

固定化酪氨酸酶去除水中 酚及胺类物质的研究^{*}

安林坤¹, 马 林¹, 全军民¹, 黄仲立², 古练权¹

(1. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275; 2. 中山大学测试中心)

摘 要: 探讨了一种以酶处理含酚废水的方法. 将酪氨酸酶固定化到疏水基团修饰的琼脂珠上, 蛋白吸附率和酶活力回收分别达到了 90% 和 80%. 经过固定化酪氨酸酶的处理, 水溶液中的酚类物质被氧化, 最终生成棕色或黑色沉淀, 因而很容易去除. 并且, 溶液中的胺类化合物和酚的氧化产物聚合生成棕色沉淀而被除去. 酚类化合物的去除速度为: 邻苯二酚> 对甲苯酚> 对氯苯酚> 苯酚> 对甲氧基苯酚.

关键词: 酪氨酸酶; 固定化; 废水处理

中图分类号: Q558 **文献标识码:** A

芳香族化合物, 包括酚类物质, 广泛存在于工业废水中^[1]. 酚类化合物都是有毒物质, 有些还是致癌物质, 对人、畜和农作物都有危害. 因此从工业废水中除去酚类物质越来越受到人们的关注. 我国规定^[2], 地面水中酚类化合物最高允许浓度为 0.01 mg/L. 由于传统方法处理酚类化合物的浓度有限, 而且处理成本高、净化不完全、以及产生有毒的副产物. 因此这就要求发展一种更加快速、便捷、廉价、没有有毒副产物产生的处理方法^[3]. 酪氨酸酶 (EC 1.14.18.1), 又称多酚氧化酶^[1], 广泛存在于动物、植物与微生物体内. 它可以催化氧化单酚化合物→邻苯二酚类化合物→醌类化合物 (图 1), 后者在水溶液中不稳定, 经一系列酶催化和非酶催化反应, 自身聚合或与其他物质 (有机胺类化合物等) 聚合反应形成不溶于水的大分子物质而沉淀^[4].

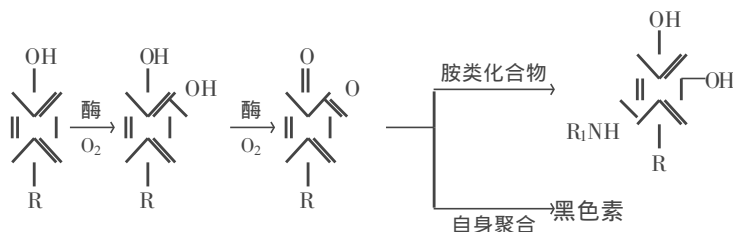


图 1 酪氨酸酶催化机理

Fig 1 Catalytic mechanism of tyrosinase

本研究从马铃薯中提取粗制的酪氨酸酶, 将其固定化到疏水基团修饰的琼脂珠载体上. 由于在马铃薯淀粉加工工业, 含有酪氨酸酶的溶液作为一种废弃物被处理掉, 因此,

^{*} 基金项目: 广州市科学基金资助项目 (980448249)

收稿日期: 1999-11-24; 作者简介: 安林坤 (1973 年), 男, 博士研究生.

采用马铃薯作为酪氨酸酶源可以废物利用，大大降低处理成本。利用固定化酶处理含有酚类化合物以及含有酚胺混合物的水溶液。结果表明，固定化酶能够很好地催化氧化水溶液中的酚类物质，从而达到从水中除去有毒的酚类化合物的目的，同时还可以除去水溶液中的胺类化合物。

1 材料与方法

1.1 材 料

马铃薯为市售新鲜产品。邻苯二酚（AR）购自上海试剂三厂。其它酚类及胺类试剂均为市售分析纯，试剂实验前未经纯化。

1.2 方 法

利用磷酸盐缓冲液从马铃薯中提取酪氨酸酶，并且采用疏水吸附法固定化酪氨酸酶^[5, 6]。本研究采用酶活力的相对值^[7, 8]，即以邻苯二酚为底物，测定 λ 为 390 nm（UV-160A, Shimadzu）处吸光度随时间变化的增加值（ $\Delta A/t$ ）。

