基基团, 酶与底物的亲和力大小还与底物所带的侧链有关, 从测定结果来看, 侧链越多, 亲和力越大, 如漆酶对 DMP 的亲和力明显高于 2-甲氧基酚, 对邻联甲苯胺的亲和力也高于联苯胺.

2.2 检测分析方法

根据国家污水综合排放标准^[14], 苯胺的一、二、三级排放标准分别为 1.0、2.0、3.0 mg/L; 挥发酚的一、二、三级排放标准分别为 0.5、0.5、2.0 mg/L, 将检测范围确定为 0 ~ 10 mg/L 和 0 ~ 1 mg/L, 检测浓度梯度分别为 1 mg/L 和 0.1 mg/L. 每 3 mL 反应体系中

酶液终浓度分别为 0.033、0.050、0.083、0.117 和 0.167 mg/mL,其中含 0.033 和 0.050 mg/mL 酶液的反应体系中底物反应不灵敏或是检测不到线性,含 0.117 和 0.167 mg/mL 酶液的反应体系虽然反应速率稍有提升,但并不能大幅提高检测下限,最后确定

每 3 mL 反应体系中加入的酶液终浓度为 0.083 mg/mL (约 2.2 U 酶活),能得到较好的曲线.图 1 为对苯二胺分别在 460 nm 和 315 nm 以及 DMP 在 470 nm 吸光值下测得的反应速率,作出的浓度与反应速率关系图,求得线性拟合方程(图 1).

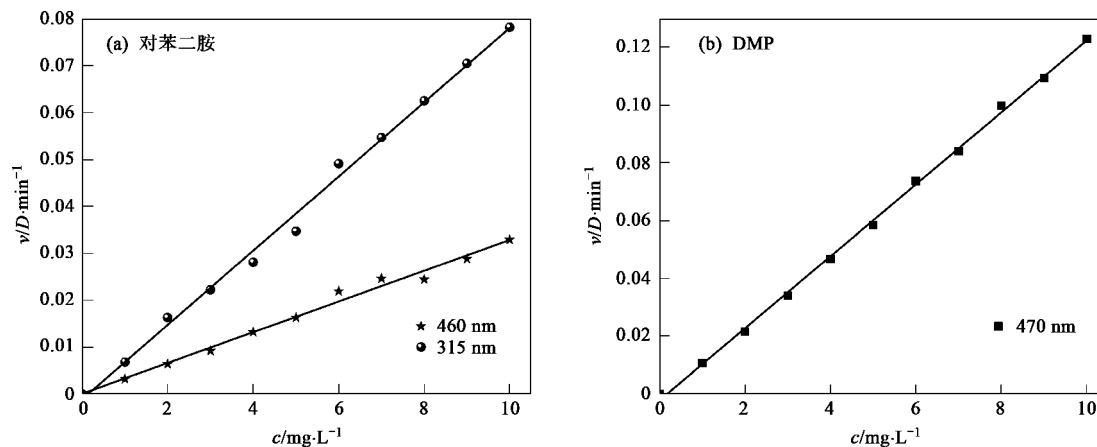


图 1 对苯二胺、DMP 浓度-反应速率标准曲线

Fig. 1 Calibration curve of the concentration-reaction rate of *p*-phenylenediamine and DMP

对苯二酚、4-氨基酚、DMP 都只测得一个吸光值下的浓度-反应速率标准曲线,相关系数都在 0.98 以上.邻苯二酚、焦性没食子酸、2-氨基酚、邻联甲苯胺、联苯胺、对苯二胺、邻苯二胺都分别在 2 个吸光值下测得标准曲线,除了联苯胺所得曲线可信度较低以外,其它曲线 R^2 值均在 0.96 以上,多个曲线

R^2 甚至达到了 0.99.邻甲氧基酚和联苯胺的工作线性范围的下限都只能达到 3 mg/L,其余的都达到了 1 mg/L.4-氨基酚和 DMP 的工作线性范围下限已达到了 0.2 mg/L.其它化合物的线性拟合方程、相关系数和线性范围见表 1.由于该漆酶比活较低 (8.85 U/mg),催化底物的能力有限,所测定的酚类

