

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2013.07.014

过氧化物酶催化去除水体中酚类内分泌 干扰物的研究进展*

冯义平 毛 亮 董仕鹏 高士祥**

(污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京大学环境学院, 南京, 210023)

摘 要 内分泌干扰物(EDCs)会干扰生物体的内分泌系统从而对人类、野生动物以及水生生物产生负面影响,这一问题已经引起了人们的广泛关注.广泛分布于自然环境中的辣根过氧化物酶(HRP)和木质素过氧化物酶(LiP),具有较强的催化氧化能力,能够催化去除雌激素、双酚 A 等多种具有内分泌干扰效应的污染物.本文在介绍辣根过氧化物酶(HRP)和木质素过氧化物酶(LiP)两种过氧化物酶的相关性质和催化氧化机理的基础上,从污染物结构与其催化去除效率关系的角度综述了过氧化物酶去除具有内分泌干扰效应的污染物的研究进展.为污水处理过程中过氧化物酶用于去除内分泌干扰物提供依据,并展望了其未来的发展方向.

关键词 辣根过氧化物酶(HRP), 木质素过氧化物酶(LiP), 酚类内分泌干扰物, 定量结构活性关系(QSAR).

作为能够影响人和动物内分泌系统,导致雄性动物雌性化、生殖能力降低的一类有害物质,内分泌干扰物(EDCs)越来越受到人们的关注^[1-2].雌激素和双酚 A 等酚类化合物是内分泌干扰物的重要成员之一,其内分泌干扰效应已被诸多研究证明^[3-4].相关研究表明,内分泌干扰物广泛存在于多种水体中如废水、地表水、地下水,甚至饮用水中^[3].美国学者对其 30 个州 139 条河流检测结果发现,139 条河流中能够检测到雌酮(estrone, E1)、雌二醇(17 β -estradiol, 17 β E2)、雌三醇(estriol, E3)、17 α -乙炔基雌二醇(17 α -ethinyl estradiol, EE2)和 17 α -雌二醇(17 α -estradiol, 17 α E2)的比例分别是 7.1%、10.6%、21.4%、15.7%和 5.7%,其中 E1 和 E2 被检测到的最高浓度为 112 和 200 ng·L⁻¹^[5];日本环境厅 1998 年对境内 109 条河流进行了调查,其中 74 条河流不同程度地被检测出已确认或疑似有内分泌干扰效应的化合物,约占 68%^[6].这类污染物的特性,如生物富集性、持久性及极低浓度便能引发生理学上的响应 (ng·L⁻¹)^[4],使得其在地表水和废水中很难借助传统水处理技术去除.

过氧化物酶,常见的如辣根过氧化物酶(HRP)和木质素过氧化物酶(LiP),能在过氧化氢或者小分子有机过氧化物的存在下,催化很多酚类化合物发生氧化反应^[7-10].由于酶催化反应的高效专一性和绿色安全性,利用酶催化处理废水中低浓度、有雌激素效应的酚类化合物的方法引起了人们的广泛兴趣,而在相应技术上也得到了一定的探索发展^[11-15].而将定量构效关系(QSAR)理论方法应用于 HRP, LiP 在催化去除酚类 EDCs 上的研究,可以帮助人们有效地预测结构性质相似的化合物的酶促反应,深入了解酶和底物的作用过程,更清晰地阐述反应机理.并且还可以帮助人们有目的地修饰酶的结构,设计合成人工酶,为酶工程应用提供理论依据.

本文结合过氧化物酶的催化反应机理,综述了两种常见的过氧化物酶(HRP、LiP)在 EDCs 处理中的应用.

1 过氧化物酶

过氧化物酶是自然界一类常见的酶,根据来源的不同主要可以分为 3 类:植物过氧化物酶如辣根过氧化物酶(HRP)、大豆过氧化物酶(SBP)等;动物过氧化物酶如谷胱甘肽过氧化物酶;真菌过氧化物酶如木质素过氧化物酶(LiP)和锰过氧化物酶(MnP)等.其中关于 HRP 和 LiP 的研究最为广泛,它们都是

2013 年 2 月 27 日收稿.

* 国家自然科学基金青年项目(21107046)资助.

** 通讯联系人, Tel:025-89680359; E-mail: eesxg@nju.edu.cn

含有铁卟啉活性中心的血红素蛋白质,催化反应机制类似.如图 1,其催化反应机制可描述为:首先血红素蛋白基态被 H_2O_2 或小分子有机过氧化物氧化而成为含铁氧键的四价铁和一个卟啉 π 阳离子自由基的化合物 I;随后化合物 I 从底物得到一个电子,将卟啉 π 阳离子自由基还原为化合物 II;最后化合物 II 通过氧化底物分子得到一个电子同时也将酶还原为基态^[7,16].底物分子被氧化成自由基以后,可以经过重排、偶联等非酶反应过程形成相应的聚合物,以及其它的化合物.研究表明,在 HRP 和 LiP 的催化反应过程中,第一步和第二步的反应速度远远大于第三步(即 k_1, k_2 远大于 k_3),所以第三步被认为是限速步骤.其催化反应过程如图 1 所示^[7,17].

