

## 用辣根过氧化物酶处理废水中的五氯酚

⑤

12-14, 27

张国平<sup>1</sup>, Nicell J. A.<sup>2</sup>, 邹永廖<sup>1</sup> Nice, J A

(1. 中国科学院 地球化学研究所, 贵州 贵阳 550002;

2. Department of Civil Engineering and Applied Mechanics, McGill University, 817  
Sherbrooke Street West, Montreal, Quebec H3A 2K6, Canada)

X703

**摘要:** 研究了用辣根过氧化物酶对五氯酚的模拟废水进行催化聚合处理的过程。结果表明,辣根过氧化物酶可以有效地去除五氯酚。反应的最佳 pH 范围为 4~5,去除率可达 95% 以上。聚合处理过程中五氯酚与过氧化氢的反应计量比为 2:1。反应计量比以及处理过程中氯的释放实验表明,五氯酚聚合作用的主要产物是二聚体。另外,反应速度与酶和过氧化氢的用量有关,增加酶用量或适量增加过氧化氢的用量可以明显缩短反应时间。

**关键词:** 辣根过氧化物酶; 废水; 五氯酚; 催化反应

**中图分类号:** X703 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-6929(2000)02-0012-03

## Treatment of Pentachlorophenol in Wastewater Using Horseradish Peroxides

ZHANG Guo-ping<sup>1</sup>, Nicell J. A.<sup>2</sup>, ZOU Yong-liao<sup>1</sup>

(1. Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guiyang, Guizhou 550002;

2. Department of Civil Engineering and Applied Mechanics, McGill University,  
817 Sherbrooke Street West, Montreal, Quebec H3A 2K6, Canada)

**Abstract:** The catalyzed polymerization and precipitation of pentachlorophenol (PCP) using horseradish peroxidase (HRP) was investigated. The result indicates that HRP was capable of removing PCP. Over 95% of PCP removal was achieved at the optimal pH range of 4~5. PCP reacted with hydrogen peroxide with a stoichiometry of 2:1. The stoichiometry and the release of chloride indicate that dimers are the main products in the treatment process. In addition, the reaction rate was closely related to the quantity of enzyme and hydrogen peroxide.

**Key words:** horseradish peroxidase; wastewater; pentachlorophenol; catalytic reaction

酚类化合物是常见的有毒有机污染物,含酚废水在我国水污染控制中被列为重点解决的有害废水之一,它的大量排放对水体、土壤造成严重的污染,进而危害人类的健康<sup>[1]</sup>。用酶的催化聚合作用来处理酚类及芳香胺类化合物的污染是近年来受到重视的新方法<sup>[2-4]</sup>。笔者采用辣根过氧化物酶 (HRP) 与过氧化氢相结合,处理五氯酚 (PCP) 的模拟废水,对处理过程的特征 (如 pH、反应计量比、反应速度、酶的用量) 进行了研究。

## 1 材料和方法

## 1.1 试剂

辣根过氧化物酶 (EC 1.11.1.7)、过氧化氢酶

(EC 1.11.1.6)、柠檬酸、甲醇是 Sigma 化学品的产品。磷酸钠和醋酸钠是 Anachemia 有限公司的产品。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% V/V) 是 Fisher 公司的产品。五氯酚 (纯度 > 99%) 是 Fluka 公司的产品。所用缓冲液均为 0.1 mol/L, 是按照 Gomori (1955) 提出的方法<sup>[5]</sup>配制的。这些缓冲液包括: HCl-KCl 缓冲液 (pH=2)、柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液 (pH=3)、醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH=4,5)、磷酸二氢钠-磷酸氢二钠缓冲液 (pH=6,7,8)。

## 1.2 实验方法

取适量五氯酚储存液 (5 mmol/L, 溶于甲醇中) 加入到一定 pH 值的缓冲液中, 配制五氯酚初始水溶液。按所需用量, 加进过氧化氢和辣根过氧化物酶, 然后持续搅拌。五氯酚的初始浓度为 0.05 mmol/L, 这也相当于常温下五氯酚在水中的溶解