固定化酪氨酸酶与酚及与酚和胺的混合液的反应：取一定量的固定化酶悬浮于磷酸盐缓冲溶液（pH 6.0, 0.1 mol/L）中，加入计算量的酚溶液（或酚溶液和芳香胺混合溶液），室温振荡培养一定时间，用 HPLC 测定溶液中酚（或酚和胺）的浓度。

2 结 果

2.1 各种疏水基团修饰的载体吸附酶的能力

根据酪氨酸酶分子表面性质，选择了不同的疏水基团修饰的载体固定化酪氨酸酶，以每克载体加入 28.5 ng 酶，悬浮于 6 mL 缓冲溶液中培养；磷酸盐缓冲溶液 pH 为 6.0, 0.1 mol/L；温度为 25℃；培养时间为 5 h，所得实验结果见表 1。

表 1 各种疏水基团修饰的载体对固定化酶性能的影响

Tab 1 Effect of the carriers with different hydrophobic groups on the adsorption of tyrosinase

疏水基团	α -萘胺	苯胺	苄胺	邻甲苯胺	正辛胺
蛋白吸附率/%	100	100	100	54.5	89.2
活力回收/%	47.3	83.7	85.6	17.8	44.3

从表 1 中可以得出，苯胺和苄胺修饰的琼脂珠载体对酪氨酸酶的吸附率高达 100%，固定化后的酶活力回收超过了 80%。本实验选用苄胺为修饰剂。

2.2 加酶量对固定化酪氨酸酶活力的影响

图 2 结果显示了加酶量对固定化酶活力的影响。由图 2 可知，苄胺修饰的琼脂珠载体，当其每克载体加酶量为 40~45 mg 时，固定化酶的比活力最高。而且，此时的蛋白吸附率也达到了 90% 以上。当加入的酶量超过 45 mg/g 载体时，固定化酶的活力反而下降。可认为当琼脂珠上吸附过多的酶时，酶在载体表面发生重叠，而相互形成空间位阻效应，致使酶与底物结合速率以及酶与产物的脱离速率下降，表现为固定化酶活力降低。

2.3 pH 值对酪氨酸酶活力的影响

酶存在于生物体中，具有很高的催化活性，但是它对于所处的微环境也有很高的要

求。例如溶液的酸碱性对于酶的活力具有很大的影响。测试了在不同的 pH 值条件下，液相以及固定化酪氨酸酶的相对活力，结果如图 3。由图 3 可知，溶液的 pH 值对液相和固定化酶的活力有相同的影响，当溶液的 pH 值为 6.0 时 2 种形式的酪氨酸酶的相对活力最高，溶液的 pH 值无论大于还是小于 6.0，酶活力都会显著降低，而且固定化酶活力下降速率更大。因此酪氨酸酶溶液的最佳 pH 为 6.0。由于一般的工业含酚废水大多呈偏酸性，因此有利于用酪氨酸酶进行处理。