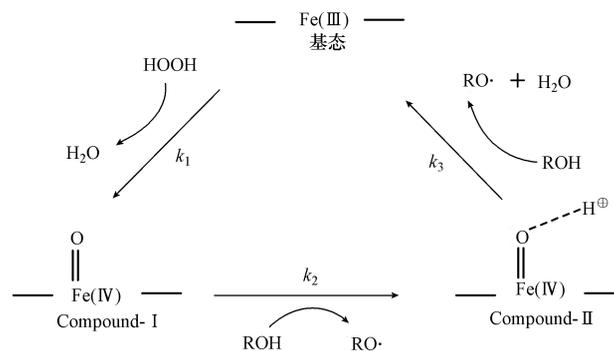
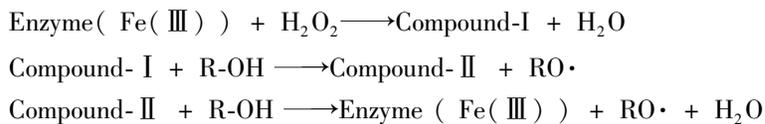


图 1 HRP/LiP 催化底物反应过程的示意图(改编自 Colosi 等^[7])

Fig. 1 Schematic depiction of HRP /LiP catalytic cycle (adapted from Colosi et al. ^[7])

酶催化反应由于具有反应条件温和、专一性以及高效性等特点,因此在催化去除含酚废水的处理技术上得到了广泛的研究. Klibanov 等^[18]最早采用 HRP 催化去除工业废水中 30 多种酚类和芳香胺类化合物,包括氯酚、甲氧基苯酚及卤代胺等,发现 HRP 对这些酚类物质有很高的去除效率,有些可达 99% 以上. Auriol 等^[11-13]系统的研究了 HRP 对 4 种 EDCs 的催化去除效率,发现 HRP 对于环境浓度水平的 EDCs(初始浓度为 $0.4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)仍然具有很高的去除率,pH、温度、反应时间对去除效率均有影响,反应的最适条件为 $\text{pH}=7.0$,温度 $25 \text{ }^\circ\text{C}$.一些研究发现 LiP 和 MnP 能将一些合成的偶氮染料如酸性橙红 II 等脱色^[19]. Ward 等^[20]研究发现 LiP 可以用来处理含 2,4-二溴苯酚的工业废水,在催化氧化过程中形成 2,4-二溴苯酚的二聚体、三聚体和四聚体,进而可以消除废水的毒性.

2 失活机理探讨

用酶催化处理废水,酶的失活是其限制工程应用的因素之一.因此搞清楚其失活机理,改善酶的失活是极其必要的.通常来说,导致 HRP 失活的原因主要有:(1)过量的 H_2O_2 与 HRP 酶催化循环过程中生成的过渡态 compound-II 发生反应生成没有反应活性的 compound-III,使得过渡态的酶复合物(compound-II)无法回到基态,减少了酶催化循环的次数,导致 HRP 酶的失活^[21-22];(2)通过 HRP 酶催化底物反应生成的产物大多为大分子的聚合物,这些聚合产物溶解性较差,会吸附到酶上使得酶随着大分子聚合产物沉淀,从而降低反应溶液中酶的浓度.或因生成的产物吸附到酶上,占据了酶的反应活性位点,使得底物分子难以和酶的反应活性位点结合,导致酶的失活^[23];(3)还有研究认为,HRP 酶的失活是因为铁卟啉活性中心的血红素的破坏导致^[24-25].

导致 LiP 酶失活的原因,通常认为主要是因为过渡态的酶复合物(compound-II)被过量的 H_2O_2 氧化生成了没有反应活性的 compound-III 导致的^[26].而 Mao 等^[27]通过研究发现,藜芦醇(VA)作为 LiP 共生的天然底物,在催化反应过程中不仅可以保护 LiP 免于失活,而且还对失活的酶具有一定的恢复作用.在过量 H_2O_2 存在的体系中, LiP 失活形成的 compound-III 只是一个暂时存在的、没有催化能力的中间产物,其既可以变成永久的失活态酶,也可以在 VA 存在条件下被复原为具有催化能力的基态酶.推测

其机理如图 2.

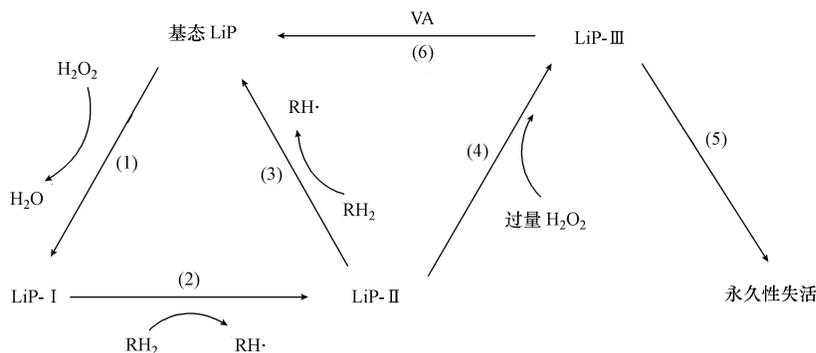


图 2 LiP 催化循环示意图

LiP 催化循环图,步骤(1)、(2)、(3);过量 H_2O_2 导致 LiP 失活的过程,步骤(4)、(5);VA 将 LiP-III 还原到基态酶的过程,即活性恢复过程,步骤(6). (改编自 Mao^[27])

