

# 深山含笑叶过氧化物酶对双酚 A 清除效应研究

赵广华<sup>1,2</sup>,肖 强<sup>1,2\*</sup>,洪 健<sup>1</sup>

<sup>1</sup>湖北民族学院 生物资源保护与利用湖北省重点实验室;<sup>2</sup>湖北民族学院林学院艺术学院,恩施 445000

**摘要:**深山含笑是一种常绿乔木,具有较好的园林观赏价值,其叶片在每年春天新旧叶交替时,会陆续凋落而不能实现其经济价值;我们前期研究发现深山含笑成熟叶片具有较高的过氧化物酶活性,而过氧化物酶在内分泌干扰物生物酶法降解途径中发挥着重要作用。为充分开发深山含笑叶的经济价值,提高资源的利用效率,我们对深山含笑叶过氧化物酶进行了纯化并初步研究了其性质;在此基础上,进一步研究了深山含笑叶过氧化物酶在降解环境污染物双酚 A 上的特性。结果显示,经过非离子表面活性剂(吐温-80)抽提、双水相萃取、DEAE-Sepharose 离子交换层析,首次从深山含笑叶片中快速分离提纯结合态过氧化物酶,相对可溶性过氧化物酶纯化倍数为 55.2 倍,回收率为 19%。该酶的比活力为 18999 U/mg 蛋白,以愈创木酚为反应底物的最佳 pH 值为 4.5,最适温度为 50 °C;具有较宽的 pH 稳定范围,热稳定性较好,60 °C 以下不易失活。深山含笑叶过氧化物酶对 BPA 具有良好的清除能力,在 pH4~7,温度 30~40 °C, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/BPA 摩尔浓度之比达 0.8 条件下,经过 3 h,10000 U/L POD 对 0.2 mmol/L BPA 清除率达 90% 以上,深山含笑过氧化物酶在酚类物质生物酶法催化降解途径中具有潜在的重大利用价值。

**关键词:**过氧化物酶;纯化;双水相萃取;双酚 A;深山含笑

中图分类号:Q55

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)2-0338-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.2.025

## Studies on functions of the removing bisphenol A by peroxidase from the leaves of *Michelia maudiae* Dunn

ZHAO Guang-hua<sup>1,2</sup>,XIAO Qiang<sup>1,2\*</sup>,HONG Jian<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hubei key Laboratory of Biological Resources Protection and utilization (Hubei University for Nationalities);<sup>2</sup>School of Forestry and Horticulture, Hubei University for Nationalities, Enshi 445000, China

**Abstract:** *Michelia maudiae* Dunn is evergreen arbor species with high ornamental value. The leaves will gradually withered and can't achieve its economic value when the old and new leaves update. It was found that the leaves of *M. maudiae* Dunn have the peroxidase activity in the previous studies. Regarding the compelling effect of peroxidase in process of phenols biodegradation, the purification and properties of the peroxidase from the leaves of *M. maudiae* Dunn were studied to fully develop the value of the leaves and to improve the resource utilization efficiency. Based on that, its function of removing bisphenol A was further investigated. The results showed that, after extracted by Tween-80, aqueous two-phase extraction, and DEAE-Sepharose Fast Flow ion-exchange chromatography, the yield of bound peroxidase purified from the leaves of *M. maudiae* Dunn was 19%, and purification fold compared with soluble peroxidase was 55.2 with specific activity of 18999 U/mg. The optimal pH for the substrate of guaiacol was 4.5. The optimal temperature was 50 °C. The activity of the enzyme can be maintained for a long time below 60 °C (good thermal stability). *M. maudiae* Dunn leaves peroxidase has good scavenging ability on BPA. Under the conditions of pH4-7, 30-40 °C and reach the ratio of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/BPA to 0.8, the clearance rate of 0.2 mmol/L BPA derivatives for 10000 U/L *M. maudiae* Dunn leaves peroxidase was 90% in 3 hours later. *M. maudiae* Dunn leaves peroxidase had convincing future in researches of phenols biodegradation.

