

坡缕石粘土固定辣根过氧化酶处理硝基酚废水

舒林, 彭书传, 刘海波, 鲍腾, 刘文静

(合肥工业大学 资源与环境工程学院, 安徽 合肥 230009)

摘要:以坡缕石粘土、淀粉、水玻璃为原料,研究了固定化酶载体的制备工艺,探究了固定化酶载体在辣根过氧化酶(HRP)降解硝基酚废水中的作用,并探讨了反应时间、酶浓度、 H_2O_2 及硝基酚浓度对降解效果的影响。结果表明,固定化酶载体的最佳制备工艺为:水玻璃12%,淀粉20%,煅烧温度 $550^\circ C$,煅烧时间2h,固定化酶对硝基酚的去除效果明显高于原酶,固定化酶去除水中硝基酚的最佳反应条件为:反应时间1.5h,加酶量150U, H_2O_2 浓度0.12%,硝基酚浓度100mg/L,固定化酶重复使用7次后对硝基酚的去除率仍高于60%。

关键词:坡缕石粘土,硝基酚废水,固定化辣根过氧化酶,去除率

中图分类号:P579;X78

文献标识码:A

文章编号:1000-6524(2011)06-1063-06

The treatment of nitrophenol wastewater by horseradish peroxidase immobilized on palygorskite-based material

SHU Lin, PENG Shu-chuan, LIU Hai-bo, BAO Teng and LIU Wen-jing

(School of Resources & Environmental Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: In this paper, the preparation technology of palygorskite-based compound material with palygorskite, starch, soluble glass was investigated, and the role of the compound material in the treatment of nitrophenol wastewater was studied. In addition, the effects of reaction time, addition amount of enzyme, H_2O_2 concentration and nitrophenol concentration on the removal of nitrophenol in wastewater by immobilized HRP was analyzed. The results showed that the optimal preparation conditions of palygorskite-based compound material were soluble glass 12%, starch 20%, calcination temperature $550^\circ C$ and calcination time 2 h. What is more important, the nitrophenol removal rate with immobilized HRP was higher than the original HRP. The optimal reaction conditions of removal of nitrophenol by immobilized HRP were reaction time 1.5 h, HRP 150 U, H_2O_2 concentration 0.12%, and nitrophenol concentration 100 mg/L. The nitrophenol removal rate was still above 60% when immobilized HRP was used for 7 times.

Key words: palygorskite clay; nitrophenol wastewater; immobilized HRP; removal rate

硝基酚作为原料和中间物被广泛应用于火药、药物、杀虫剂、色素、染料、木材、防腐剂、橡胶等化学工业中,是废水中常见的有机污染物,其中硝基为吸电子基,可使苯环上的电子云密度大大下降,使氧化的亲电子攻击大大受阻,造成在自然界中较难降解,且具有“三致”作用(黄卫红等,2010)。因此,硝基酚

废水的处理越来越受到国内外学者的关注。

目前含酚废水的治理技术有物化法(Throop and William,1975)、化学法(Lanouette,1977)和生物法(Klein and Lee,1978),但是这些方法依然存在成本较高、效率低、净化不彻底、造成二次污染等缺点,而生物酶技术则克服了这些缺点。自Klibanov(Klibanov

收稿日期:2011-07-30;修订日期:2011-09-01

基金项目:教育厅安徽高校省级自然科学研究重点项目(KJ2010A060)、安徽省科技成果转化基金项目(1104b0303023)

作者简介:舒林(1982-),男,在读硕士研究生,环境工程专业,E-mail:shu_lin9@163.com;通讯作者:彭书传(1964-),男,教授,研究方向为水污染控制技术,E-mail:scpeng@vip.sina.com

et al., 1980, 1981)等首次将辣根过氧化酶(HRP)用于处理含酚废水,并证实其可以高效、专一地催化降解酚类化合物开始,该技术得到了深入的研究和发展。其后为了克服原酶稳定性差、易失活、无法重复使用(Zhang and Nicell, 2000; 叶鹏, 2004)等问题, Tatsumi等(1996)和Song等(2003)等采用酶固定化技术分别以磁铁矿粉和邻苯二甲酸酐为载体材料吸附固定HRP催化降解氯酚类化合物;叶鹏等(2005)和李勤等(1999)等分别研究了聚丙烯酰胺和 Fe_3O_4 固定HRP的吸附特性和稳定性,并将其用于含酚类废水的处理;王杉霖等(2006)和宗悦茹等(2007)等将 Fe_3O_4 吸附包埋法所制备的固定化HRP用于水中五氯酚的催化去除,重复操作6次后去除率分别约为40%和46%。