Fig. 2 Schematic depiction of LiP catalytic cycle

随着催化反应的进行,酶的失活是不可避免的,而外加一些辅助物质可以有效地避免酶的失活进而延长酶的催化反应周期. 比如向 HRP 反应体系中添加一定量的聚乙二醇(PEG)、凝胶等能够通过保护酶的活性而增强酶的催化反应效率. Nakamoto 和 Wu 等^[23, 28]发现 HRP 在反应过程中会被生成的聚合产物结合从而导致催化能力降低,而加入一些高亲水性的物质如聚乙二醇(PEG)、明胶等可以优先和反应生成的聚合产物结合,从而将 HRP 释放出来,使得 HRP 的有效循环周期提高 400 倍之多^[29]. 另外藜芦醇(VA)作为白腐菌 *P. chrysosporium* 在分泌 LiP 的同时又分泌的一种化合物,不仅是 LiP 的天然底物,还能够保护 LiP 避免其失活,进而增强 LiP 对一些底物(如木质素、芳香族化合物等)的催化反应性能. 因此在 LiP 催化降解污染反应体系中添加适量的 VA,可极大地改善 LiP 降解污染物的能力^[16]. Mao 等^[30]在 LiP 催化去除 17 β -雌二醇(E2)的过程中,加入 VA 可以使 LiP 催化去除 E2 的反应速率常数提高 19 倍. 这主要归因于 VA 不仅可以保护 LiP 避免其失活而且对 LiP 活性中心还具有一定的强化作用. 而且藜芦醇存在的反应体系中 E1 和 E2 的交叉聚合物会增多,而且还促使反应产物从低聚物向高聚物方向迁移,这样有利于大分子产物的形成,使得处理后的污染物溶解度变小,可以通过过滤等从水体中去除,这在水处理过程中有非常重要的意义.

3 HRP 和 LiP 催化去除水体中的 EDCs

在水处理过程中,常规的污水处理工艺通常不能完全去除 EDCs. 残留的微量 EDCs 仍然具有雌激素效应,因此如何有效地把痕量 EDCs 去除至安全浓度是一个亟待解决的难题. 过氧化物酶能够催化 H_2O_2 进而氧化酚类、芳香胺类物质发生聚合反应,并且反应条件温和、选择性高、催化效率高. 因此,在含酚废水,特别是具有雌激素效应的酚类污染物的处理技术上得到了广泛的探索研究. 一些研究报道,低浓度的 E2 经过 LiP 处理后,其雌激素效应可以被完全消除^[31].

3.1 HRP 催化去除水体中 EDCs 的研究

Auriol 等^[11]用 HRP 催化处理含雌激素——E1、E2、E3、EE2 的废水. 结果表明,在 PBS 体系中,0.032 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 HRP 对于 0.4 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 E1、E2、E3、EE2, 1 h 的去除率为 97%, 5 h 的去除率为 99%;而在污水处理厂采取的一个实际污水体系中,10 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 HRP 在 1 h 内可将 0.4 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的雌激素去除 88%, 8 h 的去除率可达 100%. 另外他们还探索了 pH、温度、HRP 剂量对于雌激素去除率的影响,其最佳 pH 值为 7,温度为 25 $^{\circ}\text{C}$. 李洪枚^[32]优化了 HRP 催化氧化 E2 的体系,确定反应的适宜 pH 值为 6.5,最适温度为 25 $^{\circ}\text{C}$, H_2O_2 与 E2 反应计量比为 1:2 时效果较佳,反应时间为 60 min 时, E2 的去除率可达 94.8%. 通过上述研究可知,在 HRP 催化去除雌激素类的污水过程中,反应速度和 HRP 的剂量正相关,该反应的最适 pH 值约为 7,温度为 25 $^{\circ}\text{C}$;最适 H_2O_2 的用量有一定的范围,低于最适 H_2O_2 浓度范围时,适当增加 H_2O_2 的用量,反应速度会明显加快;但高于最适 H_2O_2 浓度范围时,过量的 H_2O_2 会抑制 HRP 的催化活性,降低雌激素的去除率.

