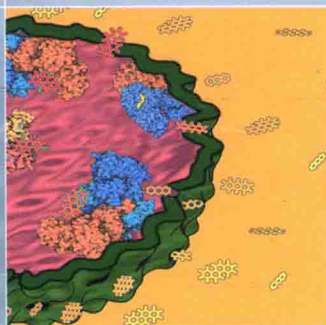
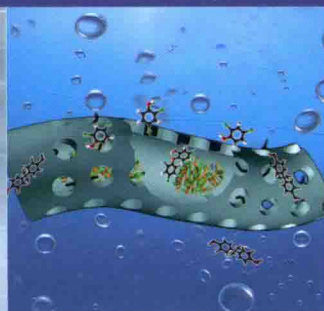


电纺纳米纤维膜固定化酶的制备、性能及应用

牛军峰 殷立峰 代云容 沈珍瑶 著



科学出版社

电纺纳米纤维膜固定化酶的 制备、性能及应用

牛军峰 殷立峰 代云容 沈珍瑶 著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

静电纺丝技术是制备纳米纤维材料的主要途径之一,可有效应用于酶催化剂的负载固定化。本书从原理、方法、表征与应用领域 4 个方面论述电纺纳米纤维膜固定化酶技术。全书共 6 章。第 1 章介绍生物酶技术及其应用,第 2 章介绍电纺的基本原理、装置和方法,第 3~6 章介绍电纺纳米纤维膜固定化酶的制备方法及其在水、大气、土壤污染控制检测中的应用。

本书可作为高等院校环境科学与工程、催化化学、生物化学、材料学及相关专业研究生和高年级本科生教学参考书,也可作为相关领域的科研人员、工程技术人员和管理人员的阅读参考书。

图书在版编目(CIP)数据

电纺纳米纤维膜固定化酶的制备、性能及应用/牛军峰等著. —北京:科学出版社,2016.3

ISBN 978-7-03-047411-7

I. ①电… II. ①牛… III. ①纤维-固定化酶-研究 IV. ①Q814.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 038822 号

责任编辑:刘宝莉 陈 婕 / 责任校对:郭瑞芝

责任印制:肖 兴 / 封面设计:陈 敬

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

中国科学院印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016 年 3 月第 一 版 开本:720×1000 1/16

2016 年 3 月第一次印刷 印张:13 1/4

字数:260 000

定价:100.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

静电纺丝一词来源于“electrospinning”或更早一些的“electrostatic spinning”，一般可简称为“电纺”、“电纺丝”等。静电纺丝是一种特殊的纳米/微米级别的有机/无机纤维制造工艺，是由聚合物溶液或熔体在强电场中喷射裂分的一种纤维制备技术。在电场作用下，针头处的液滴会由球形变为圆锥形的“泰勒锥”，并从圆锥喷射，在接受装置上得到致密的纤维丝，这种方式可以生产出微米或纳米级直径的聚合物细丝。通常认为，以静电纺丝技术制备纤维的开端起源于1934年 Formulas 发明的以静电力制备聚合物纤维的专利装置。静电纺丝以其制造装置简单、纺丝成本低廉、可纺物质种类繁多、工艺可控等优点，成为有效制备纳米纤维材料的主要途径之一。目前，通过静电纺丝技术已制备出种类丰富的纳米纤维，包括有机、有机/无机复合和无机纳米纤维。静电纺无机制备的有机纳米纤维多应用在生物医用材料、过滤及防护、生物催化、酶固定化、环境能源、光电转化、食品工程、化妆品等领域；而无机纳米纤维在高温过滤、高效催化、生物组织工程、光电器件、航天器材等多个领域具有潜在的用途。通过静电纺丝技术制备纳米纤维材料是近十几年来材料科学研究领域最重要的学术活动之一，特别是其发达的纤维膜结构和良好生物相容性使其可以作为优良的生物酶固定化材料。

酶的固定化(immobilization of enzymes)是指用固体材料将酶固定或限制于一定材料限域内，但仍能进行其特有的催化反应且可回收及重复利用的一类技术。与游离酶相比，固定化酶可重复使用，使酶的使用效率提高、使用成本降低，极易与反应体系分离，简化了提纯工艺，而且产品收率高、质量好。在多数情况下，酶经固定化后稳定性得到提高，而且固定化酶的催化反应过程更易控制，具有一定的机械强度，可以用搅拌或装柱的方式作用于底物溶液，便于酶催化反应的连续化和自动化操作。因此，固定化酶不仅在化学、生物学及生物工程、医学及生命科学等学科领域的研究异常活跃，得到了迅速发展和广泛的应用，而且其具有节省资源与能源、减少或防治污染的生态环境效应，符合可持续发展的战略要求。