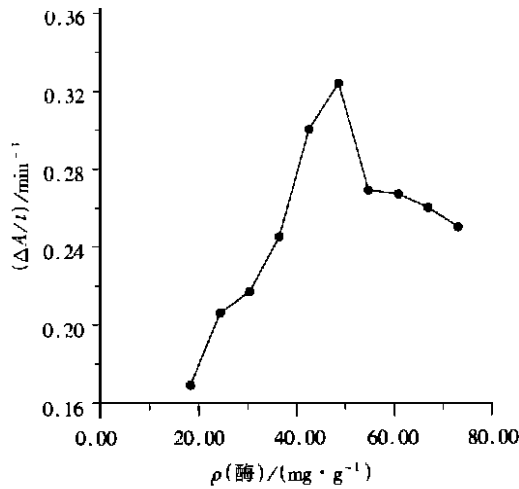


图 2 加酶量对固定化酶活力的影响

Fig.2 Effect of amount of added enzyme on activity of immobilized enzyme

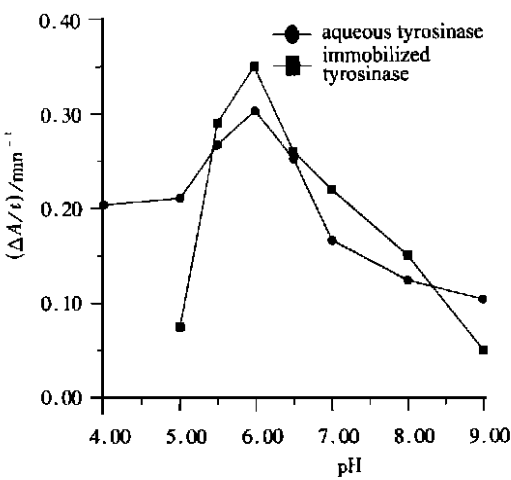


图 3 pH 值对酶活力的影响

Fig.3 Effect of pH on enzymes

2.4 固定化酪氨酸酶除酚能力

图 4 显示了固定化酶对不同底物的处理结果。结果表明：固定化酪氨酸酶处理不同酚类化合物的能力是不同的，处理效果为：邻苯二酚> 对甲苯酚> 对氯苯酚> 苯酚> 对甲氧基苯酚。

2.5 固定化酶处理酚和胺混合物的能力

固定化酶单独处理芳香胺，如苯胺和邻甲苯胺，1 h 后未发现芳香胺浓度的减少。但是，如果将芳香胺和苯酚混合，用固定化酶处理，70 min 后用 HPLC 检测不到芳香胺的存在（图 5）。芳香胺之所以能够被除去，可认为是因为芳香胺与苯酚发生了生物氧化—迈克尔加成反应^[9]。而且 1 个分子的苯酚可与 2 个分子的芳香胺发生反应，因此，芳香胺的除去速度大于苯酚。

2.6 使用次数对固定化酶活力的影响

酪氨酸酶被固定化到疏水基团修饰的琼脂珠载体上，可以多次使用。通过每次使用 20 g 固定化酶（45 mg/g），0.1 mol/L 邻苯二酚溶液 100 mL，每次处理时间为 20 min 后，得固定化酶在重复 1~5 次后，其活力在前 3 次都能保持在 100.0%，而在使用到第 4 和第 5 次后活力稍有下降，分别为 96.7%和 92.4%。可见，重复使用 5 次仍能保持很高的处理能力，其活力仍保持在 90%以上。