Sakuyama 等^[33]研究了 HRP 对双酚 A (BPA)、壬基酚 (*p*-NP)、辛基酚 (*p*-OP), 这些具有雌激素效应的化合物的催化去除行为. 发现 HRP 对 BPA、*p*-NP 及 *p*-OP 催化反应最适宜的 pH 值分别为 8.0、7.0 和 5.0. 另外他们通过对 HRP 对 BPA 的去除降解行为进行详细的研究后发现, BPA 可以迅速地被 HRP 催化去除, 最适合的反应温度为 20 °C, 催化反应的快慢和 HRP 剂量直接相关. 利用雄性日本青鳉 (*Oryzias latipes*) 进行 BPA 雌激素效应的分析后发现, HRP 对 BPA 的催化氧化有效地消除了 BPA 的雌激素效应. 对降解产物的分析显示绝大部分氧化产物为聚合物, 另外还有部分 4-异丙烯基苯酚生成. Huang 等^[34]对 HRP 催化去除 BPA 进行了较为系统的研究, 尤其是在产物形成及反应路径方面做了详细的阐述. 结果表明, 40 min 内, 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 BPA 能够被 0.5 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 HRP 去除 70%, 1.0 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 HRP 去除率约为 95%; 最适的 H_2O_2 与 BPA 的剂量比约为 1:1. 通过 LC-MS 和 GC-MS 对反应产物进行鉴定分析以及结合分子计算, 推测了合理的反应路径. 即: 在初始的步骤中, 两分子的 BPA 通过分子间结合反应, 形成一个聚合物, 并且形成一个阳离子自由基; 该阳离子自由基会发生后续的取代反应或者与 BPA 形成的产物之间发生二次聚合反应. Li 等^[35]在一种含水、表面活性剂和有机溶剂的反相胶团体系中, 对 HRP 对 BPA 的去除进行了研究. 他们发现, 1 h 内, 0.5 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 HRP 对 0.01 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ BPA 的去除率为 80%; 最适的 H_2O_2 与 BPA 的剂量比约为 2:1; 最适 pH 值约为 7, 温度为 40 °C. Xu 等^[36]将 HRP 固定于磁性丝纤蛋白上进行酶促电催化去除 BPA, 反应 2 h, 施加 1.6 V 电压, 以及 O_2 流速为 25 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时, 0.5 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 HRP 对 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BPA 的去除率为 80%; 最适 pH 值为 5, 温度为 25 °C.

综述以上文献可知, HRP 催化去除 EDCs 的研究大多集中于优化反应条件如 pH、温度、HRP 剂量、污染物初始浓度、 H_2O_2 剂量等. HRP 由多个同工酶组成, 等电点为 pH 3—9, 最适 pH 因供氢体不同而稍有差异, 但多在 pH = 5 左右^[37], 而从文献总结可知, 污染物不同时常常最适合的反应条件也不相同; 也有一些研究深入地探讨了 HRP 催化去除污染物的反应机制, 另外将固定化的酶以及将酶催化和物理化学方法相结合的方法, 应用于 EDCs 的去除也开始有了一定的发展.

3.2 LiP 催化去除水体中 EDCs 的研究

目前, 关于白腐菌降解环境中污染物的研究报道很多, 而直接利用纯 LiP 催化去除环境中污染物的研究还相对较少. 相关报道有, LiP 能够高效去除亚甲基蓝等染料; 还有一些学者分别研究了 LiP 对四环素、土霉素、酰氨基咪唑、儿茶酚及其同系物的降解去除效率. 结果表明, 在 LiP 酶活性较高的条件下, 在 5 min 之内便能将四环素和土霉素降解 95%; 另外, LiP 催化去除儿茶酚及其同系物的反应能够进行, 但对不同底物的去除效率有很大差异.

利用 LiP 酶来催化去除内分泌干扰物的报道大部分都是关于能够产生 LiP 酶的真菌去除内分泌干扰物的. 例如, Lee 等^[38]发现白腐真菌 *S. hirsutum* 和 *H. insulare* 能够去除 BPA, 在 7 到 14 d 的培养期内, BPA 的去除率可达 99% 以上. 并且通过 MCF-7 细胞以及 pS2 基因表达来检测雌激素效应发现经过白腐真菌处理过 BPA 后, 其雌激素效应可以完全被消除. Hirano 等^[39]同样也发现白腐担子真菌 *Pleurotus ostreatus* 产生的木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶能够有效地去除 BPA, 12 d 内的去除率可达 80% 以上. Kimura 等^[40]将纯的 LiP 酶负载于一种有机介质后能够有效地去除壬基酚, BPA 和 2,4-二氯酚, 反应 1 h 的去除率分别为 81%、50% 和 22%. Róźalska 等^[41]利用一种木质素降解菌 *Glioccephalotrichum simplex* 实现了对 NP 的高效降解, 并提出了一种前瞻性的降解途径. 结果表明, 在 24 h 内, 这种菌能将培养基内 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 初始浓度的 NP 降解去除 88%, 对 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 初始浓度的 NP 降解去除率为 50%, 另外本实验还发现在含有葡萄糖共基质的培养基中, NP 的初始浓度会影响菌株对糖类的代谢.

Mao 等^[30-31, 42-43]系统地研究了纯的 LiP 酶对人工合成的和天然存在的雌激素在各种条件下的催化去除率. 发现 LiP 能够高效地催化去除水中雌激素, 该反应的最优 pH 值在 4 左右、最优 H_2O_2 浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; pH 或 H_2O_2 浓度的进一步升高都会降低该反应的反应效率; 反应体系中藜芦醇的存在能够提高 LiP 对雌激素的催化去除效率, 反应 20 min 便能将 19 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 17 β -雌二醇 (E2) 100% 去除. 而在无藜芦醇存在的体系中, 反应 60 min, 初始浓度为 19 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 E2 的去除率仅为 40%; LiP 催化去除 E2 反应生成的主要产物是聚合物, 只有少量 E2 被降解为雌酮 (E1), 并且他们认为聚合产物的生成机理是 E2 自由基聚合机理, 即 LiP 催化 E2 反应失去一个氢原子形成自由基, 自由基与自由基之间交叉