水体中广泛存在的有毒有机物污染已经成为了全球性的新兴环境问题，其危害程度随着人类社会生产活动的发展日益加剧。水中常见的有毒有机污染物的共同特点是：毒性强，危害大，化学性质稳定，可生化性差，在环境中难以降解，容易在人或生物体内蓄积，部分具有致癌、致畸、致突变或内分泌干扰效应。目前，传统的水处理技术对有毒有机污染物的净化效率不佳，深度不足，因此，亟待开发新型的高效水处理技术用于彻底地净化受有毒有机物污染的水体。本书选取水体中广泛

存在的多环芳烃、全氟辛烷磺酸、五氯酚和三苯甲烷类染料结晶紫作为典型的目的污染物,基于高压静电纺丝纤维膜发达的微纳米结构单元及表面富含有效基团等特点,对其进行适当的生物酶固定化改造,充分发挥其比表面积大、机械性能好、环境友好、表面性质可调等特点,开发了一系列具有强吸附能力或生物催化功能的酶固定化电纺纤维膜新材料,用于水中典型有毒有机污染物的净化,分析其宏观吸附/降解动力学及热力学规律,揭示污染物、纤维膜、水及水中颗粒物不同相界面之间的微观反应机理,并进一步探讨功能化电纺纤维膜的工程化应用价值。以上研究对于纳米材料科学与环境科学交叉学科的研究乃至生物酶技术在环境污染的控制和治理原理与技术的发展方面具有极其重要的意义。

本书是由作者及其团队成员共同撰写完成的,是集体智慧和辛勤工作的成果。全书具体分工如下:第1章由牛军峰、沈珍瑶撰写,第2章由牛军峰、殷立峰撰写,第3章由牛军峰、代云容撰写,第4章由殷立峰、徐江捷撰写,第5章由殷立峰、代云容撰写,第6章由代云容、徐江捷撰写。初稿完成后,相互校对,最后由牛军峰、殷立峰总校对并统稿。

本书获得国家高技术研究发展计划项目(863计划,资助号:2006AA06Z323)、“十一五”国家科技支撑计划课题、霍英东教育基金会第十二届高等院校青年教师基金基础性研究课题、国家自然科学基金项目(资助号:21077010, 51378065, 21207004)的资助。感谢上述项目基金的支持。

在撰写本书过程中,靳方圆、王月、王玉娟、张利兰、黄大弘、王冲、包月平等参与了本书的书稿整理工作,在此感谢他们的辛勤劳动。

由于作者才疏学浅,书中可能存在不妥之处,还恳请有关专家和广大读者批评指正。

牛军峰

2015年9月

目 录

前言

第 1 章 绪论	1
1.1 生物酶技术及其应用	1
1.1.1 漆酶及其应用	3
1.1.2 葡萄糖氧化酶及其应用	6
1.1.3 辣根过氧化物酶及其应用	7
1.1.4 木质素过氧化物酶及其应用	9
1.1.5 锰过氧化物酶及其应用	10
1.2 固定化酶技术	11
1.2.1 酶固定化方法	12
1.2.2 固定化酶技术应用领域	19
1.3 静电纺丝载酶技术研究背景	23
第 2 章 高压静电纺丝纳米丝纤维膜	25
2.1 静电纺丝的基本原理	25
2.1.1 泰勒锥的形成	25
2.1.2 射流细化	27
2.1.3 鞭动过程	27
2.2 静电纺丝装置	29
2.2.1 喷丝头	30
2.2.2 辅助电极	34
2.2.3 接收装置	36
2.3 静电纺丝技术进展	38
2.3.1 纺丝装置	38
2.3.2 纺丝材料	39
2.3.3 纺丝方法	47
2.4 影响因素	49
2.4.1 纺丝材料的影响	50
2.4.2 纺丝液配比的影响	52
2.4.3 纺丝电压的影响	53

2.4.4 极板间距的影响	55
第3章 电纺纳米纤维膜固定化酶的制备与表征	56
3.1 电纺纳米纤维膜的固定化方法	56
3.1.1 表面担载法	56
3.1.2 包埋法	62
3.2 电纺纳米纤维膜固定化酶的制备方法	66
3.2.1 空白电纺纤维膜的制备	66
3.2.2 酶功能化电纺纤维膜的制备	66
3.3 电纺纳米纤维膜固定化酶的表征	67
3.3.1 表面性质表征	67
3.3.2 内部性质表征	76
3.3.3 机械性能	78
3.4 固定化酶酶学性能	79
3.4.1 固定化酶酶催化反应速率	79
3.4.2 固定化酶载酶量的测定	83
3.4.3 固定化酶的活性	85
3.4.4 固定化酶的活性稳定性	85
第4章 电纺纳米纤维膜固定化酶在水污染控制中的应用	88
4.1 电纺纤维膜固定化酶的制备与性能评价	89
4.1.1 漆酶功能化电纺纤维膜	89
4.1.2 辣根过氧化物酶功能化电纺纤维膜	99
4.2 辣根过氧化物酶功能化电纺纤维膜在氯酚污染中的应用	100
4.2.1 氯酚的污染特性	100
4.2.2 电纺纤维膜去除水中氯酚类污染物	102
4.2.3 氯酚在电纺丝膜上的吸附作用	102
4.2.4 氯酚在载酶电纺丝膜上的降解过程	105
4.3 漆酶功能化电纺纤维膜吸附降解多环芳烃	107
4.3.1 多环芳烃的污染特性	107
4.3.2 水中多环芳烃类污染物的去除	109
4.3.3 多环芳烃在电纺丝膜上的吸附	110
4.3.4 多环芳烃在载酶电纺丝膜上的降解	143
4.4 漆酶功能化电纺纤维膜降解结晶紫	158
4.4.1 结晶紫的污染特性	158
4.4.2 漆酶功能化电纺纤维膜去除水中结晶紫的实验方法	159
4.4.3 介体物质存在下载酶电纺膜去除水中结晶紫	160