固定化酶的性能主要取决于固定化方法和所使用的载体材料。其中,载体材料的性能直接影响固定化酶的催化活性。理想的载体材料应具备良好的机械强度、热稳定性、化学稳定性和较好的生物相容性等(姜建春等, 2010)。本研究以坡缕石粘土为主要原料,水玻璃为粘结剂,淀粉为造孔剂,制备载体颗粒,并利用硅烷偶联剂对其进行改性,从而得到改性的坡缕石基多孔材料。再通过载体材料吸附固定辣根过氧化酶技术进行硝基酚废水处理研究,以实现酶的重复利用。

1 实验部分

1.1 材料制备

实验所用坡缕石粘土(安徽省明光市官山坡缕石粘土矿)经挤压、剪切、粉碎处理,得到粒度为200目的粉体备用。将坡缕石粘土、水玻璃(4%~12%)和淀粉(20%~40%)按一定比例均匀混合,加水搅拌制成直径约1~3 mm的球形颗粒,放入恒温干燥箱中于105℃下干燥24 h。将颗粒放入马弗炉中,在一定温度(450~550℃)下煅烧2~4 h,自然冷却至室温。所制备的颗粒用2 mol/L盐酸在90℃水浴中活化2 h,用去离子水冲洗7~8次后,在105℃烘箱中干燥5 h,冷却至室温,放入硅胶干燥器内保存待用。

向体积比为1:1的乙醇-水混合溶液中滴加醋酸缓冲液,调节pH值至3.5~4。取一定质量的上述溶液,加入硅烷偶联剂KH-570,配制成质量分数为0.2%的KH-570改性液。将活化后的载体颗粒约200 mg放至30 mL改性液中,封口,置于30℃摇

床中,以100 r/min振荡5 h后,依次用无水乙醇和蒸馏水清洗3~4次,放入105℃烘箱中干燥8 h,冷却至室温,放入干燥器中保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 固定化酶的制备

取一定质量改性后的载体颗粒(单位活度载体量为2.0 mg/U),将其放入pH值为5的HRP(250 U/mg,上海源聚生物科技有限公司)磷酸缓冲溶液,于摇床中以100 r/min振荡1.5 h,过滤分离,用蒸馏水冲洗载体5~6次,置于4℃冰箱中储存备用。过滤液和冲洗液混合成剩余酶液,测定剩余酶液的浓度,计算出固定在载体材料上的HRP的酶活。

1.2.2 酶活性的评价

取25 mL硝基酚溶液,加入2 mL磷酸盐缓冲液,再分别加入0.12% H_2O_2 和适量的固定化辣根过氧化酶。混合后室温下振荡反应1.5 h,将反应液在4 000 r/min的速度下离心5 min,取清液5 mL测定其中硝基酚残留量。每次测定硝基酚残留量之后,固定化酶用pH值为5.0的磷酸盐缓冲溶液反复冲洗2~3次。固定酶密封保存,反复使用。

