

微波促进辣根过氧化物酶降解酚类废水研究

张 锋

(宝鸡文理学院 化学化工学院 陕西省植物化学重点实验室, 陕西 宝鸡 721013)

摘要:在微波-辣根过氧化物酶(HRP)联合处理工艺条件下对高浓度苯酚废水进行降解研究,运用正交试验、双倒数作图、紫外分析等方法研究了该工艺的催化降解特性。结果表明:微波-HRP联合工艺降解酚类废水最佳反应条件为温度 60 °C,辐照时间 5 min,微波功率 550 W。在最佳降解条件下,对 60 mmol/L 苯酚溶液的苯酚降解率为 91.2%。降解动力学参数 K 为 0.025 63,微波-HRP联合工艺不影响 HRP 的米氏常数 K_m 值,但最大反应速率 v_{max} ,催化常数 K_{cat} 值提高 13.4%,证明了微波-HRP联合工艺具有明显协同效应,在降解高浓度苯酚溶液时,有利于提高 HRP 的催化效率和苯酚降解率。

关键词:微波;辣根过氧化物酶;酚类废水;降解

中图分类号:X 131.2

文献标识码:A

文章编号:1005-9954(2017)06-0006-06

DOI:10.3969/j.issn.1005-9954.2017.06.002

Microwave-induced accelerating of phenolic wastewater degradation with HRP

ZHANG Feng

(Shaanxi Key Laboratory of Phytochemistry, Department of Chemistry and Chemical Engineering, Baoji University of Arts and Science, Baoji 721013, Shaanxi Province, China)

Abstract: High concentration phenol wastewater was degraded under the conditions of microwave and horseradish peroxidase (HRP) combined treatment. The catalytic degradation characteristics of reaction process were investigated by means of methods containing orthogonal experiment, double reciprocal plot and UV analysis. The experimental results show that the degradation efficiency to 60 mmol/L phenol solution is 91.2% during the optimal degradation conditions, which are 60 °C, 5 min irradiation time and 550 W microwave power. The degradation kinetic parameter K was 0.025 63, and K_m of HRP was not affected during reaction process. But other kinetics constants of v_{max} and K_{cat} were improved by 13.4%, which was the direct evidence to the synergistic effect of microwave - HRP joint technology in degradation process. It was beneficial to improve the catalytic efficiency and phenol degradation rate when HRP was used as catalyst.

Key words: microwave; horseradish peroxidase; phenolic wastewater; degradation

以苯酚为代表的酚类废水毒性大、污染范围广,不经处理直接排放会对人类健康及环境造成极大危害与污染^[1-2]。辣根过氧化物酶(HRP)能够催化过氧化氢氧化芳香族化合物,用其处理酚类废水效率高、专一性强、反应条件温和^[3-4]。但酶的催化活性易受到化学环境、中间产物等多种因素影响,在实际应用中面对高浓度酚类废水,所需求的酶量较高,处

理成本大,因此对该类处理工艺有必要进行优化来拓展其实用性。

微波(MW)的频率为0.3—300 GHz,波长在1 mm—100 cm。人们利用其穿透性强、热惯性小等特点开发其在环保领域方面的应用^[5-6]。但是微波单独用于酚类物质降解则效率较低,不适合高浓度有机废水的降解^[7]。所以经常作为辅助手段与其

收稿日期:2016-07-23

基金项目:陕西省科技厅工业攻关项目(2016GY-226,2014K08-36);陕西省植物化学重点实验室项目(14JS005、12JS008);宝鸡文理学院重点项目(ZK12033)

作者简介:张锋(1982—),男,硕士,讲师,主要从事生物催化研究,电话:18791704159,E-mail: jimmy0217@126.com。

他酚类处理方法联合使用,例如:纳米 TiO_2 光催化^[8]、活性炭吸附^[9]等。微波耦合不同类型水处理技术的新型处理工艺显示出一定技术优势,有必要对其深入研究,进而拓展有机废水处理技术基础研究与工程应用。

本文在前期工作基础上,以苯酚溶液为含酚废水模型,在 HRP 降解苯酚工艺基础上引入微波辐照,对高浓度苯酚溶液进行降解实验,探讨微波效应对 HRP 降解酚类废水效率的影响作用,进而研究该工艺的最适反应条件和动力学特征。