第 5 章 电纺纳米纤维膜固定化酶在大气和土壤污染控制中的应用	163
5.1 电纺纳米纤维膜固定化酶在室内病原微生物控制方面的应用	163
5.1.1 室内病原微生物去除技术	163
5.1.2 电纺纤维膜固定化酶净化室内病原微生物	164
5.2 电纺纳米纤维膜固定化酶在土壤多环芳烃污染控制中的应用	166
5.2.1 净化实验研究	167
5.2.2 净化机理	168
5.2.3 净化性能评价	169
第 6 章 电纺纳米纤维膜固定化酶在污染物检测中的研究及应用	172
6.1 酶生物传感器工作原理及特点	172
6.1.1 酶传感器的工作原理及特性	172
6.1.2 酶生物传感器检测水中典型污染物	175
6.1.3 酶生物传感器检测新型农药类污染物	177
6.2 载酶电纺纤维膜检测水中酚类化合物	179
6.2.1 载酶电纺纤维膜检测水中酚类化合物的实验方法	179
6.2.2 载酶电纺纤维膜检测水中酚类化合物的机理分析	180
参考文献	190

第 1 章 绪 论

1.1 生物酶技术及其应用

酶是一类具有催化功能的蛋白质,作为一种生物催化剂,它具有反应速率快、反应条件温和、底物专一性强等优点。酶本身可以被微生物降解,符合绿色化学的要求,因此,酶已在食品、医药、轻工和农业等许多领域得到广泛的应用。与其他非生物催化剂相似,酶通过降低化学反应的活化能(用 E_a 或 ΔG 表示)来加快反应速率,大多数的酶可以将其催化的反应速率提高上百万倍。事实上,酶降低了反应过程中所必需的活化能,能提供活化能需求较低的反应途径,它可以使更多反应粒子拥有不少于活化能的动能,从而加快反应速率。酶作为催化剂,本身在反应过程中不被消耗,也不影响反应的化学平衡。酶有正催化作用,也有负催化作用,不仅可以加快反应速率,也可以降低反应速率。与其他非生物催化剂不同的是,酶具有高度的专一性,只催化特定的反应或产生特定的构型。

经过科学家一个多世纪的研究,目前已被认知的生物酶种类达 3000 多种。根据国际酶学委员会的规定,按酶催化反应性质可将酶分为六大类:氧化还原酶类(oxidoreductases)、转移酶类(transferases)、水解酶类(hydrolases)、裂解酶类(lyases)、异构酶类(isomerases)和合成酶类(ligases)。

1) 氧化还原酶类

氧化还原酶类指催化底物进行氧化还原反应的酶类,是一种催化电子,由一个分子(还原剂,又名氢受体或电子供体)传送往另一个分子(氧化剂,又名氢供体或电子受体)的酶,如乳酸脱氢酶、过氧化氢酶等。已知的氧化还原酶类数量和转移酶类、水解酶类相近,通常按习惯分类法分为脱氢酶、氧化酶、过氧化物酶和氧合酶四个亚类。

2) 转移酶类

转移酶类指催化底物之间进行某些基团的转移或交换的酶类,可以催化除氢以外的各种化学功能团从一种底物转移到另一种底物,是在蛋白质合成中起肽链延伸作用的两种蛋白质之一,即延伸因子。常见的转移酶有糖基转移酶、甲基转移酶、氨基转移酶等。

糖基转移酶是广泛存在的一大类酶,它们对糖苷键的形成具有决定性作用。自然界中所有的寡糖、多糖及各种复合糖类(如糖脂、糖蛋白等)中的糖部分,以及各类糖苷的生物合成均离不开糖基转移酶^[1]。糖基转移酶的主要作用是将生物体