**Key words:** peroxidase; purification; aqueous two-phase extraction; BPA; *Michelia maudiae* Dunn

深山含笑 (*Michelia maudiae* Dunn), 又名光叶白兰、莫夫人玉兰, 木兰科含笑属, 常绿乔木。中国特有物种, 主要分布在浙江、福建、湖南、广东、广西、

收稿日期:2017-12-26 接受日期:2018-04-12

基金项目:国家自然科学基金(31260057,31460203)

\* 通信作者 Tel:86-015971698508; E-mail:1992022@hbmy.edu.cn

贵州等地。具有生长快、材质好,叶片冬季不凋,早春花色纯白艳丽、味清香等特性。其树型美观,是较好的园林观赏树种;我们在研究木兰科植物酶谱多样性时,发现深山含笑叶片具有较高过氧化物酶活性。

过氧化物酶(Peroxidase, POD, EC 1.11.1.7)是一种以过氧化氢为电子受体,通过催化底物发生氧化反应改变结构,引起底物理化性质发生变化的生物催化剂。它广泛分布于动植物和微生物体内,在细胞中发挥清除过氧化氢作用<sup>[1]</sup>。POD 在植物细胞壁形成、生长激素失活、次生物质代谢以及防卫反应应答等多种生理过程中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。POD 催化活性在工业上也用于石化、造纸、纺织等行业废水中酚类和芳香胺类污染物高效降解<sup>[2]</sup>。国内外许多学者开展了对辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)、大豆过氧化物酶(Soybean peroxidase, SBP)和刺桐叶过氧化物酶等用于酚类物质清除的条件优化、动力学特性和反应机理研究<sup>[3-5]</sup>,展现了 POD 在去除环境水体中微量酚类污染物中的良好前景。

双酚 A(Bisphenol A, BPA)是一种重要的有机化工原料,广泛应用于聚碳酸酯、环氧树脂、阻燃剂、增塑剂、橡胶抗老化剂等生产中,用这些材料生产的终端产品,如婴儿奶瓶、微波炉饭盒、食品包装盒、饮料罐等均含有 BPA。BPA 的广泛应用带来了日渐严重的环境污染:在日本垃圾处理场和堆肥水样中均可检出 BPA,其平均浓度达 269  $\mu\text{g}/\text{L}$ <sup>[6]</sup>。BPA 等酚类化合物是内分泌干扰物(Endocrine disrupting Chemicals, EDCs)的重要成员之一,20 世纪 80 年代以来的系列研究表明, BPA 对水生生物和人体细胞具有雌激素作用和生物学毒性<sup>[7,8]</sup>;能干扰人体内正常激素的分泌,从而影响生殖功能,增加肿瘤的发病率;即使是低剂量染毒,也能造成严重的损伤。EDCs 具有生物富集、效用持久以及生理学响应浓度极低等特性,使得其在水体中很难通过传统水处理技术去除。目前对环境中 BPA 的消除主要采用生物降解、光催化的化学降解、物理吸附以及生物酶降解等方法;其中,基于 POD 的降解方法具有高效、反应条件温和等优点受到广泛关注。

为了探讨深山含笑叶片 POD 在清除水体中 EDCs 中应用前景,开发其叶片经济价值,我们对深山含笑叶片 POD 进行了快速分离纯化;在此基础上进一步考察了其在水体中 EDCs 类物质 BPA 的去除

效果及反应条件。该研究对于降低使用 POD 处理废水的运营成本,探索新的具有较强清除能力的 POD,通过优化反应条件,有效去除 EDCs 类污染物具有重要价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本研究以湖北民族学院植物园内种植的 10 年深山含笑(*Michelia maudiae* Dunn)(经湖北民族学院林学院园艺学院易咏梅教授鉴定)成熟叶为原料。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 粗酶液制备

称取成熟深山含笑树叶 500 g,加入 10 g PVPP,在液氮中迅速研磨,然后加入 2000 mL 含 10% 聚乙烯吡咯烷酮(PVP-K30)和 2 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)的磷酸缓冲液(50 mmol/L, pH7.8),室温下连续搅拌 22~24 h。4 层纱布过滤,经测定滤液所得可溶态 POD(Soluble Peroxidase, SPOD)的活性较低(见图 1),丢弃,留下含水滤渣约 180 g;按照 Sukalovic 等<sup>[9]</sup>的方法,即采用 1% (w/v)吐温 80, 1 mol/L NaCl 提取滤渣中的结合态 POD(Bound Peroxidase, BPOD)。室温下搅拌提取 2~5 h,在 4  $^{\circ}\text{C}$  12000 g 条件下,离心 20 min,得到大约 800 mL 粗酶液,置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱冷藏待用。

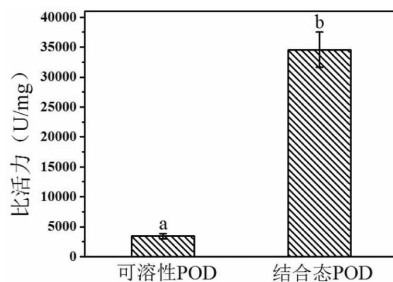


图 1 可溶性 POD 与结合态 POD 比活力比较

Fig. 1 Comparison of specific activity between soluble POD and bound POD

注:不同字母表示在  $P < 0.05$  水平上差异显著。

Note: Values followed by a different letter are significantly different at the 0.05 probability level.