1 材料与方法

1.1 试剂

辣根过氧化物酶(HRP,上海源聚生物技术有限公司出品)。苯酚,质量分数 30% 的 H_2O_2 溶液,硫酸,盐酸,氢氧化钠,四氨基安替比林,铁氰化钾均为 AR(分析纯)试剂。磷酸盐缓冲溶液(改变磷酸二氢钠和磷酸氢二钠比例使 pH 在 5—9 之间变化)。

1.2 实验方法

1.2.1 微波-HRP 联合降解苯酚

实验装置如图 1 所示,取 0.8 mol/L 苯酚溶液 7.5 mL、pH 7.0 的磷酸盐缓冲液 91.6 mL、0.3 mol/L 过氧化氢 0.4 mL、1 mg/mL HRP 酶液 0.5 mL 依次加入反应器,100 r/min 搅拌条件下充分混匀。开启微波仪,加热至实验需要温度后,降低功率至 50 W,维持体系温度不变。通过控制冷却水流量及流速来满足实验特定温度要求。反应结束从接收瓶中取出上清液测定残留苯酚浓度。为了确定最佳工艺条件,根据表 1 所列三因素四水平值,按照 $L_9(3^4)$ 正交表设计试验,以苯酚的去除率 η 为评价指标,确定最佳工艺。

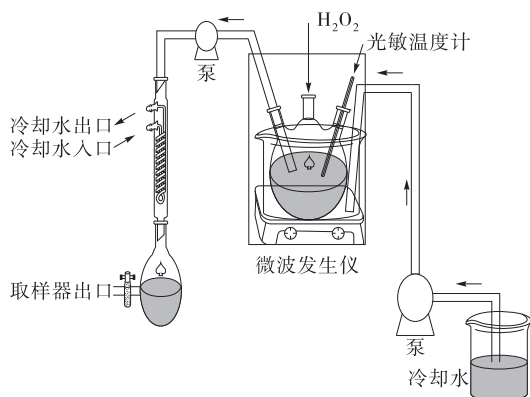


图 1 实验装置

Fig. 1 Experimental facility

表 1 实验因素条件

Table 1 Experiment element condition

因素	水平			
	1	2	3	4
温度/°C	40	60	80	100
时间/min	1	3	5	7
功率/W	150	350	550	750

1.2.2 苯酚浓度测定

按照国家标准《水质 挥发酚的测定 4-氨基安替比林分光光度法》(HJ 503—2009)测定溶液中苯酚浓度,按下面公式计算苯酚去除率。

$$\eta = 1 - \frac{c_1}{c_0} \quad (1)$$

式中: η 为酚类去除效率; c_1 为处理后苯酚残留浓度,mmol/L; c_0 为处理前苯酚浓度,mmol/L。

1.2.3 HRP 催化速率测定

酶催化速率按照文献[10]方法测定。根据测得的吸收值与反应时间计算吸光度值变化率 K 。利用消光系数[$\varepsilon = 7\ 210\ \text{L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$]将测得的转化率 K 按照下式换算为酶催化速率 v 。

$$v = \frac{K \times 1\ 000}{\varepsilon L} \quad (2)$$

式中: v 为酶催化速率,mmol/(L·min); K 为吸光度变化率, min^{-1} ; ε 为消光系数, $\text{L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$; L 为液层厚度,cm。

2 结果与分析

2.1 最佳降解工艺条件

正交试验结果如表 2 所示,各因素对苯酚降解效率 η 影响大小顺序为体系温度 > 辐照时间 > 微波功率。当体系温度升高,反应速率加快, η 值逐渐升高,但温度达到 100 °C 时, η 值明显降低,这与 HRP 活性受到抑制和 H_2O_2 分解有关。辐照时间的长短也会影响 η 值。Han 等^[11]报道了微波在 UV/ H_2O_2 体系中对反应物具有活化效果,从而提高了酚类物质的降解效率。但微波兼具热效应及非热效应。辐照时间过长会破坏生物大分子间次级键,造成酶的空间结构逐渐发生变化,进而导致催化活性降低。徐建等^[12]、池建伟等^[13]利用微波分别对哈密瓜汁中的过氧化物酶、香蕉中的多酚氧化酶进行处理并考察了其催化活性,均证明了微波作用时间会影响酶的活性。且实验体系不同,针对不同反应物的最佳功率值各不相同,这些因素亦会影响 η 。