聚合从而形成二聚物和三聚物;通过对雌激素效应分析得知,程序性加酶过程能够有效地将受 E2 污染水体中的雌激素效应彻底去除。

综上所述,将 LiP 应用于催化去除 EDCs 的研究目前还较少,这可能是由于 LiP 酶难以分离提纯而使得研究受到限制.此外,已知纯化后的 LiP 的等电点为 3.5 左右,最适酶活温度为 35—55℃,最适 pH 值为 2—5^[44].LiP 对 EDCs 类污染物具有较好的催化去除能力,最适反应条件如 pH、温度、H₂O₂ 剂量等因污染物不同而有所区别;LiP 去除 EDCs 生成的产物以聚合产物为主。

4 HRP 和 LiP 催化去除酚类 EDCs 的 QSAR 研究

定量结构活性关系(QSAR, Quantitative Structure Activity Relationships),是指化合物分子结构与其反应活性之间的定量相关关系.而对于环境科学领域来说,主要是指寻求化合物的降解性和理化参数之间的相关性,通过分析测量或计算化合物的特征参数而建立的相关性模型.近年来,结合 QSAR 方法技术在阐述酶对化合物催化反应机理上得到了广泛的发展.将 QSAR 技术应用于酶催化研究上,不仅可以预测结构性质相似的化合物的酶促反应,而且还可以帮助人们深入地了解酶和底物的作用过程,更清晰的阐述反应机理,从而为人们有目的地修饰酶的结构,设计合成人工酶,为酶的工程应用提供一定的理论依据.QSAR 技术在 HRP、LiP 催化去除酚类 EDCs 的研究上也得到一些进展。

人们初期对过氧化物酶催化反应的 QSAR 研究主要集中在构建底物分子结构性质参数和反应速率之间的关系.一些传统的 QSAR 方法对酶催化底物反应研究通常是在反应速率和底物分子的 E_{HOMO} 、 E_{LUMO} 、原子电荷分布和哈密特常数(σ)之间寻求建立相关性而进行的.然而这样建立的相关性关系往往是值得推敲的,比如 Sakurada 等^[45]报道酶化合物 II 的反应活性与取代酚类化合物的 E_{LUMO} 之间存在较强的线性关系($r=0.86, 0.89$),然而 Hosoya 等^[46]研究了类似化合物后却认为两者之间并不存在相关关系;又如 Bordelau 和 Bartha 研究表明化合物 II 的反应活性与取代酚类化合物羟基氧上的原子电荷线性相关,而 Hosoya 和 Sakurada 却认为该线性关系的存在是无法证实的^[45-47].综上所述可以发现,传统的 QSAR 方法一般是把酶对底物催化反应速率的差异归因于底物的分子结构或底物的电子结构的差异性,却忽略了酶与底物之间的绑定结合过程.即传统的 QSAR 方法实施的前提是假设各个底物与酶结合的过渡态模版都是一样的,是一个“硬性”的过程,所以推出导致反应性不同的只是由于底物自身的状态不同.但实际上由于蛋白质的多变性,在酶催化反应过程中,不同底物对酶蛋白质的影响可能是不同的,所引起的蛋白质变化也可能是不同的,实际上酶促反应是一个“软性”的过程.因此,采取传统方法研究酶催化反应所得出的 QSAR 模型仅适用于底物分子结构极其类似,引起酶蛋白的变化类似的情况。

一些新颖的 QSAR 方法,如将能代表酶-底物结合过程中的特征参数引入 QSAR 分析,在 HRP 及 LiP 催化底物反应的 QSAR 研究上取得了很大的进展.Colosi 等^[7]结合 QSAR 理论方法,对 HRP 催化去除雌激素做了一系列的研究.结果表明,在 HRP 催化去除雌激素的反应过程中,底物分子酚环上质子与 HRP 酶的氨基酸 HIS42 上 δN 之间的距离在底物的反应性上起了非常重要的作用.从实验角度,该课题组还运用基因改造技术将底物与氨基酸之间的距离缩短,结果发现,改造后的酶对底物的反应性大大的增强^[48-49].另外,作者还发现对于 HRP 催化去除雌激素混合体系中,通过底物分子体积(V_{M})和水合能(ΔE_{HYD})两个常数建立的 QSAR 模型可以准确地预测 HRP 酶对各种雌激素催化去除的效率^[50].Cheng 等^[51]对 HRP 催化去除 4 种雌激素及苯酚进行分子热力学分析后发现,该反应是一个“熵驱动,焓滞缓”的反应过程,高键能短键距的底物分子有利于反应的发生.Mao 等^[42]采用类似的方法研究 LiP 催化酚类雌激素化合物反应的 QSAR 关系后发现,LiP 催化雌激素反应速率常数(k_{CAT})与底物酚环上羟基中氢原子和氨基酸 HIS47 中 δN 之间的距离有很好的线性关系,并由此建立了定量结构-活性相关关系式.同时,HRP 及 LiP 的催化反应机理相似,它们都含有一个铁卟啉催化中心,其催化活性是由 heme 及周围氨基酸残基组成的催化空腔所调控的。