收稿日期: 1999-05-28

作者简介: 张国平 (1966), 男, 江西余干人, 助理研究员, 硕士。

度<sup>[6]</sup>。实验温度控制在 25 ℃,反应时间为 3 h(有关底物随反应时间变化的实验除外)。需结束反应时,加入过氧化氢酶,使 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 迅速分解为 H<sub>2</sub>O 和 O<sub>2</sub>,从而终止反应。之后,将样品在 3 500 r/min 的速度下离心 30 min,取清液进行残存底物(五氯酚)的测定。

### 1.3 分析方法

酶活性测定采用酚、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 为试剂,4-氨基安替比林(AAP)为显色剂。酚的浓度为 10 mmol/L,4-氨基安替比林为 2.4 mmol/L,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 为 0.2 mmol/L,pH 值为 7.4,温度为 25 ℃。酚的反应产物与 4-氨基安替比林生成红色物质。

在反应开始阶段,酶的活性与反应溶液在 510 nm 处的消光度的变化速度成正比。在酶加入后,迅速将比色皿颠倒 3 次以混合均匀,并立即置于分光光度计上测定消光度随时间的变化。消光系数为 7 100 L/(cm·mol)

底物五氯酚的测定是采用 Waters Associates 公司生产的 441 型高效液相色谱,检测器是紫外检测器(波长 254 nm),所用的色谱柱是 Vydac-201TP54(C18)。所用淋洗液是 76:24(V:V)甲醇和水的混合液。为保证色谱峰型,在淋洗液中加入醋酸和醋酸钠,其在淋洗液中的含量与在 pH=4 的缓冲液中的含量相同。淋洗液在使用前已经预先经过脱气和过滤。淋洗液流量为 1 mL/min,进样体积为 10 μL。大部分样品的 pH 值为 4,有些样品 pH 值不是 4,则先用 NaOH 或 HCl 调至 pH=4,然后再用色谱分析。

## 2 结果与讨论

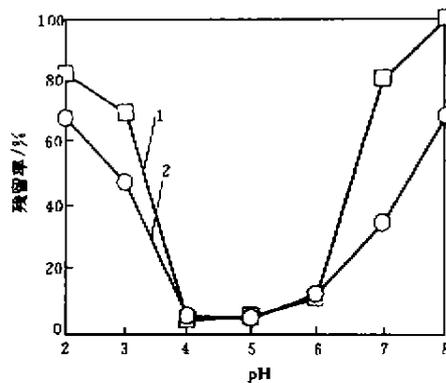
### 2.1 pH 值对去除率的影响

在 pH=2~8 的范围内测定了五氯酚在辣根过氧化物酶和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的作用下的去除率。实验结果见图 1。由图 1 可见,在 pH 值为 4 和 5 时,去除率达 95% 以上,为最佳 pH 范围。所以接下来的实验都是在 pH=4 时进行的。

### 2.2 反应的计量比

采用不同的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 用量与 0.05 mmol/L 五氯酚进行实验(辣根过氧化物酶是过量的),测定五氯酚的去除率,结果见图 2。当 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 用量为 0~0.025 mmol/L 时,五氯酚去除率按比例上升(也即残余五氯酚浓度按比例下降),表明 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与 PCP 有着固定的反应计量比。当 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 达到 0.025 mmol/L 以上时,去除率已达最高,说明这时 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 用量已饱和。