表 2 确定的最佳降解条件:体系温度 60 °C,辐照时间 5 min,微波功率 550 W。在此条件下,苯酚的降解效率为 75.6%。因此,后续实验均在此基础上进行,保持温度、辐照时间、微波功率参数取值不变。

表 2 降解过程各因素的正交试验结果

Table 2 Orthogonal experimental results of phenol degradation

序号	温度/°C	功率/W	时间/min
1	40	150	1
2	40	350	3
3	40	550	5
4	40	750	7
5	60	150	3
6	60	350	1
7	60	550	7
8	60	750	5
9	80	150	5
10	80	350	7
11	80	550	1
12	80	750	3
13	100	150	7
14	100	350	5
15	100	550	3
16	100	750	1
K_1	29.03	26.73	27.75
K_2	53.68	36.65	28.60
K_3	41.60	43.38	47.30
K_4	20.13	37.68	40.78
R	33.56	16.65	19.56

2.2 不同降解工艺的苯酚去除效率

HRP-微波联合降解与对照组实验结果如图 2 所示。在 4 组苯酚浓度条件下,微波辐照下 HRP 降解工艺均高于对照组。随着苯酚浓度增大,其降解效率与对照组对比优势更加明显,这证明微波辐照有利于提高苯酚降解效率。文献[14]表明微波对酚类物质的降解主要通过高温辐照氧化进行,但速率较慢,这与图 2 实验结果一致。 H_2O_2 能够直接氧化苯酚并使其生成聚合物,微波能起到活化 H_2O_2 作用从而加强氧化效果,这与 Renzo Carta 等^[9]的研究结果一致。而 HRP 是 H_2O_2 的高效催化剂,能加快 H_2O_2 氧化降解苯酚速率,加上微波辐照的活化作

用,从而获得较高的苯酚降解率。但当苯酚浓度达到 120 mmol/L 时,实验组苯酚降解率均明显下降。这与催化过程中 HRP 失活及 H_2O_2 的分解有关。Buchanan 等^[15]报道了催化过程产生的自由基和聚合沉淀物是造成过氧化物酶在失活的主要原因。Huang Q 等^[16]进一步研究证实了在高浓度苯酚溶液中,形成的多聚体形式聚合物破坏 HRP 的活性中心结构从而影响其催化活性。而加入微波处理后,有利于无催化活性的中间体分解,进而提高苯酚降解效率。

虽然利用 HRP 催化降解或微波联合其他手段降解苯酚已有大量相关研究^[5,17-19]。但绝大多数均针对低浓度苯酚废水进行。文献[17-19]等方法普遍存在处理液苯酚浓度小,处理能力弱,反应时间长的问题。且部分方法选用的氧化剂 ClO_2 的 pH 值适用范围窄,无合适催化剂,或长时间微波-超声波反应消耗大量能量,造成处理成本增高。本课题组^[10,21]曾利用氧化石墨烯、层状氢氧化苯甲酸锌为载体对 HRP 进行固定化后用于高浓度苯酚处理,降解效率最高达 75%。但固定化后 HRP 的催化活性均受到一定影响,而且超声波、微波等能量形式的引入会导致固载酶从载体上脱落,造成后处理过程增多。本研究中微波-游离 HRP 联合处理工艺不但增强了处理能力,而且缩短了反应时间,有利于扩大应用范围;同时对延缓 HRP 失活,提高降解效率,降低处理成本有一定效果。

2.3 降解动力学参数

文献结果表明微波-超声波- H_2O_2 联合去除苯酚反应的降解动力学为零级反应^[16],而酶促反应动力学遵循 Michaelis-Menten 方程,当底物浓度足够大时,进一步推导可知其满足零级反应表达式条件,本实验条件下,苯酚浓度(60 mmol/L)远大于体系中 HRP 浓度,故在微波-HRP- H_2O_2 联用条件下,降解反应为零级反应。