内催化活化的糖连接到不同的受体分子上,如蛋白、核酸、寡糖、脂及小分子等,完成糖基化反应。目前发现的糖基转移酶有 100 多种,其主要分布在内质网和高尔基体上。

甲基转移酶可以催化甲基化反应。甲基化反应广泛存在于生物体内,从原核生物到真核生物,许多重要生理环节都需要甲基转移酶的调控作用,如基因表达的抑制或者关闭,DNA 损伤的修复以及微生物、动植物体内生理过程中间产物的合成与降解反应等。保幼激素是节肢动物中一类重要的内激素,它在甲基转移酶的催化作用下,在生物合成的末端完成反应。植物体内许多重要的次生代谢多与甲基转移酶有关,如木质素和育儿酚都是甲基化衍生物。

氨基转移酶也称为转氨酶,是催化氨基酸与酮酸之间氨基转移的一类酶。在氨基转移酶的催化作用下,可以把 α -氨基酸上的氨基转移给 α -酮酸,从而形成新的氨基酸和酮酸。1927 年,Needham 在鸽胸肌中发现氨基转移作用。后来,许多学者研究了此酶的性质,发现其普遍存在于动植物组织和微生物中,在心肌、脑、肝、肾等动物组织以及绿豆芽中含量较高。氨基转移酶可以参与氨基酸的分解和合成。肝脏中也有把天冬酰胺、谷氨酰胺上的 α -氨基转移给酮酸的氨基转移酶。

3) 水解酶类

水解酶类指催化底物发生水解反应的酶类,也可以说它们是一类特殊的转移酶,用水作为被转移基团的受体,如淀粉酶等。蛋白水解酶是催化蛋白质或多肽水解酶的总称,简称蛋白酶,如胰蛋白酶就是水解多肽链的一种水解酶。蛋白水解酶广泛存在于动物、植物以及细菌当中,其种类繁多,在动物的消化道以及体内各种细胞的溶酶体内含量最为丰富。蛋白水解酶对机体的新陈代谢以及生物调控具有重要意义,其分子量一般在 20000~30000。按水解底物的部位不同可以将蛋白酶分为内肽酶和外肽酶,前者主要水解蛋白质中间部分的肽键,后者则自蛋白质的氨基或羧基末端开始逐步降解氨基酸残基。

4) 裂解酶类

裂解酶类又称裂合酶类,是催化多聚链从内部或端部裂解的酶的总称。裂解酶可以催化从底物上移去一个基团而形成双键的反应或其逆反应,如溶菌酶、核酸酶、羧肽酶、醛缩酶、水化酶及脱氨酶等。根据裂解酶结构域的结构及功能特点,通过嵌合不同裂解酶结构域可制备具有不同催化特异性和细菌特异性的裂解酶。实际上,有学者的研究成果非常完善地证实了这点,改变肺炎链球菌体裂解酶的催化域,可以产生一种新的酶,保持其结合域不变,但切割的肽聚糖不同,利用该特性可设计、合成具有高特异性和高效切割能力的嵌合裂解酶^[2]。

5) 异构酶类

异构酶类指催化各种同分异构体之间相互转化的酶类,又称异构化酶,如磷酸丙糖异构酶等。异构酶是酶分类上的主要类别之一,根据反应方式可以分为差相

异构酶、顺反异构酶、消旋酶等。异构酶的作用方式主要有以下几种：

(1) 结合于同一碳原子的基团的立体构型发生转位反应主要在消旋酶、差向异构酶的作用下进行,如 UDP 葡萄糖差向酶。

(2) 顺反异构。

(3) 催化分子内的氧化还原反应(如酮糖与醛糖相互转化等),如葡萄糖磷酸异构酶(生成磷酸果糖)。

(4) 变位酶可以催化分子内基团的转移反应,如磷酸甘油酸变位酶。

(5) 催化分子内脱去加成反应等。其作用方式多种多样,并在各种辅酶的参与下进行。

6) 合成酶类

合成酶类指催化两分子底物合成一分子化合物,同时还必须偶联有三磷酸腺苷(ATP)的磷酸键断裂的酶类,如谷氨酰胺合成酶等。酶的国际系统分类法中的第六大类酶是合成酶类。合成酶又称为连接酶,它可以催化两个底物分子合成一种新的物质,同时 ATP 等高能磷酸化合物中的高能磷酸键断裂^[3]。目前研究较多的合成酶主要有脂肪酸合成酶、植物花青素合成酶等。动物体脂沉积所需的脂肪酸大多源自脂肪酸的从头合成,即由乙酰辅酶 A 和丙二酸单酰辅酶 A 在脂肪酸合成酶的催化作用下合成脂肪酸,进而合成甘油三酯。在此过程中,脂肪酸合成酶是脂肪酸合成的关键酶^[4]。查尔酮合成酶是花色素合成中的一种关键酶,其广泛存在于多种植物中,在植物细胞的发育和分化、抗菌机制、抗胁迫、花色素的积累及外源基因的表达等过程中起着重要的作用^[5]。