表 1 化合物的最适 pH、 K_m 、吸光值及浓度-速率线性方程

Table 1 Optimum pH, K_m , absorption wavelength and linear regression equation of concentration-reaction rate of compound

化合物	最适 pH	K_m /mmol·L ⁻¹	吸收波长 /nm	线性拟合方程: $Y = aX + b$ ¹⁾		相关系数 (R^2)	线性范围 /mg·L ⁻¹
				<i>a</i>	<i>b</i>		
对苯二酚	7.5	0.530 4	246	0.015 47	-0.001 86	0.991 4	10 ~ 0.7
邻苯二酚	7.0	0.505 4	390	0.008 81	0.003 21	0.984 9	10 ~ 1
			292	0.001 87	0.000 67	0.984 4	10 ~ 3
焦性没食子酸	6.5	0.500 1	315	0.008 08	-0.004 05	0.991 8	10 ~ 1
			242.5	0.009 58	-0.003 15	0.971 3	10 ~ 1
2-氨基酚	7.0	0.715 9	423	0.006 35	0.000 32	0.993 7	10 ~ 1
			247	0.004 33	0.001 39	0.983 3	10 ~ 1
4-氨基酚	7.0	9.273 8	254	0.013 45	0.009 06	0.983 1	10 ~ 0.2
DMP	7.5	0.557 4	470	0.012 48	-0.002 21	0.998 7	10 ~ 0.2
2-甲氧基酚	7.5	7.805 7	465	0.000 54	0.000 57	0.960 6	10 ~ 3
			420	0.000 53	-0.000 09	0.970 0	10 ~ 3
邻联甲苯胺	4.5	0.435 3	630	0.015 05	-0.008 94	0.986 0	10 ~ 1
			366	0.021 50	-0.004 50	0.978 3	10 ~ 1
联苯胺	4.5	2.855 8	605	0.004 47	-0.006 81	0.917 6	10 ~ 3
			355	0.007 61	-0.010 22	0.911 6	10 ~ 3
对苯二胺	5.0	1.059 6	460	0.003 28	0.000 06	0.988 9	10 ~ 1
			315	0.007 91	-0.001 10	0.994 9	10 ~ 1
邻苯二胺	4.5	1.044 1	445	0.001 17	0.000 61	0.994 2	10 ~ 1
			260	0.002 22	0.003 00	0.960 4	10 ~ 1

1) Y: 反应速率 ($D \cdot \min^{-1}$), X: 化合物浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

线性范围大部分都难以达到国家的一、二、三级排放标准. 国家污水综合排放标准中的酚类污染物主要是针对挥发性酚类, 如苯酚、甲酚等低沸点酚, 作者筛选出的漆酶底物主要以非挥发酚类为主, 可以用来作为检测非挥发酚的一种补充或参考.

2.3 底物的特征吸收峰分析

具有明显催化反应的底物如表 1 所示, 这些底物在紫外-可见光谱区有多个吸收峰, 少数只有一个吸收峰 (多次扫描吸收峰最大波长值偏差不得超过 ± 5 nm, $\lambda_{\max 1}$ 定义为吸收峰明显较长波长吸收值, $\lambda_{\max 2}$ 为峰值明显较短波长吸收值). 多个吸收峰主要是由于底物氧化所生成产物的复杂性所造成的, 如苯二酚在氧化成醌类的过程中先与自由基作用生成稳定的半醌, 而后半醌又能与自由基作用形成醌, 等量的苯二酚和苯醌又能生成分子间传荷配合物醌氢醌. 通过光谱扫描, 存在多个吸收峰的去稳定, 不适合作标准曲线的吸收峰. 在峰形方面, 邻联甲苯胺扫描出 3 个主吸收峰, 其最大吸收波长是 860、630 和 366 nm, 联苯胺扫描出的 3 个主吸收峰最大吸收波长依次是 800、605 和 360 nm, 两者峰形极其相似, 联苯胺峰值整体前移, 可能是由于邻联甲苯胺在苯环上多出 2 个甲基取代基导致生色团的吸收峰向长波长移动^[15].