在 HRP 质量浓度为 3 $\mu\text{g/mL}$,其余物质浓度同 1.2.3 节,不同工艺的降解动力学方程如图 3 所示。降解动力学常数遵循如下顺序: $K(\text{HRP-微波}) > K(\text{HRP}) > K(\text{微波-}H_2O_2) > K(H_2O_2) > K(\text{微波})$ 。这表明联用微波-HRP 降解工艺,具有一定协同效应,既能充分发挥 HRP 酶催化的高效性,又有利于利用微波热辐射分解催化过程中的中间体,加速苯酚降解。

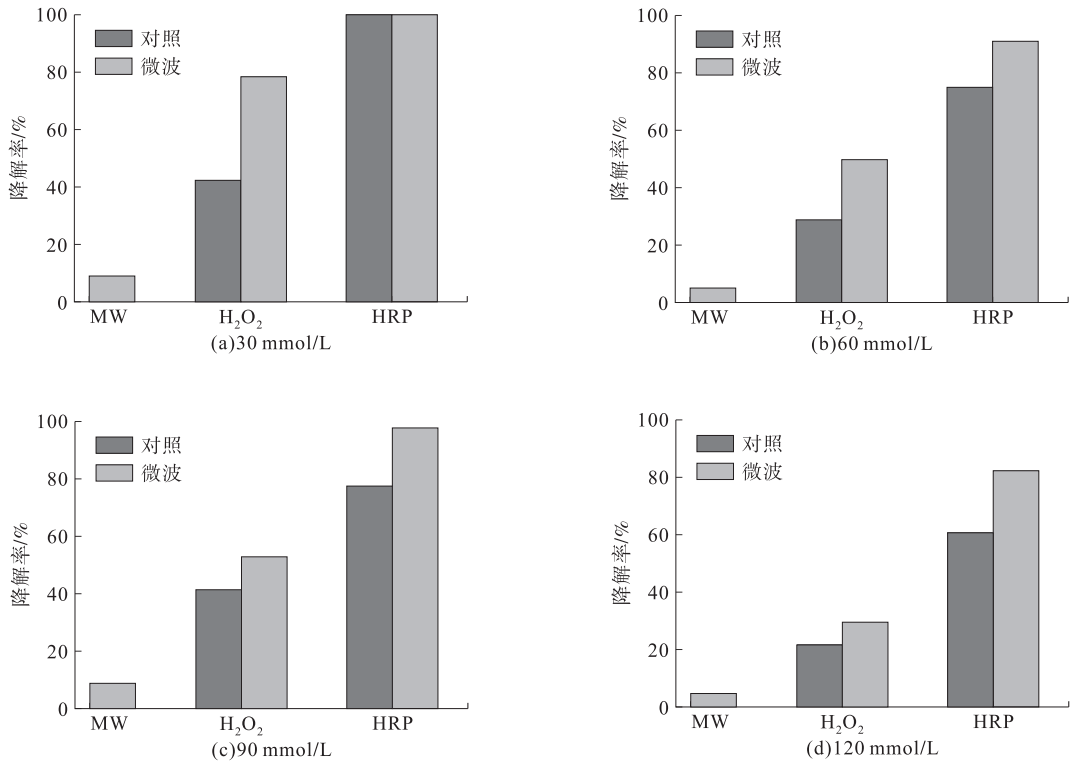


图 2 不同苯酚浓度下各工艺降解率比较

Fig. 2 Comparison of removal efficiencies with different degradation process and phenol concentration