由于二者相似的研究方法,以及 HRP 与 LiP 的反应活性中心的相似性,可以对 HRP 和 LiP 的催化反应的 QSAR 研究做以下对比和总结,以寻求得出一个广泛性规律.Colosi 等^[7]研究了 HRP 催化 15 个酚类化合物的初始反应速率常数,发现 HRP 催化氧化酚类化合物反应速率常数与两个参数—— E_{HOMO} 和底物酚环羟基中氢原子与氨基酸 HIS42 中氮原子之间的距离(H-HIS42)有关($R^2=0.96$).而 Mao^[41]

通过对 LiP 催化酚类雌激素化合物的初始反应速率常数的研究中发现 LiP 的催化反应速率常数只与距离(H-HIS47)相关($R^2 = 0.82$),并未发现其与 E_{HOMO} 之间有明显的线性关系.而产生这个现象的原因可分析为除了 E1 其它 3 个化合物之间的 E_{HOMO} 值非常接近.通过这个启发,观察 Colosi 等^[7]所研究的 15 个化合物的 E_{HOMO} 值可发现其中 11 个化合物的 E_{HOMO} 值都很接近,基本分布在 -7.14 eV 周围.因此对于上述 11 个 E_{HOMO} 值接近的化合物,只用一个距离参数($\mu\text{H-HIS42}$)作为独立变量便可建立回归方程($R^2 = 0.90$).这样筛选部分化合物只用距离参数作为独立变量,可将 HRP 与 LiP 的催化反应定量结构-活性相关关系式绘制成图 3.

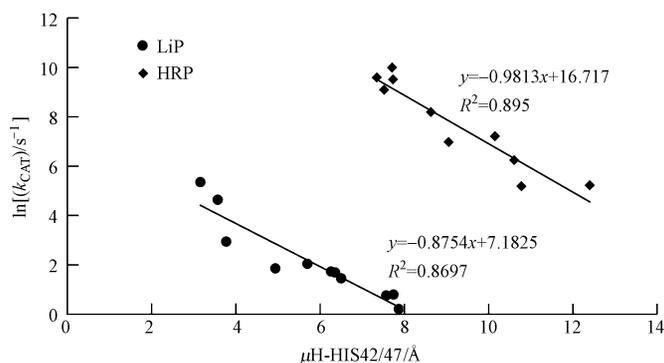


图 3 $\ln(k_{\text{CAT}})$ 值与模拟测定距离之间的关系(数据获得于文献[7, 42])

Fig. 3 Corrections between $\ln(k_{\text{CAT}})$ and the simulation-measured distance

由图 3 所示, $\ln(k_{\text{CAT}})$ 值与模拟测定距离之间表现出了很好的相关性.这说明 HRP 中氨基酸 HIS42 与 LiP 中的氨基酸 HIS47 的功能相似,也说明了两反应过程中电子转移机理相似,即电子都是从底物转移到与 heme 临近的组氨酸上,催化反应速率的快慢与组氨酸和底物之间的距离相关.这也为人们在今后有目的地改造活性中心相似的酶提供一定的理论参考.另外,这种研究方法对于其它活性中心的酶对底物反应性的研究也提供一种前瞻性可借鉴的方法.

5 结论

在污水处理及污水回用的过程中,对包括内分泌干扰物在内的废水中各种微量污染物的控制,是十分紧迫和必要的,酶处理技术作为一种绿色经济有效方法是值得探索研究的.利用酶的催化氧化作用处理酚类内分泌干扰物污染是近年来受到重视的新方法,该方法不仅能有效地降低水中低浓度有毒有机污染物的含量,同时也降低了毒性,是一种很有潜力的废水深度处理方法.而通过 QSAR 研究酶的催化活性中心结构、氧化剂类型和降解功能机制间的关系、根据氧化性与稳定性间的关系有目的地改造酶的结构,筛选更高效经济的酶具有深远的意义.

另外,关于酶处理酚类废水的工作机理和环境因素尚未完全明确,酶结构变化与功能性质的关系也需要深入地研究;游离酶在酶促催化反应后存在着酶失活并且难以回收等问题,严重限制了酶处理技术的产业化应用.对于复杂的实际废水体系,用单一酶法处理,一般很难达到要求,因此实验室的研究与实际应用还有一段很大的距离;由于天然酶来源的有限性,对处理含酚废水是远远不够的.因此发展固定化酶技术以及开发高耐受性的酶使酶处理技术的成本大大降低、提高经济效益是酶处理技术的发展方向;研究修饰酶、人工酶及超酶等酶工程将使得酶具有更广泛的应用空间.