利用紫外分光光度法(刘国杰等, 2006)检测水中对硝基酚浓度。

2 结果与讨论

2.1 载体制备工艺条件的优化

影响坡缕石粘土基复合材料制备工艺的条件很多,但最主要的因素是水玻璃和淀粉的加入量以及煅烧温度和时间,采用 $L_9(3^4)$ 正交实验,考察4个因素的影响,对载体颗粒的合成工艺进行探讨,用散失率对其评价。散失率是指单位时间内载体颗粒在水中的溃散部分质量与原载体颗粒质量的百分比,它是对载体材料的机械强度、耐水性能等特性的重要评价指标之一,具体测试方法及步骤参考孙秀云等(2003)的研究。正交实验结果见表1,从中可以看出,通过散失率确定的最佳复合材料制备工艺条件为 $A_3B_1C_3D_1$,即水玻璃加入量12%,淀粉加入量20%,煅烧温度550℃,煅烧时间2 h,这样合成的复合材料颗粒的散失率最低。从实验数据还可以看出,煅烧温度对载体颗粒散失率影响最为显著。

2.2 固定化酶对硝基酚的去除作用

2.2.1 反应时间对硝基酚去除率的影响

反应条件为废水量25 mL,硝基酚浓度100 mg/

表 1 正交实验及极差分析结果

Table 1 Results of orthogonal experiment and R-analysis

实验号	因素				散失率 / %
	水玻璃加入量 / %	淀粉加入量 / %	煅烧温度 / °C	煅烧时间 / %	
1	4	20	450	2	4.60
2	4	30	500	3	3.90
3	4	40	550	4	2.40
4	8	20	500	4	3.10
5	8	30	550	2	1.50
6	8	40	450	3	5.90
7	12	20	550	3	1.10
8	12	30	450	4	4.80
9	12	40	500	2	2.70
k ₁	10.90	8.80	15.30	8.80	
k ₂	10.50	10.20	9.70	10.90	
k ₃	8.60	11.00	5.00	10.3	
K ₁	3.63	2.93	5.10	2.93	
K ₂	3.50	3.40	3.23	3.63	
K ₃	2.87	3.67	1.67	3.43	
极差 R	0.76	0.74	3.43	0.70	
主次顺序	C>A>B>D				
优水平	A ₃	B ₁	C ₃	D ₁	
优组合	A ₃ B ₁ C ₃ D ₁				

L 缓冲液的量 2.0 mL 加酶量 150 U, H₂O₂ 加入浓度 0.12 %, 温度 25 °C, 反应时间分别控制为 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0 h 进行振荡反应, 固定化酶对硝基酚催化去除率为固定化酶对硝基酚总去除率减去载体对硝基酚吸附去除率, 结果如图 1 所示。由图 1 可知, 在载体吸附去除硝基酚的实验过程中, 硝基酚的去除率较低, 经过 0.5 h 后, 硝基酚的去除率仅达到 12.8 %, 且当 1.5 h 后反有下降趋势, 分析可能是由于吸附量已经趋于饱和, 随着接触时间的延长, 原来吸附在载体颗粒表面的硝基酚不稳定, 又

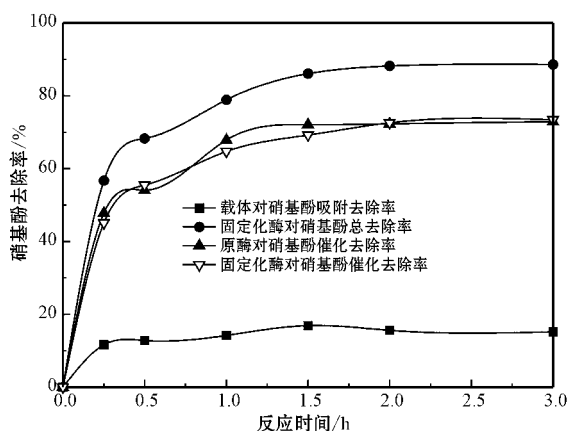


图 1 反应时间对原酶和固定化酶去除硝基酚的影响
Fig. 1 Effect of reaction time on nitrophenol removal by original and immobilized HRP

解析出来(聂锦旭等 2006)。而加入酶物质后, 硝基酚的去除率大大提高, 在 1 h 内, 原酶对硝基酚的去除率达到 67.9 %, 固定化酶对硝基酚的总去除率和催化去除率分别达到 78.9 % 和 64.7 %。同时固定化酶和原酶对硝基酚的催化去除率曲线基本一致, 表明酶的固定化并没有削弱 HRP 对硝基酚的催化降解作用。