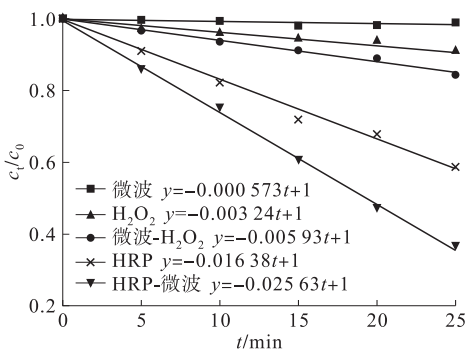
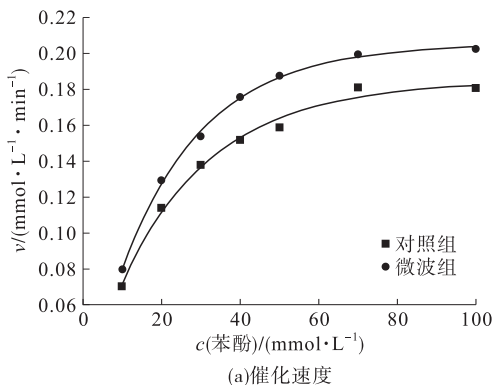
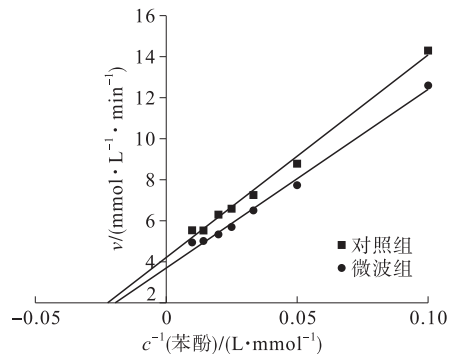


图 3 不同工艺条件下苯酚降解动力学参数比较

Fig. 3 Comparison of degradation kinetic parameters of phenol under different process



(a) 催化速度



(b) Lineweaver-Burk 曲线

图 4 催化速率随苯酚浓度变化和 Lineweaver-Burk 曲线

Fig. 4 Reaction rate vs phenol concentration and Lineweaver-Burk curve

2.4 HRP 催化反应动力学参数

微波-HRP 联用工艺下 HRP 的催化速率、林-贝氏 (Lineweaver-Burk) 双倒数曲线如图 4(a), (b) 所示, 无微波条件下 HRP 催化结果作为对照组。

实验组和对照组的催化速率随苯酚浓度增大逐渐加快, 并且有极大值。这符合酶促反应的基本特征, 证明微波-HRP 联用工艺处理没有改变其生物催化特性。双倒数作图曲线如图 4(b) 所示, 根据拟合直线计算出相应条件下米氏常数 K_m 、最大反应速率 v_{\max} 及催化常数 K_{cat} 值, 结果见表 3。

表3 HRP催化动力学参数

Table 3 Kinetic parameters of HRP

样品	$K_m /$ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	$v_{\max} /$ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	$K_{\text{cat}} /$ s^{-1}
实验组	23.67	0.27	39.82
对照组	23.70	0.24	35.20

2组工艺条件下,HRP的 K_m 值基本不变,说明微波辐照不影响HRP对底物苯酚的亲合力,但实验组 v_{\max} , K_{cat} 值比对照组分别提高13.41%,13.45%。文献[22]表明,HRP在催化过程中与 H_2O_2 能形成惰性中间体,从而影响HRP活性,降低催化反应速率。因此在该催化过程中,部分过量的 H_2O_2 类似于HRP的活性抑制剂。但加入微波处理后,它的非热效应加强了体系内的极性分子运动,提高了 H_2O_2 分子活性,降低催化反应活化能。其瞬时的热效应也有助于分解过量的 H_2O_2 ,避免其对HRP的活性抑制,从而提高了反应速率。

综合已有文献结果和图3实验结果得出,催化降解过程形成的聚合物沉淀会对游离HRP产生吸

附、包裹作用,从而抑制HRP活性。为了验证上述推论,做了不同苯酚浓度下降解率随时间变化曲线,结果如图5所示。随着苯酚浓度增大,微波辐照组与对照组的最终苯酚降解效率差值逐渐增大。在苯酚浓度30 mmol/L条件下,实验组与对照组差别不大,而当苯酚浓度为120 mmol/L时,2组降解率分别为65.59%,47.48%,效率提高了38.14%。表3数据显示实验组的催化初速度仅比对照组高出13.41%。这说明在苯酚降解过程中,微波不仅起到了活化 H_2O_2 加快反应速度的作用,并且对于维持体系中HRP的活性,延长其作用时间起到了积极作用。从而使得最终降解效率增量高于催化初速率增量。这一趋势在高浓度苯酚条件下更为明显。高浓度苯酚溶液在反应过程中形成高聚合度沉淀物的数量增大,酚氧自由基的生成速率加快,该条件下HRP活性及催化效率均受到较大影响。而微波-HRP联合处理工艺引入了微波辐照,其特殊效应有助于降解酚类物质,维持HRP催化活性。这对于实际生活中高浓度酚类废水降解具有一定指导意义。