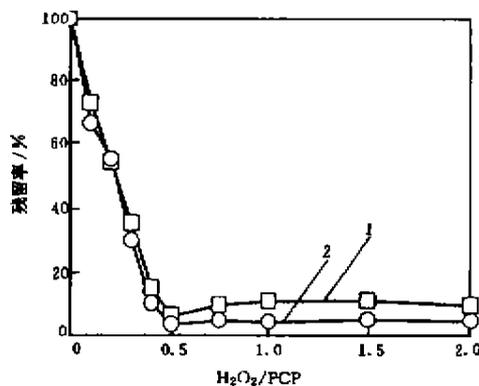
图 2 中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 为 0~0.025 mmol/L 部分的曲线接近于直线,用最小二乘法进行斜率计算,得到 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与五氯酚的计量比为 0.53 和 0.52,非常接近 0.5,说明在此反应过程中,每消耗一个 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分子,就有 2 个五氯酚分子被去除。



HRP/(U·mL<sup>-1</sup>):1—0.1;2—0.5

图 1 pH 值对去除率的影响

Fig.1 Effect of pH on PCP removal



HRP/(U·mL<sup>-1</sup>):1—0.5;2—0.1

图 2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对去除率的影响

Fig.2 Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on PCP removal

从理论上讲,如果反应产物二聚体完全不溶于水,那么反应的计量比将是 0.5(即 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:PCP=1:2)<sup>[7]</sup>。五氯酚的反应结果与这一理论值十分吻合,但对于酚和其他氯代酚来说,许多研究表明底物与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的反应计量比为 1:1。其与理论值的差异可能是由多种因素造成的,其中重要的一点是催化过程的产物为比二聚体大的多聚体<sup>[2,8]</sup>。当二聚体不能形成沉淀时,可以继续反应形成三聚体或更高的多聚体,直到形成沉淀。这些过程都要消耗 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,所以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的消耗量就比理论值要高。由此可见,五氯酚聚合作用的产物可能主要是二聚体。

### 2.3 酶用量

五氯酚去除率与酶用量的关系见图 3(反应的 pH 值为 4)。在所有的反应中,相对于反应计量比来说, $H_2O_2$  的用量稍有过量( $H_2O_2:PCP=1:1$ ),这是基于对反应速度的考虑。由图 3 可见,当酶用量达到  $0.05 \sim 0.1 U/mL$  时,五氯酚的去除率已达最高。低于这一范围,则去除率受酶用量的限制。在图 3 中,使用  $0.1 U/mL$  的酶获得了最高的去除率。

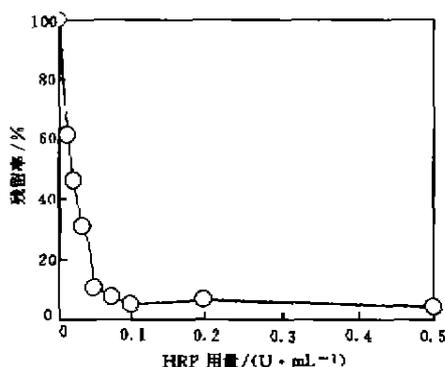


图 3 HRP 用量的影响  
Fig. 3 Effect of HRP dose

#### 2.4 反应速度

图 4 显示了不同  $H_2O_2$  及酶用量时五氯酚的去除速度。总的来说,反应是相当快的,所有的反应都在 15 min 内进行了一半以上。对比这几个反应可以看出,当  $H_2O_2/PCP$  相同时,酶用量多,则反应速度快。对于  $H_2O_2/PCP=0.5$  的 2 个反应,酶用量为  $0.1 U/mL$  时只用 15 min 就获得了 80% 以上的去除率,而酶用量为  $0.05 U/mL$  时则用了 40 min。当酶用量相同(同为  $0.1 U/mL$ )时, $H_2O_2/PCP=1$  时的去除速度比  $H_2O_2/PCP=0.5$  时要快,前者只用 8 min 就获得了 80% 以上的去除率,而后者则用了 15 min。值得注意的是,适度增加  $H_2O_2$  可以加快反应