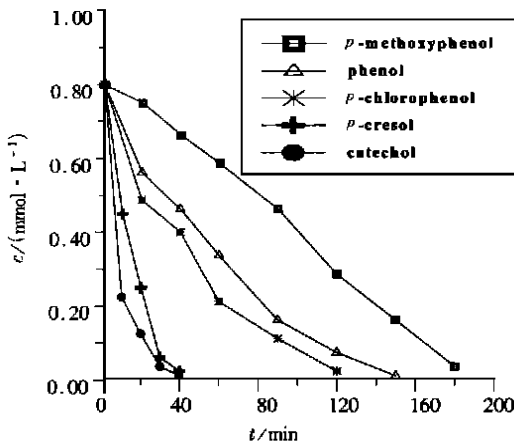


图 4 固定化酶处理不同酚类化合物的能力

Fig.4 Removal of phenols from aqueous solution with immobilized enzyme

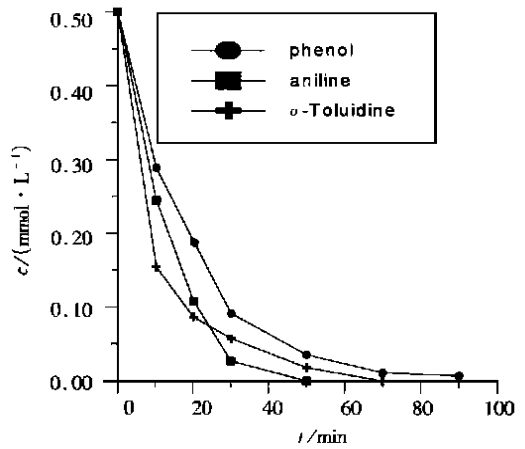


图 5 固定化酶处理苯酚和胺混合液的能力

Fig.5 Removal of phenol and amines from aqueous solution with immobilized enzyme

3 讨 论

在本实验中，使用从马铃薯中提取的酪氨酸酶，然后将其固定化到廉价易得的琼脂珠载体上，酶固定化后的活力回收超过了 80%，而且固定化方法简单易行，大大降低了固定化酶的成本。酚类化合物溶液以及苯酚和胺类化合物的混合液经过固定化酶的处理后，溶液静置，都有棕色沉淀生成。该沉淀是由于酚类化合物被催化氧化成邻苯醌类化合物，而后邻苯醌类化合物自身聚合或与胺类化合物聚合而成。

总之，我们研究出了一种酶固定化方法，蛋白吸附率和酶活力回收分别达到了 90% 和 80%，固定化酶能够有效地催化氧化水溶液中的酚类化合物，而后氧化产物自身聚合或其他化合物聚合，生成不溶于水的沉淀，沉淀可经过滤除去，从而达到净化水的目的。尤其是工业废水中大都含有多种有机物（如有机胺），并且，胺与苯酚能够发生生物氧化—迈克尔加成反应，从而加快了处理速度，使得该固定化酶具有更宽的底物范围。由于能获得廉价的酶源（马铃薯淀粉工业的废弃液含有大量的酪氨酸酶）以及固定化载体廉价、易得，因此有望投入工业生产。

参考文献:

- [1] ATLOW S C, BONADONNA-APORO L, KLIBANOV A M. Dephenolization of industrial wastewater catalyzed by polyphenol oxidase[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1984 26: 599~ 603.
- [2] 郭安然, 唐森本. 环境检测[M]. 北京: 冶金工业出版社, 1988. 197.
- [3] KARAM J, NICELL J A. Potential application of enzymes in waste treatment[J]. J Chem Tech Biotechnol, 1997, 69: 141~ 153.
- [4] WALSH C. Enzymatic reaction mechanisms[M]. San Francisco: W. H. Freeman, 1979. 461~ 463.
- [5] 程玉华, 于振宝, 马林. 疏水性载体及固定化酶的制备方法[J]. CA1031564A, 1978.
- [6] 马林, 于振宝, 程玉华, 等. 疏水吸附固定化天冬氨酸酶及其性质的研究[J]. 生物化学杂志, 1991, 7 (6): 671~ 678.

- [7] ZHEN Y, ROBB D A. Comparison of tyrosinase activity and stability in aqueous and nearly nonaqueous environments[J]. Enzyme Microb Technol, 1993(15): 1030 ~ 1036.
- [8] ROS J R, RODRIGUEZ-LOPEZ J N, GARCIA-CANOVAS F. Effect of *L*-ascorbic acid on the monophenolase activity of tyrosinase[J]. Biochem J, 1993, 295: 309 ~ 312.
- [9] 张小春, 黄志纾, 古练权, 等. 一步法合成取代-1, 2-苯醌类化合物[J]. 有机化学, 1999, 19: 200 ~ 203.

Research of Removal of Phenols and Amines in Aqueous Solution by Immobilized Tyrosinase

AN Lin-kun^{}, MA Lin, QUAN Jun-min, HUANG Zhong-li, GU Lian-quan*

Abstract: An enzymatic method for removal of phenols from wastewater was investigated. Tyrosinase was immobilized on agar gel decorated by hydrophobic groups, and the yield of adsorbed protein and activity remaining is over 90% and 80% respectively. Phenols in wastewater were removed after treatment with potato *Tyrosinase* immobilized on N-alkyl-agar bead, and brown or dark precipitate was formed. Amines polymerize with the oxidized products of phenol into brown precipitate in the solution and would be removed. The removal rate of substituted phenols is catechol > *p*-cresol > *p*-chlorophenol > phenol > *p*-methoxyphenol.

Keywords: tyrosinase; immobilization; treatment of wastewater

^{*} School of Chemistry and Chemical Engineering, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China