2.2.2 加酶量对硝基酚去除率的影响

加酶量分别控制为 0、50、100、150、200、250 U, 反应时间 1.5 h, 其他实验条件同上。实验结果(图 2)表明, 在不加入 HRP 时, 硝基酚的去除率仅为 4.9 %, 说明 HRP 在反应过程中起催化作用(Zhang and Nicell, 2000)。对于原酶和固定化酶, 当酶浓度小于 150 U 时, 硝基酚去除率上升较快, 在加酶量大于 150 U 时, 硝基酚的去除率增长缓慢。原因一方面随着硝基酚去除率的不断增加, 底物和 H₂O₂ 浓度降低而产物浓度增加, 不利于反应的进一步进行; 另一方面反应产物会与酶结合占据酶的活性中心, 使得酶易被包裹从溶液中沉淀出来, 从而使酶丧失活性(马秀玲等, 2003)。同时在加酶量分别为 50、150 和 250 U 时, 固定化酶比原酶对硝基酚的去除率分别高出 26.7 %、13.6 % 和 14.2 %, 可知在低加酶量的情况下固定化 HRP 的处理效果明显高于原酶, 可能是由于固定化后载体的存在削弱了产物与酶的结合能力, 反应物能与酶充分的结合, 这使得在相同的硝基酚去除率的情况下载体固定化对 HRP 用量更少。

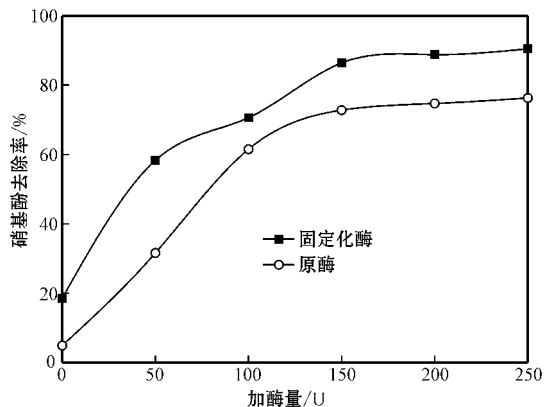


图 2 加酶量对原酶和固定化酶去除硝基酚的影响
Fig. 2 Effect of HRP quantity on nitrophenol removal by original and immobilized HRP

2.2.3 H_2O_2 浓度对固定化酶处理硝基酚废水的影响

H_2O_2 加入浓度分别控制在 0、0.03、0.06、0.12、0.24 和 0.48%，其他条件同上，反应时间为 1.5 h，结果如图 3 所示。由图 3 可见，在 H_2O_2 加入浓度较低（0.06% 以下）情况下，原酶和固定化酶对硝基酚的去除率都会随着 H_2O_2 浓度的增加而迅速增大，当 H_2O_2 浓度达到 0.12% 后两者对硝基酚总的去除率出现下降趋势，分析其原因应该与高浓度 H_2O_2 对酶的抑制作用有关（李勤等，1999）。且两条曲线的变化趋势大体一致，最佳的 H_2O_2 浓度均为 0.12%，由此可知，HRP 的固定化不会导致最佳 H_2O_2 用量发生变化。

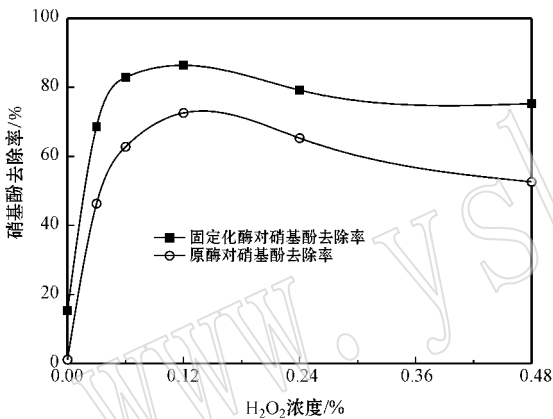


图 3 H_2O_2 浓度对原酶和固定化酶去除硝基酚的影响

Fig. 3 Effect of concentration of H_2O_2 on nitrophenol removal by original and immobilized HRP