参 考 文 献

- [1] USEPA. Special report on environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis[M]. Washington D C: Environmental Protect Agency, 1997
- [2] Petrovic M, Eljarrat E, Lopez de Alda M J, et al. Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2004, 378(3): 549-562
- [3] Snyder S A, Adham S, Redding A M, et al. Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals[J]. Desalination, 2007, 202(1/3): 156-181
- [4] Khanal S K, Xie B, Thompson M L, et al. Fate, transport, and biodegradation of natural estrogens in the environment and engineered

- systems[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(21): 6537-6546
- [5] Kolpin D W, Furlong E T, Meyer M T, et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U. S. streams, 1999—2000: a national reconnaissance[J]. *Environmental science & technology*, 2002, 36, 1202-1211
- [6] Kashiwada S, Ishikawa H, Miyamoto N. et al. Fish test for endocrine disruption and estimation of water quality of Japanese rivers[J]. *Water Research*, 2002, 36: 2161-2166
- [7] Colosi L M, Huang Q, Weber Jr W J. Quantitative structure-activity relationship based quantification of the impacts of enzyme-substrate binding on rates of peroxidase-mediated reactions of estrogenic phenolic chemicals[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(12): 4041-4047
- [8] Vazquez-Duhalt R, Westlake D W S, Fedorak P M. Lignin peroxidase oxidation of aromatic compounds in systems containing organic solvents[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(2): 459-466
- [9] Nicell J, Bewtra J, Biswas N, et al. Reactor development for peroxidase catalyzed polymerization and precipitation of phenols from wastewater[J]. *Water Research*, 1993, 27(11): 1629-1639
- [10] Aitken M D, Venkatadri R, Irvine R L. Oxidation of phenolic pollutants by a lignin degrading enzyme from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Water Research*, 1989, 23(4): 443-450
- [11] Auriol M, Filali-Meknassi Y, Adams C D, et al. Natural and synthetic hormone removal using the horseradish peroxidase enzyme: temperature and pH effects[J]. *Water Research*, 2006, 40(15): 2847-2856
- [12] Auriol M, Filali-Meknassi Y, Adams C D, et al. Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater: Efficiency of horseradish peroxidase and laccase from *Trametes versicolor* [J]. *Chemosphere*, 2008, 70(3): 445-452
- [13] Auriol M, Filali-Meknassi Y, Tyagi R D, et al. Oxidation of natural and synthetic hormones by the horseradish peroxidase enzyme in wastewater[J]. *Chemosphere*, 2007, 68(10): 1830-1837
- [14] Khan U, Nicell J A. Horseradish peroxidase-catalysed oxidation of aqueous natural and synthetic oestrogens[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2007, 82(9): 818-830
- [15] Manimekalai R, Swaminathan T. Removal of hazardous compounds by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2000, 22(1): 29-33
- [16] Choinowski T, Blodig W, Winterhalter K H, et al. The crystal structure of lignin peroxidase at 1.70 Å resolution reveals a hydroxy group on the C^β of tryptophan 171: a novel radical site formed during the redox cycle[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 286(3): 809
- [17] Xu J, Cai R, Wu X, et al. New approach to determination of phenoxyl free radicals by stopped-flow spectrofluorimetry[J]. *Analytical letters*, 2006, 39(9): 2025-2038
- [18] Klibanov A M, Alberti B, Morris E, et al. Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from waste waters[J]. *J Appl Biochem*, 1980, 2(5): 414-421
- [19] Kwang-Soo S, Chang-Jin K. Decolorisation of artificial dyes by peroxidase from the white-rot fungus, *Pleurotus ostreatus*[J]. *Biotechnology Letters*, 1998, 20(6): 569-572
- [20] Ward G, Hadar Y, Dosoretz C G. Lignin peroxidase-catalyzed polymerization and detoxification of toxic halogenated phenols[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2003, 78(12): 1239-1245
- [21] Nakajima R, Yamazaki I. The mechanism of oxypoxidase formation from ferryl peroxidase and hydrogen peroxide[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262(6): 2576-2581
- [22] Arnao M, Acosta M, Del Rio J, et al. A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1990, 1041(1): 43-47
- [23] Nakamoto S, Machida N. Phenol removal from aqueous solutions by peroxidase-catalyzed reaction using additives[J]. *Water Research*, 1992, 26(1): 49-54
- [24] Ator M A, De Montellano P R O. Protein control of prosthetic heme reactivity. Reaction of substrates with the heme edge of horseradish peroxidase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262(4): 1542-1551
- [25] Ator M A, David S K, de Montellano P R O. Structure and catalytic mechanism of horseradish peroxidase. Regiospecific meso alkylation of the prosthetic heme group by alkylhydrazines[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262(31): 14954-14960
- [26] Wariishi H, Gold M H. Lignin peroxidase compound III: Formation, inactivation, and conversion to the native enzyme[J]. *Febs Letters*, 1989, 243(2): 165-168
- [27] Mao L, Lu J, Gao S, et al. Transformation of 17β-estradiol mediated by lignin peroxidase: The role of veratryl alcohol[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2010, 59(1): 13-19
- [28] Wu Y, Taylor K E, Biswas N, et al. Comparison of additives in the removal of phenolic compounds by peroxidase-catalyzed polymerization [J]. *Water Research*, 1997, 31(11): 2699-2704
- [29] Nicell J, Saadi K, Buchanan I. Phenol polymerization and precipitation by horseradish peroxidase enzyme and an additive[J]. *Bioresource Technology*, 1995, 54(1): 5-16
- [30] Mao L, Huang Q, Lu J, et al. Ligninase-mediated removal of natural and synthetic estrogens from water: I. Reaction behaviors[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(2): 374-379
- [31] Mao L, Lu J, Habteselassie M, et al. Ligninase-mediated removal of natural and synthetic estrogens from water: II. reactions of 17β-estradiol[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(7): 2599-2604
- [32] 李洪枚. 辣根过氧化物酶催化氧化 17β-雌二醇的研究[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(23): 12314-12316, 12318
- [33] Sakuyama H, Endo Y, Fujimoto K, et al. Oxidative degradation of alkylphenols by horseradish peroxidase[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2003, 96(3): 227-231
- [34] Huang Q, Weber Jr W J. Transformation and removal of bisphenol A from aqueous phase via peroxidase-mediated oxidative coupling