#### 1.2.2 双水相萃取(Aqueous two-phase extraction, ATPE)

上述约 800 mL 粗酶提取液在搅动中缓慢加入 80 g 硫酸铵粉末,充分溶解后,再缓慢加入 112 g 聚乙二醇 4000(PEG 4000),并在振荡器上振荡,使其形成 14% PEG 4000(W/V)-10%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (W/

V) 的双水相体系, 转移至分液漏斗中静置萃取 2 h 或者将双水相体系转入离心管中, 5 000 g 离心 5 min 左右, 其萃取除色效果如图 2 所示。然后取下相(盐相), 转移至透析袋中, 蒸馏水透析除盐; 每 8 h 更换一次水, 直至透析液用 1% BaCl<sub>2</sub> 检测无沉淀产生为止(一般在有磁力搅拌器搅拌的情况下, 更换 3 次水蒸馏水即可达到除盐效果)。

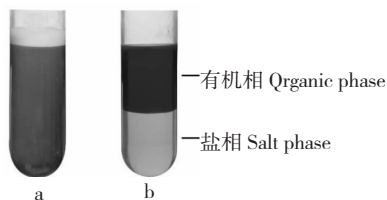


图 2 14% (w/v) PEG 4000-10% (w/v) 硫酸铵双水相萃取效果图

Fig. 2 Photograph showing the effect of ATPE with phase composition 14% (w/v) PEG 4000/10% ammonium sulfate (w/v)

注: a: 粗酶液, b: 双水相萃取体系

Note: a: Crude extract, b: System with Aqueous two-phase extraction

### 1.2.3 蛋白质层析

根据 pH 梯度预实验可知, 目标酶蛋白在离子浓度小于 50 mmol/L、pH 大于 9.5 (Tris-HCl 缓冲液) 的条件下可被 DEAE- Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱(2.6 cm × 20 cm)吸附。调整酶液 pH 为 9.5, 离子浓度为 20 mmol/L, 采用系统泵进样 400 mL, 用 pH 9.5、20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液进行吸附, 然后用含 NaCl 线性梯度(0 ~ 1 mol/L)的 Tris-HCl 缓冲液洗脱 12 个柱体积, 流速为 1.0 mL/L。每管收集 5 mL, 在 280 nm 波长下检测蛋白含量, 测定酶活。收集有酶活性部分, 经透析脱盐后冷冻干燥保存待用。

### 1.2.4 蛋白质电泳

根据预试验可知, 碱性电泳法无法有效分离深山含笑 POD, 在高 pH 条件下, 部分 POD 残留于加样孔和未进入浓缩胶; 部分 POD 未进入分离胶; 而酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳<sup>[10]</sup>可以实现良好分离。

### 1.2.5 POD 酶活性、蛋白含量测定

参考 Amako 等<sup>[11]</sup>的方法并稍修改, 测定体系为 4 mL, 包括 1 mL 40 mmol/L 愈创木酚, 1 mL 40 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1.9 mL 100 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-柠檬酸缓冲液(pH6.0)。加入 0.1 mL 酶液后启动反应, 于波长 470 nm, 30 °C 下记录 OD 值变化。1 个酶活性

单位定义为测定条件下每分钟 OD<sub>470</sub> 变化 0.1 所需的酶量。蛋白质含量测定采用 Bradford 染色法<sup>[12]</sup>, 以牛血清蛋白作标准蛋白。

### 1.2.6 POD 酶学性质研究

取真空冷冻干燥的酶粉以适量缓冲液溶解后, 进行酶的温度稳定性、最适温度、酸碱稳定性、最适 pH 等酶学性质的研究, 参照洪健等<sup>[13]</sup>的方法。

### 1.2.7 研究不同酶活性、pH、温度、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度以及反应时间对 BPA 清除的影响

采用 50 mL 棕色瓶中避光反应, 配制 20 mL 反应混合溶液。反应体系配制如下: 准确移取一定量 BPA 标准储备液及 pH 缓冲溶液于 50 mL 棕色瓶中, 加入一定量的深山含笑叶 POD, 使反应体系总体积达到 20 mL, 并在恒温水浴锅中保温一段时间后, 再加入一定量 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 并同时计时, 分别在 1、3、5、15、45、90、120、180 min 取样。取样时加入甲醇终止反应。待取样完成后, 加入适量浓度为 10 mg/mL 的硫酸铝钾母液, 过夜沉淀后离心取上清。采用高效液相色谱-飞行时间质谱联用法(UPLC-TOF-MS)测定上清液中 BPA 浓度。