在各种酶中,由于氧化还原酶具有适用范围广、容易制备、价格相对低廉等优点,在工业、医药、环保领域都有应用,其部分“亚”类(如过氧化物酶)已实现工业化使用。因此,本书将着重介绍具有代表性的氧化还原酶及其固定化应用。

1.1.1 漆酶及其应用

1. 漆酶

漆酶(laccase)是一种含铜的多酚氧化酶(p-diphenolox-ide, EC 1.10.3.2),于 1883 年由日本学者 Yoshida 从紫胶漆树的分泌物中发现。随着研究的深入,人们证实许多生物,包括高等植物、微生物(主要是真菌,部分是细菌)以及昆虫的体内都存在漆酶。漆酶的结构如图 1.1 所示,一般含有四个铜离子,根据光谱和磁性特征可将其分为三类:Ⅰ型 Cu^{2+} 和Ⅱ型 Cu^{2+} 各一个,是单电子受体,呈顺磁性;Ⅲ型 Cu^{4+} 两个,是双电子受体,呈反磁性。Ⅰ型 Cu^{2+} 呈蓝色,在 614nm 处有特征吸收峰;Ⅱ型 Cu^{2+} 非蓝色,无特征吸收光谱;Ⅲ型 Cu^{4+} 是耦合的离子对(Cu^{2+} - Cu^{2+}),在 330nm 处有宽的吸收带。这四个铜离子处于漆酶的活性部位,是漆酶表

现催化活性的决定因素^[6-8]。漆酶具有较强的催化氧化能力,并且作用的底物相当宽泛,在水体有机污染物控制中有着广泛的应用。漆酶催化氧化有机物反应的机理主要是漆酶催化有机物单电子氧化,同时将氧分子还原成水。漆酶可以氧化多种难降解的有机污染物,包括多环芳烃(PAHs)、氯酚类污染物、多氯联苯及其衍生物、羧酸及其衍生物、甾体激素、杀虫剂、除草剂、染料、芳胺及其衍生物等^[9-16]。漆酶具有的这些优良特性为水体中有机污染物的降解提供了有效的途径。与其他方法相比,漆酶催化氧化法具有能耗低、易操作、降解效率高、使用范围广、不产生二次污染等优点,目前已经成为一个异常活跃的研究领域,在废水处理、生物漂白和生物传感器构建等方面有着巨大的应用前景。

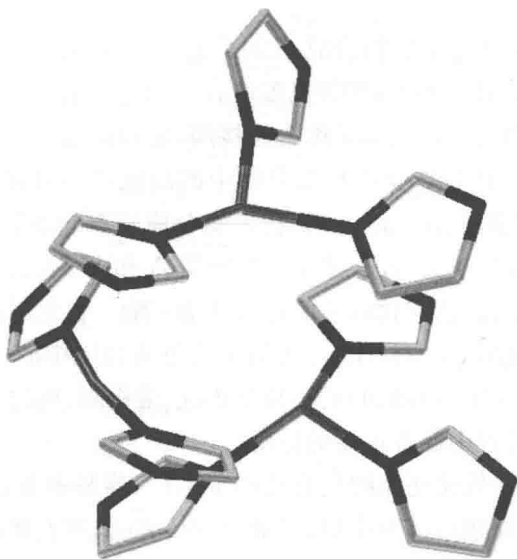


图 1.1 漆酶结构示意图

2. 漆酶在印染废水处理中的应用

合成染料在印染工业有着重要的应用,目前已超过 10000 种。由于染料结构的不同,可将其划分为漆酶底物类染料和非漆酶底物类染料。蒽醌类染料是漆酶的底物,可以被漆酶直接氧化,脱色及降解程度和酶活性呈正比。实验证明^[11],白腐菌 *Trametes trogii* (StrainBAFC463)分泌的漆酶和锰过氧化酶降解蒽醌和硝基苯混合物,经 12~24 天后去除率超过 90%。降解过程中漆酶对污染物的降解起主导作用,其稳定性和活性远远高于锰过氧化酶。偶氮类和靛青类染料不是漆酶的底物,但随着小分子介体物质 ABTS 的添加,降解效果显著提高,且提高比率与 ABTS 浓度呈正比。实验还证明,偶氮类染料和靛青类染料在漆酶作用下,降解十

分缓慢,但当添加 $33\mu\text{mol}$ 蒽醌类染料后,降解速度迅速提高至 $35\sim 40\text{mg/h}$,根据这一特点,可将漆酶应用在工业染料的降解中。

3. 漆酶对环境污染物的降解

近年来,随着工业的快速发展,环境中污染物的种类和数量都显著增加,对人类和生态环境都产生了巨大的危害。漆酶能够有效地降解环境中的苯酚和甾体类激素及其衍生物、PAHs、氯化芳香化合物、芳胺及其衍生物等污染物。