2.4 pH 对漆酶催化速率的影响

在不同 pH 条件下, 采用 $\lambda_{\max 1}$ 和 $\lambda_{\max 2}$ 两吸收值测定酶催化底物的反应速率, 如图 2 (均是 $\lambda_{\max 1}$ 下所测值), 酚类最适反应 pH 均偏中性, 在 6.5 ~ 7.5 之间, 与康从宝等^[16]和吴涓等^[17]所报道的最适 pH 3.0 ~ 5.5 不同, 主要是由于所用的酶源不同所致; 苯胺类最适 pH 偏酸性, 除了对苯二胺在 pH 5.0 反应速率最高以外, 其它 3 种苯胺类均在 pH 4.5 下有最高活性. 由于酚类和苯胺类所带基团不同, 最适 pH 相差较大, 苯胺类所带的氨基偏碱性, 在酸性条件下更易被催化氧化, 而酚类偏酸性, 在偏碱性条件下更易被氧化, 这与实验过程中偏中性的酚类溶液在空气中更易被氧化变色所观察的现象一致.

2.5 K_m 值

K_m 值均是在该底物的最适 pH 下, 加入等体积的酶液, 常温下检测 5 个不同浓度的底物溶液, 以 $\lambda_{\max 1}$ 的前 3 min 吸光值变化作为反应速率, 以此作出底物浓度与反应速率的 Lineweaver-Burk 双倒数图, 求出 K_m 值, 结果如表 1, 所测结果的 R^2 值均在 0.99 以上, 从中可知, 各底物所测 K_m 值相差不大, 在一个数量级内. 从测定结果来看, K_m 值越小, 酶与

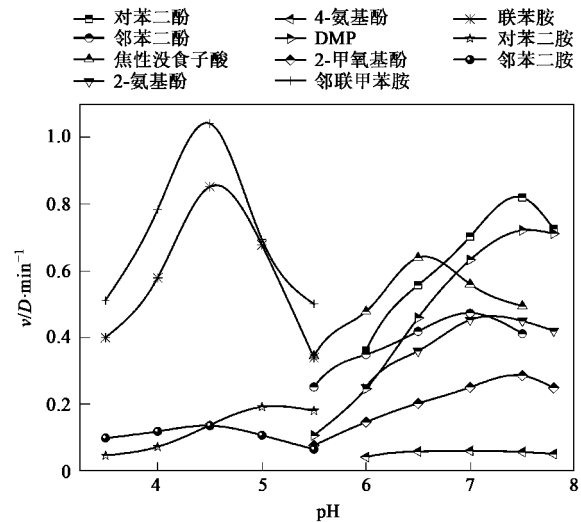


图 2 不同 pH 值下漆酶催化底物的反应速率

Fig. 2 Reaction rate of laccase catalyse substrate in different pH

底物的亲和力越大, 催化效率愈高, 反应更为灵敏, 用酶检测该底物浓度下限会越低.

2.6 样品分析

3 种焦化废水分别来自 A 厂原水、B 厂原水和 B 厂处理水, 水样加入酶液光谱扫描, 均在 292 nm 左右有特定的吸收峰, 与漆酶催化氧化邻苯二酚的特征吸收峰一致, 据报道^[18], 焦化废水中酚类主要以苯酚、邻苯二酚、间苯二酚等酚类为主. HPLC 检出废水中邻苯二酚含量分别为 235.6、322.3 和 194.7 mg/L, 回收率在 97.0% ~ 98.5% 之间; 利用漆酶检出 3 种原水中邻苯二酚的含量分别为 190.5、265.8 和 155.3 mg/L, 回收率在 91.9% ~ 115.8% 之间, 相对 HPLC 的偏差 $\leq 20.3\%$ (见表 2). 相对偏差均在 20% 左右, 说明 3 种焦化废水中化合物的成分大致相同. 较高的偏差主要是由于废水中化合物成分复杂, 其中某些金属离子和有机化合物能够对酶催化产生抑制作用甚至使酶变性降低反应速率, 酶催化的中间产物和最终产物与废水中其它有机化合物相互作用也能影响实验结果的准确性.