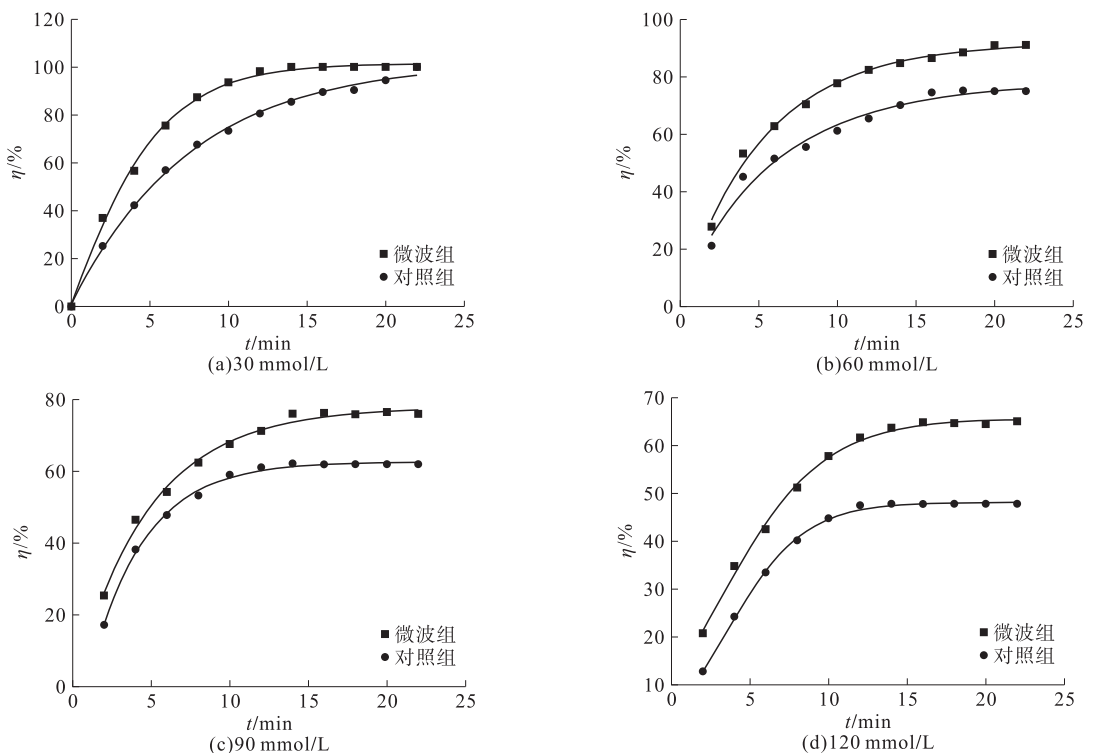


图5 不同苯酚浓度下各工艺降解率动力学曲线

Fig. 5 Degradation kinetic curves of phenol with different phenol concentration

3 结论

(1)微波-HRP联用能够有效降解高浓度苯酚。

在最佳降解条件下,对60 mmol/L苯酚溶液的苯酚去除率为91.2%。

(2)微波-HRP 联用具有协同效应,降解效率高于分别单独使用 HRP, H_2O_2 进行苯酚降解,动力学常数遵循如下顺序: $K(\text{HRP-微波}) > K(\text{HRP}) > K(\text{微波-H}_2\text{O}_2) > K(\text{H}_2\text{O}_2) > K(\text{微波})$ 。

(3)降解动力学表明,微波-HRP 联用工艺不改变 HRP 催化 K_m 值, v_{\max} 增大 13.41%。在不同浓度苯酚降解体系中,微波效应有助于活化 H_2O_2 , 加快降解反应速度,进一步氧化分解聚合物,提高降解率,对惰性中间体也有破坏作用,有利于提高酶的循环利用效率。在高浓度苯酚降解体系中,降解率增加更明显。

参考文献:

- [1] BARRON M. Toxicological review of phenol in support of summary information on the integrated risk information-system (IRIS) [M]. Washington DC: US Environmental Protection Agency, 2002.
- [2] AIK C L, JIA Q P. Adsorption of phenol by oil-palm-shell activated carbons in a fixed bed [J]. Chemical Engineering Journal, 2009, 150 (3): 455-461.
- [3] GOMEZ J, BASTIDE, HIDALGO J, et al. Immobilization of peroxidase on glass beads: An improved alternative for phenol removal [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39 (5): 1016-1022.
- [4] CHENG J, YUS M, ZUO P. Horseradish peroxidase immobilized on aluminum-pillared interlayered clay for the catalytic oxidation of phenolic waster [J]. Water Research, 2006, 40 (2): 283-290.
- [5] MAEDA M, AMEMIYA H. Chemical effects under simultaneous irradiation by microwaves and ultrasoandund [J]. New Journal of Chemistry, 1995, 19: 1023-1028.
- [6] LAGHA A, CHEMAT S, BARTELS P, et al. Micro-wave ultrasound combined reactor suitable for atmospheric sample preparation procedure of biological and chemical products [J]. Analisis, 1999, 27: 452-457.
- [7] 艾智慧. 微波/超声辅助光催化降解氯酚的研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2004.
- [8] 张锋, 赵立芳. 微波-超声波联合再生活性炭及其用于处理含酚废水 [J]. 石油化工, 2012, 41 (11): 1312-1316.
- [9] RENZO C, FRANCESCO D. The enhancing effect of low power microwaves on phenol oxidation by the Fenton process [J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2013, 1 (10): 1292-1300.
- [10] 张锋, 赵立芳. 微波-超声波促进固载辣根过氧化物酶降解苯酚特性 [J]. 精细化工, 2016, 33 (4): 452-460.
- [11] HAN D H, CHA S Y, YANG H Y. Improvement of oxidative decomposition of aqueous phenol by microwave irradiation in UV/ H_2O_2 process and kinetic study [J]. Water Research, 2004, 38 (10): 2782-2790.
- [12] 许建, 廖亮, 再吐娜·买买提, 等. 间歇式低温微波处理对哈密瓜汁品质及过氧化物酶活性的影响 [J]. 北方园艺, 2014, 8: 119-122.
- [13] 池建伟, 张勇, 魏振承. 微波处理对香蕉多酚氧化酶活性的影响 [J]. 广东农业科学, 2006, 11: 86-88.
- [14] 赵德明, 金宁人, 吴纯鑫. 微波/过氧化氢系统催化降解苯酚水溶液 [J]. 化工学报, 2007, 58 (7): 1736-1739.
- [15] BUCHANAN A, NICELL J A. Model development for horseradish peroxidase-catalyzed removal of aqueous phenol [J]. Biotechnology and Bioengineering, 1997, 54 (5): 251-261.
- [16] HUANG Q, HUANG Q G, ROGERA, et al. Inactivation of horseradish peroxidase by phenoxyl radical attack [J]. Journal of the American Chemical Society, 2005, 127 (11): 1431-1437.
- [17] BI X Y, WANG P, JIANG H. Treatment of phenol wastewater by microwave induced ClO_2 - CuO_x/Al_2O_3 catalytic oxidation process [J]. Journal of Environmental Sciences, 2007, 19 (12): 1510-1515.
- [18] WU Z L, BERNDOND R, GIANCA. Degradation of phenol under combined irradiation of microwaves and ultrasound [J]. Environ Sci Technol, 2008, 42 (6): 8083-8087.
- [19] 张锋. 辣根过氧化物酶降解苯酚废水催化特性研究 [J]. 应用化工, 2012, 41 (7): 1204-1207.
- [20] ZHANG F, ZHENG B, ZHANG J L, et al. Horseradish peroxidase immobilized on graphene oxide: Physical properties and applications in phenolic compound removal [J]. J Phys Chem C, 2010, 114 (18): 8469-8473.
- [21] BERGLUND G. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution [J]. Nature, 2002, 417 (6887): 463-468.

欢迎投稿, 欢迎订阅, 欢迎刊登广告!