从图 3 还可以看出，在 H_2O_2 浓度大于 0.12% 时，固定化酶的下降趋势要比原酶缓和，说明 H_2O_2 对固定化酶的抑制作用要比原酶小，这可能与液体在载体中的传质阻力有关，从而使得载体内部 H_2O_2 浓度呈阶梯状分布，进而削弱了 H_2O_2 对酶的抑制作用。

2.2.4 硝基酚初始浓度对固定化酶处理硝基酚废水的影响

实验中硝基酚的初始浓度分别控制在 10、25、50、100、200、300、400、500、600、700 mg/L，其他条件同上，反应时间 1.5 h，结果如图 4 所示。由图 4 可见，原酶和固定化酶对硝基酚的去除率都随着硝基酚浓度的增加逐渐下降，当硝基酚浓度为 100 mg/L 时，固定化酶对硝基酚的去除率接近 90%，而当浓度

达到 500 mg/L 时仅为 58.9%。分析原因：在相同反应时间内，硝基酚初始浓度越高， H_2O_2 消耗量越大，导致 H_2O_2 浓度急剧降低，从而不利于硝基酚降解反应的进行；高浓度硝基酚对酶催化反应有一定的抑制作用；不断增加的反应产物会与酶结合，产生反馈抑制现象。因此酶催化氧化法适宜于处理硝基酚浓度低于 100 mg/L 的废水。

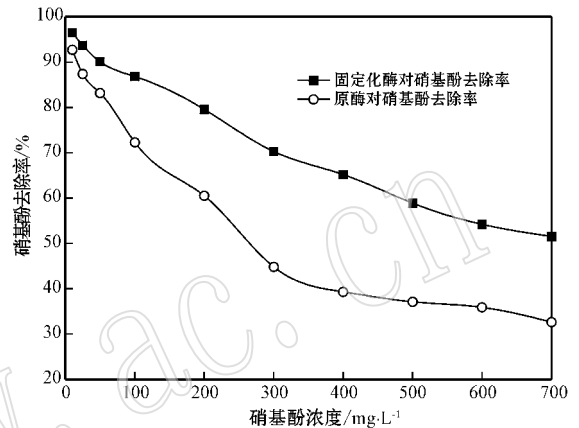


图 4 硝基酚浓度对原酶和固定化酶去除硝基酚的影响

Fig. 4 Effect of concentration of nitrophenol on removal reaction by original and immobilized HRP

从图中还可看出，固定化酶对硝基酚的去除作用明显优于原酶，去除率比原酶高 3.8% ~ 25.9%，曲线总的下降趋势比原酶平缓。所以辣根过氧化酶固定化后催化能力得到提高，在硝基酚浓度较高的情况下，仍可保持 50% 以上的硝基酚去除率。

2.2.5 固定化 HRP 的重复使用

原酶在酚类催化去除反应体系中易失活（Zhang and Nicell, 2000），而固定化酶能够在较长时间保持酶的活性，同时固定化酶便于从反应体系中分离并重复使用。对固定化酶的重复利用性进行考察，加入步骤同 1.2.2 节，加入条件同上，重复操作 7 次，每次 1.5 h，结果如图 5 所示。由图 5 可见，随着固定化 HRP 重复次数的增加硝基酚去除率逐步减小，且第一次重复时硝基酚去除率下降了 9.8%，而后面几次去除率减少仅在 1.3% ~ 5.1% 之间。分析原因：硝基酚的去除率包括载体的吸附去除率和 HRP 的催化去除率，在固定化酶和硝基酚混合的最初阶段载体吸附速度较快，短时间内硝基酚以吸附去除为主，当第一次重复以后，载体吸附逐渐达到饱和，此后去除途径以 HRP 的催化氧化为主，吸附作用相