1) 漆酶对苯酚和甾体类激素及其衍生物的降解

苯酚类有机污染物可以在生命有机体中进行生物累积,是一种环境优先污染物,与石油相关的产业和农业生产活动都会向环境中排放大量苯酚类有机污染物,研究人员模仿石油精炼厂废水的特点,将邻苯二酚、对羟基苯乙醇、甲基邻苯二酚、羟基脲四种污染物混合在一起,发现 *Rhusvemificera* 产生的漆酶能有效降解以上污染物,且去除率受起始浓度、反应时间的影响,与混合物中各污染物复杂的化学结构有关。甾体类激素中属于苯酚衍生物的部分如 α -卵胞激素、己烯雌酚、雌甾二醇等物质均可被漆酶降解。

2) 漆酶对 PAHs 的降解

PAHs 主要在矿物的不完全燃烧、森林大火、汽车尾气的排放以及工业生产中产生。由于 PAHs 的毒性、生物难降解性及高度亲脂性的特点,它可以在环境中高度富集。目前对白腐菌 *Tl versicolor* 漆酶的研究最多。被测的 PAHs 中的大多数种类都可以被经钝化的 *Tl versicolor* 漆酶氧化。对于高分子量的 PAHs,其氧化主要属于间接氧化反应,其底物与酶不直接接触,即通过漆酶介体系统来完成(机理类似于染料的非酶底物降解),目前最常用的介体是 HBT 和 ABTS。无介体存在时,用纯漆酶处理 72h 后,蒽被氧化 18%,芘被去除 35%,二氢芘、芘、荧蒽、屈、苯并[a]蒽、苯并[b]荧蒽以及苯并[k]荧蒽仅有 10% 被氧化。在 HBT 存在的情况下,二氢芘、蒽、芘、芘几乎全部被氧化,而芘和苯并[a]蒽的氧化率分别提高到 48% 和 53%。

3) 漆酶对氯化芳香化合物的降解

氯酚类有机化合物是一种重要的工业原料,主要用于生产染料、杀虫剂、防腐剂等化工产品,然而,许多工业如石油相关产业、造纸、纺织等的工业废水中都含有氯化芳香化合物,严重危害了环境和人类的健康。利用漆酶可以有效降解环境中的氯酚类有机化合物。漆酶对氯酚及其衍生物的降解能力主要与芳环上氯的数量和取代位置有关。在单氯酚中,邻位和对位氯酚较易被 *Tl versicolor* 漆酶去除,经 24h 漆酶处理后,邻位氯酚的去除率为 98.16%,对位氯酚的去除率为 100%,而间位氯酚的去除率仅为 23%;在二氯酚中,2,4-二氯酚最容易被去除,而 2,3 二氯酚、2,5 和 3,4-二氯酚的去除较难;在三氯酚(TCP)中,最易去除的是 2,4,6-TCP,

相对而言,2,4,5-TCP 和 2,3,6-TCP 的去除较难一些。除此之外,酶反应体系中中介物质的存在可促进氯酚类有机化合物的降解。

多氯联苯(PCBs)在工业和农业中的应用非常广泛,它的同类物质多达 209 种,以 *Phanerochaete chrysosporium* 白腐真菌对 PCBs 实现降解的研究最多,随着氯化度的增加,PCBs 的矿化程度逐渐下降,虽然目前的证据难以直接证明漆酶与 PCBs 的降解有关,但在白腐菌中产漆酶能力最强的 *T1 versicolor* 和 *Pleurotus ostreatus* 对 PCBs 的降解能力明显比 *Pchrysosporium* 高。

4) 漆酶对苯胺取代物的降解

苯胺取代物也是一类重要的有机污染物,可通过多种除草剂酰苯胺、氨基甲酸苯酯,杀菌剂硝基苯胺及杀虫剂苯脲的微生物代谢进入环境,其结构特点与酚类底物类似,主要为多氨基苯及其衍生物。土壤菌 *Rhizoctonia praticola* 漆酶只能转化 p-甲基苯胺,而不能氧化转变 p-溴代苯胺、o-氯代苯胺、m-氯代苯胺、p-氯代苯胺和 2,4 二氯苯胺及 3,4 二氯苯胺。与甲基取代的 p-甲基苯胺类似,对于乙基取代的 2,6-二乙基苯胺降解也有类似结果。有学者的研究进一步证明了白腐菌 *T1 versicolor* 漆酶可以聚合不同的卤代、甲基及甲氧基取代苯胺,*T1 versicolor* 漆酶和过氧化物酶转化甲基取代苯胺的能力高于卤代苯胺,但对于 2,3-二氯代苯胺或 2,5-二氯代苯胺的作用不大^[17]。