表 2 焦化废水邻苯二酚含量

Table 2 Concentration of catechol in coking wastewater

水样	HPLC		漆酶		相对偏差 /%
	含量 /mg·L ⁻¹	回收率 /%	含量 /mg·L ⁻¹	回收率 /%	
A 厂原水	235.6	97.0	190.5	91.9	19.1
B 厂原水	322.3	98.2	265.8	109.5	17.5
B 厂处理水	194.7	98.5	155.3	115.8	20.3

3 结论

(1) 漆酶能够催化氧化的苯胺和酚类化合物主要以多氨基苯胺类和多羟基酚类为主;催化底物会产生多个特征吸收峰;漆酶催化苯胺类化合物的最适 pH 偏酸性,催化酚类化合物的最适 pH 近中性。

(2) 分光光度法测定漆酶催化酚类和苯胺类化合物的反应速率,根据底物浓度与反应速率的标准曲线分析,除联苯胺外,均得到了较好的一级反应动力学线性关系。

(3) 分光光度测定废水中邻苯二酚操作简单,线性关系良好,能够对含酚废水中邻苯二酚进行定性和半定量分析,对废水中酚类含量检测起到快速筛查作用。

参考文献:

- [1] Alexandre G, Zhulin I B. Laccases are wide spread in bacteria [J]. Trends Biotechnol, 2000, **18** (2): 41-42.
- [2] Baldrian P. Fungal laccases-occurrence and properties [J]. FEMS Microbiol Rev, 2006, **30** (2): 215-242.
- [3] Giardina P, Faraco V, Pezzella C, et al. Laccases: a never-ending story [J]. Cell Mol Life Sci, 2010, **67** (3): 369-385.
- [4] Baipai P. Application of enzymes in the pulp and paper industry [J]. Biotechnol Prog, 1999, **15** (2): 147-157.
- [5] Minussi R C, Pastore G M, Duran N. Potential applications of laccase in the food industry [J]. Food Sci Technol, 2002, **13**: 205-216.
- [6] Khammuang S, Sarnthima R. Mediator-assisted rhodamine B decolorization by *Trametes versicolor* laccase [J]. Pak J Biol Sci, 2009, **12**(8): 616-623.
- [7] 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.
- [8] Kulys J, Vidziunaite R. Laccase based synergistic electrocatalytic system [J]. Electroanalysis, 2009, **21** (20): 2228-2233.
- [9] Saha B, Taylor K E, Bewtra J K, et al. Laccase-catalyzed removal of diphenylamine from synthetic wastewater [J]. Water Environ Res, 2008, **80** (11): 2118-2124.
- [10] 胡秋芬, 杨光宇, 黄章杰, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定水中酚类物质 [J]. 分析化学, 2002, **30**(5): 560-563.
- [11] Bagheri H, Saber A, Mousavi S R. Immersed solvent microextraction of phenol and chlorophenols from water samples followed by gas chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2004, **1046** (1-2): 27-33.
- [12] 章毅, 曾光明, 汤琳, 等. 基于磁性纳米粒子固定技术的漆酶传感器用于垃圾堆肥中邻苯二酚的检测 [J]. 环境科学, 2007, **28**(10): 2320-2325.
- [13] 黄俊, 王军涛, 李斌, 等. 新型有机-无机纳米复合粒子的制备及其固定化漆酶研究 [J]. 高等学校化学学报, 2006, **27**: 2088-2091.
- [14] GB 8978-1996, 污水综合排放标准 [S].
- [15] 赵瑶兴, 孙祥玉. 有机分子结构光谱鉴定 [M]. 北京: 科学出版社, 2003. 72-76.
- [16] 康从宝, 刘巧, 李清心, 等. 白腐菌产漆酶的纯化及部分酶学性质 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, **18**(5): 638-642.
- [17] 吴涓, 肖亚中, 王怡平, 等. 蜜环菌胞外漆酶活力的分光光度法测定 [J]. 厦门大学学报, 2001, **40**(4): 893-898.
- [18] 赵建夫. 焦化废水中有机物生物降解性能的研究 [D]. 北京: 清华大学, 1989.