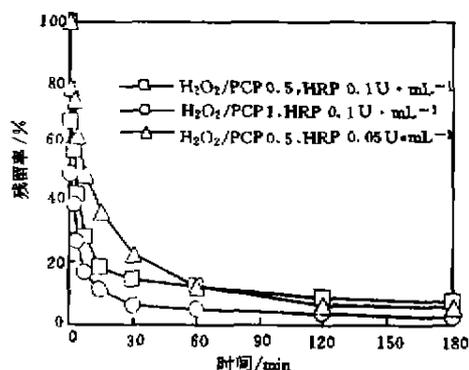


图 4 不同条件下的去除速率  
Fig. 4 Reaction rate under different conditions

速度,但这并不是无限制的,太过量的  $H_2O_2$  也会对反应有抑制作用<sup>[9]</sup>。

#### 2.5 反应中氯的释放

在辣根过氧化物酶处理 2,4-二氯酚的过程中,大约有 20% 的氯从苯环上释放出来<sup>[10]</sup>。在对五氯酚的研究中,只有 2.8% 的氯释放了出来,而大多数氯仍然保留在苯环上。这一结果暗示五氯酚分子是通过苯环上的一OH 位置聚合的。当 O-H 键断裂后,2 个五氯酚分子可以聚合形成二聚体。形成二聚体后因为没有一OH,就不能再聚合成三聚体或更高的多聚体。这一结果支持了前面提出的主要产物是二聚体的观点。

#### 2.6 反应产物对底物的吸附作用

为了了解在反应过程中是否有部分底物被反应产物所吸附,笔者研究了产物对底物的吸附作用,实验方法如下:在五氯酚与酶反应后加入过氧化氢酶破坏  $H_2O_2$ ,测定残存的五氯酚;然后再加入相当于  $0.04 mmol/L$  的五氯酚,3 h 后离心,再次测定溶液中的五氯酚。五氯酚含量的减少就代表了被产物吸附的部分,因为  $H_2O_2$  已被破坏,不可能再发生五氯酚的催化聚合反应。实验结果表明,加入的五氯酚中约有 10% 被沉淀产物所吸附。注意到这一比例是在产物完全形成之后较长时间吸附的结果,由于催化聚合反应速度快,吸附作用在五氯酚的去除过程中只能占比此轻得多的地位。

### 3 结论

- 用辣根过氧化物酶可以有效地去除废水中的五氯酚。反应的最佳 pH 为 4~5,去除率可达 95% 以上。
- 反应中  $H_2O_2$  与五氯酚的反应计量比为 1:2,与理论值相吻合。
- 反应速度与酶及  $H_2O_2$  的用量有关。增加酶用量及适度增加  $H_2O_2$  用量时,反应速度会明显加快。
- 反应中只有 2.8% 的氯释放了出来,而大多数氯仍然保留在苯环上。这一结果与反应计量比表明,五氯酚聚合作用的主要产物是二聚体。

#### 参考文献:

- 刘相伟.工业含酚废水处理技术的现状与进展[J].工业水处理,1998,18(2):4~6.
- Nicell J A, Bewtra J K, Taylor K E, et al. Enzyme catalyzed polymerization and precipitation of aromatic compounds from wastewater[J]. Wat Sci Tech, 1992, 25(3): 157~164

(下转第 27 页)

口位置。这对于保护渤海近岸海域环境和发展沿海经济、坚持保护与发展并重的原则,具有重要的现实意义。渤海近岸海域的自净能力已很有限,对岸边排放方式应当加以限制。

### 3.2 尽快实施对近岸海域进行环境功能分区管理

目前,在有些沿海地区海域和岸线的盲目开发利用,无节制的使用海洋资源和海洋环境,不合理的生产力布局 and 产业结构,是造成环境恶化的重要原因。为了更加合理地开发利用岸线和海洋资源,按照“高功能高标准保护”和“谁污染谁负责治理”的方法,科学利用海水的自净作用,必须对近岸海域进行环境功能分区管理。与地面水的环境功能区划管理方式一致,将陆地的区划制度向海洋延伸,以便进行全国海陆环境的统一监督管理。这是沿海地区进行环境规划和实施总量控制制度的基础工作。因此,建议尽快公布全国近岸海域环境功能区划方案,使海域环境逐步走上健全的法制管理轨道。