对较弱。由图可看出重复使用达到7次时,硝基酚的催化去除率仍能达到60.8%,说明由坡缕石基载体材料固定化后,酶的活性得以保持,催化能力得到提高,稳定性得到增强,显著提升了HRP催化降解硝基酚的应用价值,具有良好的应用前景。

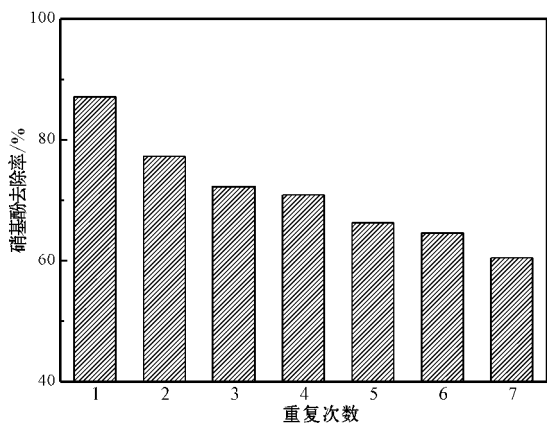


图5 固定化HRP的重复使用性

Fig. 5 Repetitive use of immobilized HRP for the elimination of nitrophenol

3 结论

(1) 影响载体合成最主要因素为煅烧温度,其次为水玻璃加入量,煅烧时间影响最小。当水玻璃和淀粉加入量分别为12%和20%、煅烧温度与煅烧时间为550℃和2h时散失率最小。

(2) 固定化HRP对硝基酚的去除率在1.5h内可以达到平衡,且去除效果明显优于原酶;加酶量为150U时去除率最高为86.4%,比原酶高13.6%;两者最佳H₂O₂加入浓度基本保持一致,均为0.12%,较高浓度的H₂O₂对酶催化降解硝基酚有一定的抑制作用,对固定化酶的抑制作用要弱于原酶;硝基酚浓度对去除率的影响较大,随着浓度的增加去除率逐渐减小。

(3) 坡缕石基载体固定化使得辣根过氧化酶(HRP)保持了较高的酶活性、稳定性、具有较好的重复利用性,重复使用7次后,对硝基酚的去除率仍高于60%。

References

Huang Weihong, Yang Dan, Ruan Jiebing, *et al.* 2010. Photocatalysis

coupled with fenton reagent for degrading p-Nitrophenol [J]. *Environmental Science and Technology*, 33(12): 71~75 (in Chinese with English abstract).

Jiang Jianchun, Huang Jinwen and Wang Yan. 2010. Immobilization of horseradish peroxidase on silica spheres [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 20(11): 2769~2771 (in Chinese with English abstract).

Tatsumi Kenji, Wada Shinji and Ichikawa Hiroyasu. 1996. Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 51(1): 126~130.

Klein J A and Lee D. 1978. Biological treatment of aqueous wastes from coal conversion Processes [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 23(2): 379~390.

Klibanov A M, Alberti B N, Morris E D, *et al.* 1980. Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from wastewaters [J]. *Journal of Applied Biochemistry*, 15(2): 414~421.

Klibanov A M, Morris E D and Felshin L M. 1981. Horseradish peroxidase for the removal of carcinogenic aromatic amines from water [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 3(2): 119~122.

Lanouette K H. 1977. Treatment of phenolic wastes [J]. *Chemical Engineering*, 8(4): 99~106.

Li Qin, Zhang Tong, Zhang Li, *et al.* 1999. Study of the treatment of organic chloride by immobilized enzyme [J]. *Journal of East China University of Science and Technology*, 25(5): 502~505 (in Chinese with English abstract).

Liu Guojie, Deng Guichun, Zhang Yuyang, *et al.* 2006. Determination of nitrophenol in industrial wastewater by spectrophotometry [J]. *Journal of Bohai University (Natural Science Edition)*, 27(1): 14~17 (in Chinese with English abstract).

Ma Xiuling, Chen Sheng, Huang Limei, *et al.* 2003. The treatment of phenolic wastewater by magnetic immobilized enzyme [J]. *Guangzhou Chemistry*, 28(1): 17~22 (in Chinese with English abstract).