- reactions: Efficacy, products, and pathways[J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39(16): 6029-6036
- [35] Li H, James A N, Biocatalytic oxidation of bisphenol A in a reverse micelle system using horseradish peroxidase [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99, 4428-4437
- [36] Xu J, Tang T, Zhang K, et al. Electroenzymatic catalyzed oxidation of bisphenol — A using HRP immobilized on magnetic silk fibroin nanoparticles[J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46, 1160-1165
- [37] 张丽华. 辣根过氧化物酶在酚类废水中的应用[J]. *山西大同大学学报(自然科学版)*, 2012, 28(3): 35-39
- [38] Lee S M, Koo B W, Choi J W, et al. Degradation of bisphenol A by white rot fungi, *Stereum hirsutum* and *Heterobasidium insulare*, and reduction of its estrogenic activity[J]. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2005, 28(2): 201-207
- [39] Hirano T, Honda Y, Watanabe T, et al. Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2000, 64(9): 1958-1962
- [40] Kimura M, Michizoe J, Oakazaki S, et al. Activation of lignin peroxidase in organic media by reversed micelles[J]. *Biotechnology and bioengineering*, 2004, 88(4): 495-501
- [41] Różalska S, Szewczyk R, Długoński J. Biodegradation of 4-*n*-nonylphenol by the non-ligninolytic filamentous fungus *Gliocephalotrichum simplex*: A proposal of a metabolic pathway[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 180(1): 323-331
- [42] Mao L, Colosi L M, Gao S, et al. Understanding ligninase-mediated reactions of endocrine disrupting chemicals in water: Reaction rates and quantitative structure-activity relationships[J]. *Environmental science & technology*, 2011, 45(14): 5966-5972
- [43] Mao L, Huang Q, Luo Q, et al. Ligninase-mediated removal of 17 β -estradiol from water in the presence of natural organic matter: Efficiency and pathways[J]. *Chemosphere*, 2010, 80(4): 469-473
- [44] Asgher M, Shah S A H, Ali M, et al. Decolonization of some reactive textile dyes by white rot fungi isolated in Pakistan [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, 22(1): 89-93.
- [45] Sakurada J, Sekiguchi R, Sato K, et al. Kinetic and molecular orbital studies on the rate of oxidation of monosubstituted phenols and anilines by horseradish peroxidase compound II [J]. *Biochemistry*, 1990, 29(17): 4093-4098
- [46] Hosoya T, Fujii T, Ogawa S. A molecular orbital study on the oxidation of hydrogen donor molecules by peroxidase compound II [J]. *Journal of Theoretical Biology*, 1983, 100(2): 283-292
- [47] Bordeleau L, Bartha R. Biochemical transformations of herbicide-derived anilines: Requirements of molecular configuration[J]. *Canadian journal of microbiology*, 1972, 18(12): 1873-1882
- [48] Klibanov A M, Morris E D. Horseradish peroxidase for the removal of carcinogenic aromatic amines from water[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1981, 3(2): 119-122
- [49] Colosi L M, Huang Q, Weber Jr W J. Validation of a two-parameter quantitative structure-activity relationship as a legitimate tool for rational re-design of Horseradish Peroxidase[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 98(1): 295-299
- [50] Zheng W, Colosi L M. Peroxidase-mediated removal of endocrine disrupting compound mixtures from water[J]. *Chemosphere*, 2011, 85(4): 553-557
- [51] Cheng W, Harper W F. Chemical kinetics and interactions involved in horseradish peroxidase-mediated oxidative polymerization of phenolic compounds[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2012, 50: 204-208

Peroxidase-catalyzed removal of phenolic endocrine disrupting chemicals from water

FENG Yiping MAO Liang DONG Shipeng GAO Shixiang*

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing, 210023, China)

ABSTRACT

As an “emerging” class of contaminants, endocrine disrupting chemicals (EDCs) are attracting increased public concern due to their potential for adversely impacting wildlife, aquatic biota and human health by disrupting the endocrine system. In natural environment, the widely distributed horseradish peroxidase (HRP) and lignin peroxidase (LiP) have strong oxidizing ability and are capable of catalyzing degradation of estrogens, BPA and many other EDCs. This review summarizes the current state of knowledge on HRP and LiP including their properties, and catalytic oxidation mechanism. The research progress on EDCs removal by HRP and LiP catalytic oxidation are overviewed by summarizing the relevant literature. It provides a basis for the removal of EDCs by peroxidase catalyzed reaction in the wastewater treatment plant, and meanwhile proposes the future direction of development.

Keywords: endocrine disrupting chemicals (EDCs), horseradish peroxidase (HRP), lignin peroxidase (LiP), QSAR.