### 3.3 加强入海河流的全流域综合环境管理体制

通过入海河口进入海域中的陆源污染物,涉及到整个流域,它已构成一个十分复杂的天然流域水环境系统。进入 90 年代后,随着经济与人口的发展,水污染问题的日趋严重,分割管理体制的弊病也越来越突出。因此,要控制污染物入海量必须对全流域的污染源进行综合控制,必须建立我国入海河流全流域水环境综合管理体制。涉及渤海近岸海域的流域有海河流域、辽河流域、黄河流域、滦河流域和小清河流域。按照这种管理体制进行上述流域的总量控制,应在渤海近岸海域总量控制工作的基础

上进行,然后逐级上推各级的水质目标,逐级计算各河段的控制总量,这就构成了入海河流全流域综合管理体系。对渤海海域的主要入海流域,应一个一个地制定流域环境管理规划,最后制定出全渤海海域环境综合管理体系。对于黄河流域,还必须做好黄河中上游的水土保持工作,以减少黄河改道的频率和河口的淤积作用。

### 3.4 建立渤海海域的区域性管理机构

渤海海域的入海污染物,来自上述五大流域,横跨十余个省(市),由于其水交换性差,水质恶化极易发生。四周众多的沿海城市和河流不断将污水排入渤海,只按城市或单一行政地区对渤海环境进行分割管理显然是不完善的。容易出现空缺,互相推诿,随着渤海环境问题的日趋严重,矛盾将日益激化,如此发展下去,将难以收拾。因此,十分需要建立一种跨行政区域的、技术性的权威管理机构。可以由环渤海各省市人民政府及有关主管部门,探讨一种海洋环境保护区域组织,建立适合沿海经济发展和海洋特征的跨行政区的区域性海洋环境保护管理体制。在国务院环境保护行政主管部门指导并参与下,协商解决区域性海洋环境和生态保护问题。

### 参考文献:

- [1] 中国环渤海地区市长联席会办事处,经济研究会.中国环渤海地区经济开发合作指南[M].北京:中信出版社,1991.
- [2] GB/T3097-1997 海水水质标准[S].
- [3] 翟美华.烟台市养虾废水排放及控制[J].海洋环境科学,1996,15(4):58~61.
- [4] 赵章元,张永良,章燕.我国区域性污水海洋处置度分区规划研究[J].海洋环境科学,1998,16(3):14~20.
- [5] Nakamoto S, Machida N. Phenol removal from aqueous solutions by peroxidase-catalyzed reaction using additives[J]. Wat Res, 1992,26(1):49~54.
- [6] Wu Y, Bewtra J K, Biswas N, et al. Removal of phenol derivatives from aqueous solution by enzymatic reaction with additives [A]. In: Ed Wukasch R F Proceedings of the 48 th Purdue Industrial Waste Conference [D]. Chelsea, MI: Lewis Publishers, 1993,421~431.
- [7] Gomori G. Preparation of buffers for use in enzyme studies[A]. In: Colowick S P, Kaplan N O. Methods in Enzymology[J]. New York: Academic, 1955, 1:138~146.
- [8] Verchueren K. Handbook of environmental data on organic chemicals[R]. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1997.
- [9] Hewson W D, Dunford H B. Stoichiometry of the reaction between horseradish peroxidase and p-cresol[J]. J Biol Chem, 1976,251:6043~6052.
- [10] Buchanan I D, Nicell J A. Model development for horseradish peroxidase-catalyzed removal of aqueous phenol[J]. Biotech Bioeng, 1997,54(3):251~261.
- [11] Nicell J A, Wright H A. A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide[J]. Enz Microb Tech, 1997,21(4):302~310.
- [12] Dec J, Bollag J-M. Detoxification of substituted phenols by oxidoreductive enzymes through polymerization reactions[J]. Arch Environ Contam. Toxicol, 1990,19:543~550.

(上接第 14 页)