Nie Jinxu and Xiao Xianming. 2006. Preparation of modified bentonite adsorbent and its absorption for phenol [J]. *Metal Mine*, 2: 76~78 (in Chinese with English abstract).

Song Haiyan, Liu Jianzhong, Xiong Yahong, *et al.* 2003. Treatment of aqueous chlorophenol by phthalic anhydride-modified horseradish peroxidase [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22(1~2): 37~44.

Sun Xiuyun, Wang Lianjun and Zhou Xuetic. 2003. Preparation and modification of attapulgite clays-flyash parafloc adsorbent [J]. *Jiangsu Environmental Science and Technology*, 16(2): 1~3 (in Chinese with English abstract).

Throop L and William M. 1975. Alternative methods of phenol wastewater control [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 1(4): 319~329.

Wang Shanlin, Zhang Jianbo, Wang Weijing, *et al.* 2006. Preparation and application of horseradish peroxidase immobilized in Fe₃O₄-adsorption-gelatin-entrapping method [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis*, 42(6): 762~766 (in Chinese with English abstract).

- Ye Peng. 2004. Assessment on Alternatives of Pesticidal POPs Used in China and Removal of Pentachlorophenol from Wastewater by the Catalysis of Horseradish Peroxidase[D]. Beijing: Peking University (in Chinese with English abstract).
- Ye Peng, Zhang Jianbo, Chen Song, *et al.* 2005. removal of pentachlorophenol (PCP) by immobilized horseradish peroxidase (HRP) [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis, 41(6):918~925 (in Chinese with English abstract).
- Zhang Guoping and Nicell J A. 2000. Treatment of aqueous pentachlorophenol by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide [J]. Water Research, 34(5):1629~1637.
- Zong Yueru, Zhang Jianbo, Wang Binlin, *et al.* 2007. Removal of pentachlorophenol catalyzed by immobilized horseradish peroxidase [J]. Environmental Science, 28(12):2740~2744 (in Chinese with English abstract).

附中文参考文献

- 黄卫红, 杨丹, 阮介兵. 2010. 光催化与 Fenton 试剂对硝基苯酚降解的研究 [J]. 环境科学与技术, 33(12):71~75.
- 姜建春, 黄金文, 王燕. 2010. 二氧化硅微球固定化辣根过氧化物

- 酶的研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 20(11):2769~2771.
- 李勤, 张彤, 张莉, 等. 1999. 有机氯化物的固定化酶处理技术研究 [J]. 华东理工大学学报, 25(5):502~505.
- 刘国杰, 邓桂春, 张渝阳, 等. 2006. 分光光度法测定药厂废水中对硝基酚的含量 [J]. 渤海大学学报(自然科学版), 27(1):14~17.
- 马秀玲, 陈盛, 黄丽梅, 等. 2003. 磁性固定化酶处理含酚废水的研究 [J]. 广州化学, 28(1):17~22.
- 聂锦旭, 肖贤明. 2006. 改性膨润土吸附剂的制备及对苯酚的吸附性能 [J]. 金属矿山, 2:76~78.
- 孙秀云, 王连军, 周学铁. 2003. 凹凸棒土-粉煤灰颗粒吸附剂的制备及改性 [J]. 江苏环境科技, 16(2):1~3.
- 王彬霖, 张剑波, 王维敬, 等. 2006. 四氧化三铁吸附包埋固定辣根过氧化物酶及其应用 [J]. 北京大学学报(自然科学版), 42(6):762~766.
- 叶鹏. 2004. 中国杀虫剂类 POPs 替代技术评估与废水中五氯酚的酶催化去除 [D]. 北京: 北京大学.
- 叶鹏, 张剑波, 陈嵩, 等. 2005. 固定化辣根过氧化物酶催化去除五氯酚 [J]. 北京大学学报(自然科学版), 41(6):918~925.
- 宗悦茹, 张剑波, 王彬霖, 等. 2007. 四氧化三铁明胶固定过氧化物酶催化降解五氯酚 [J]. 环境科学, 28(12):2740~2744.