1.1.2 葡萄糖氧化酶及其应用

1. 葡萄糖氧化酶

葡萄糖氧化酶(glucose oxidase, GOD, EC 1.1.3.4)(如图 1.2 所示),又名 β -D-葡萄糖氧化还原酶,它的分子量约为 160kDa(不同来源稍有区别),由两个(或四个)多肽链构成,最早于 1904 年在灰绿青霉和黑曲霉中发现。其氧化反应受到结

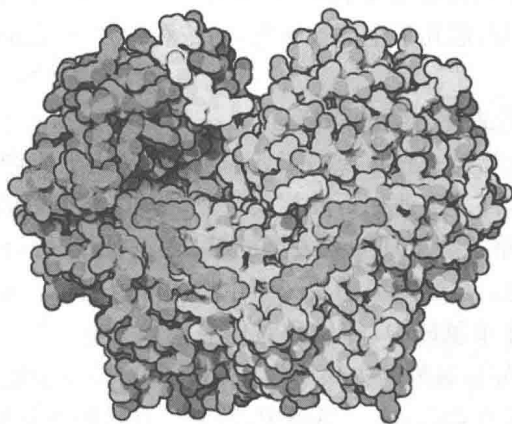


图 1.2 葡萄糖氧化酶结构示意图

合于酶结构深处的辅酶黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)制约。GOD 的活性位点在辅酶的正上方,处于较深的立体结构中。与许多在细胞外发挥作用的蛋白质一样,GOD 表面被糖链覆盖。

GOD 的特异性非常严格,对 β -D-葡萄糖具有高度专一性。GOD 的作用温度范围比较宽,最适温度为 $30\sim 50^{\circ}\text{C}$,且在 pH 为 $3.5\sim 6.5$ 时具有很好的稳定性。

GOD 催化时,需要 FAD 作为辅酶参与作用。GOD 反应时, β -D-葡萄糖在氧气存在下被 GOD 催化脱氢,生成过氧化氢(双氧水)和 D-葡萄糖酸内酯。生成的 D-葡萄糖酸内酯可进一步水解生成的葡萄糖酸,对金属离子具有很强的螯合能力。

2. 葡萄糖氧化酶在酿酒类生产中的应用

GOD 可以抗啤酒氧化,保持啤酒风味,延长啤酒保存时间。GOD 可以除去啤酒中的瓶颈氧和溶解氧,从而阻止啤酒的氧化变质过程。在 GOD 的作用下,氧与啤酒中的葡萄糖反应生成葡萄糖酸内酯,从而消耗溶解氧。生成的葡萄糖酸内酯性质较稳定,无毒副作用,没有酸味,且不具有氧化能力,对啤酒的质量几乎没有影响。

由于 GOD 具有酶的专一性,对啤酒中的其他物质不会产生作用,因此使用 GOD 有很高的安全性。GOD 在防止啤酒老化、保持啤酒风味、延长保质时间方面有明显的效果。GOD 在葡萄酒中的早期应用主要是用于提高葡萄汁和红葡萄酒的稳定性,即通过排除产品中的氧、抑制微生物生长来保持产品质量。后来,逐渐将其用于白葡萄酒生产中。葡萄皮、葡萄梗、葡萄籽中含量较多的酚类和多酚氧化酶与氧作用,会导致白葡萄酒发生严重的褐变,尤其是当原料为成熟度较差和霉变的葡萄时,白葡萄酒的褐变更加严重。向白葡萄酒中添加 GOD 和过氧化氢酶体系,可有效防止其褐变。

3. 葡萄糖氧化酶在医药行业中的应用

GOD 和葡聚糖酶、淀粉葡萄糖苷酶、乳酸过氧化物酶(LPO)、溶菌酶等酶制剂可有效除去牙垢、牙斑,预防龋齿形成。含有 GOD 的药物制剂,其稳定性较普通药物提高三倍。添加 LPO、GOD 和含碘化合物等成分的制剂,具有口腔卫生除口臭和抗头皮屑的作用。在咀嚼含 LPO 和 GOD 的双酶口香糖时,其抑菌有效率达 $96\%\sim 99\%$ 。GOD 可用于治疗对过氧化氢敏感的淋巴瘤的导向目标,还可以作为试剂盒、酶电极等对血清(浆)、脑脊液及尿液中的葡萄糖进行体外定量分析^[18]。

1.1.3 辣根过氧化物酶及其应用

辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP, EC 1.11.1.7),因其在辣根中

含量很高而命名。HRP 广泛分布于植物界,是由棕色的铁卟啉和无色的酶蛋白结合而成的糖蛋白。HRP 由多个同工酶(同工酶系指催化相同的化学反应,但酶蛋白的理化性能、免疫学特性及分子结构不同的一组酶)组成。HRP 同工酶 C(HRP C)在其中的含量最为丰富,分子量为 40000,等电点 pH 为 3~9,酶的最适 pH 因供氢体不同而稍有不同。HRP 同工酶 C 的比活性(系每毫克酶制剂所含酶的国际单位数)高,分子量小,稳定,纯酶容易制备,因此有较为广泛的商业用途。

HRP 的结构如图 1.3 所示,大部分呈 α 螺旋,但也包含一些小的 β 折叠。HRP C 含有两个不同的金属中心:两个钙离子和正铁原卟啉(血红素)。中心区域是血红素基团(网状离子),在血红素平面的上下两侧存在着两个空白区域,该区域可能是由钙结合位点(黑色小球)与其他结构元素共同作用而形成的,也可能是基因复制后留下的产物。这两个金属中心对酶的整体功能和结构都有重要作用。

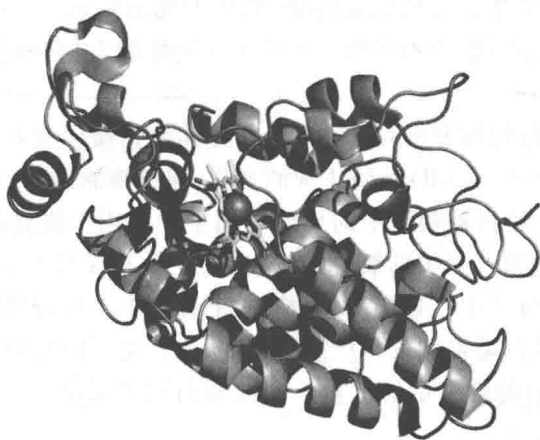


图 1.3 辣根过氧化物酶结构示意图

在过氧化氢的存在下,HRP 能催化苯酚、苯胺及其衍生物,其反应属于双底物酶催化,且为乒乓双双反应机制(乒乓反应是一种双取代反应,即酶与第一底物结合后,释放出第一产物,形成一个稳定态的酶中间物,方能结合第二底物,再释放出第二产物,使酶复原,简而言之,酶分两次结合底物,释出两次产物)。在过氧化氢存在下,HRP 反应生成 HRP-I。作为一个高氧化态催化中间体,HRP-I 会催化一分子还原性底物生成另一个催化中间体 HRP-II。HRP-I 和 HRP-II 都是强氧化剂,HRP 可继续催化氧化一分子还原性底物,自身被还原成静态酶。图 1.4 所示的是 HRP 催化氧化酚类化合物的反应机理。

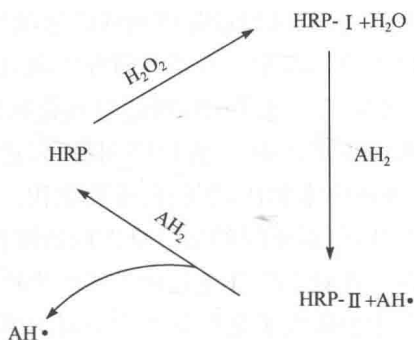


图 1.4 HRP 催化示意图

1.1.4 木质素过氧化物酶及其应用

木质素过氧化物酶(lignin peroxidase, LiP, EC1. 11. 1. 14)是迄今为止发现的唯一一种可以单独氧化降解非酚型木质素结构的过氧化物酶。LiP 最先在黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporiu*)白腐菌中被发现,是一系列含有一个高自旋 Fe(III)卟啉环(IX)血红素辅基的同工酶,它可以氧化富含电子的非酚型芳香化合物,其分子量大约为 40kDa,有偏酸性的最适 pH 和酸性等电点。LiP 氧化还原电位为 1.5V。

其催化反应由第一底物 H_2O_2 氧化 LiP,生成氧化态中间体 LiP-I (失去 2 个电子);接着, LiP-I 从富含电子的第二底物苯酚或非酚类底物苯环中夺取一个电子,被还原成 LiP-II 复合体;底物被氧化后生成一个自由基产物,接着再经过一次电子还原回到原酶状态,完成一个循环过程。在此过程中,催化形成的自由基可以进一步引发一系列自由基的链式反应。该酶的催化反应过程大致如图 1.5 所示(其中 SH_2 为专一电子传递体, $SH\cdot$ 表示其自由基)。

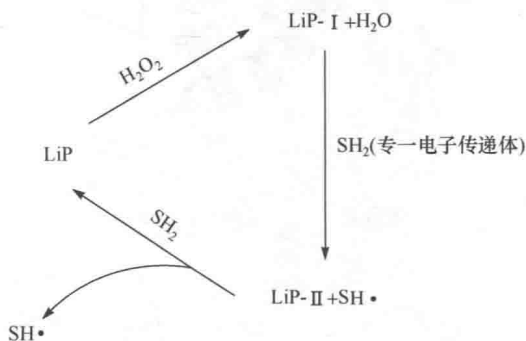


图 1.5 木质素过氧化物酶催化过程示意图

木质素降解酶能够降解多种物质,特别是 LiP 具有重要作用。已证明, LiP 能