## 1.3 分析方法

### 1.3.1 色谱分析条件

Agilent 公司 ZORBAX C<sub>18</sub> (2.1 × 50 mm, 1.8 μm) 色谱柱。流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液, 35% 乙腈等度洗脱, 柱温 25 °C, 体积流量 0.2 mL/min。

### 1.3.2 质谱分析条件

ESI 离子源负模式, 干燥气温度 350 °C, 流速 10 L/min; 雾化器压力 45 psig, 毛细管电压 3 500 V, 毛细管出口电压 150 V, 锥孔电压 65 V, 采集速度 1.5 spectra/s, 选择离子(EIC)采集方式, 选定的分子离子[M-H]<sup>-</sup>的质荷比为 227(BPA)。

### 1.3.3 酶纯度分析方法

测定酶活性及蛋白质含量后, 酶的纯化倍数采用以下公式计算:

$$S = U/C \quad \text{公式 1}$$

$$M = C \times V \quad \text{公式 2}$$

$$F = S_1/S_0 \quad \text{公式 3}$$

$$Y = M_1/M_0 \quad \text{公式 4}$$

注: (1) S 指酶的比活力(U/mg), S<sub>1</sub> 指纯化后酶的比活力, S<sub>0</sub> 指粗酶比活力;

(2) U 指酶的活性单位(U/mL);

(3) C 指酶蛋白的浓度(mg/mL);

- (4)  $M$  指酶蛋白含量 (mg),  $M_1$  指纯化后总蛋白含量,  $M_0$  指粗酶总蛋白含量;
- (5)  $V$  指酶液的体积 (mL);
- (6)  $F$  指酶的纯化倍数;
- (7)  $Y$  指酶蛋白的回收率 (%)。

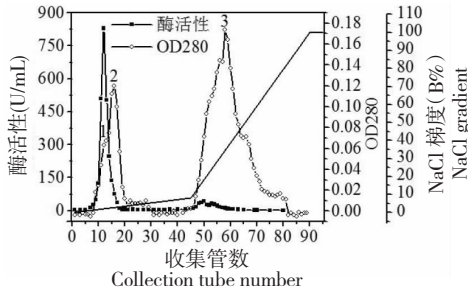


图3 结合态 POD 的 DEAE-Sephacel FF 柱层析分离

Fig. 3 Chromatographic pattern of the BPOD from DEAE-Sephacel FF

## 2 结果与分析

### 2.1 POD 分离纯化

深山含笑叶片经匀浆、过滤、离心后经过双水相萃取除色素、透析后的酶液,进行 DEAE-Sephacel Fast Flow 离子交换层析,得到 3 个峰,峰 1 具有酶活性,但峰 2 和峰 3 酶活性极低(图 3)。收集峰 1,得

到纯化后的 POD,纯化倍数为 5.5 倍,相对 SPOD 纯化倍数为 55.2 倍(表 1),RZ 值可达 1.0 左右。对该纯酶进行非变性垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis, N-PAGE)及 SDS-PAGE 变性电泳,采用联苯胺和考马斯亮蓝分别染色,显示得到单条同工酶带,其分子量大约为 44.51 KD(图 4)。

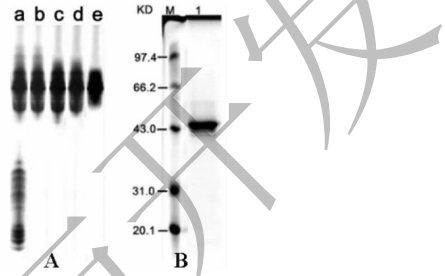


图4 深山含笑叶片 POD 同工酶活性电泳(A)及 SDS 变性电泳(B)

Fig. 4 Electrophoretogram of peroxidase isoenzyme extracted from leaves of *Michelia maudiae* Dunn (A; N-PAGE, B; SDS-PAGE,

注: a: 可溶性 POD b: 结合态 POD c: ATPE d: 透析 e&1: DEAE-Sephacel Fast Flow M: 标准蛋白。

Note: a; SPOD b; BPOD c; ATPE d; dialysis e&1; DEAE-Sephacel Fast Flow M; Marker.

表 1 深山含笑叶片 POD 分离纯化

Table 1 Purification of peroxidase from leaves of *Michelia maudiae* Dunn

纯化步骤 Purification step	蛋白质 Protein (mg)	酶活性 Activity (U)	比活力 Specific activity (U/mg)	纯化倍数 Purification fold	酶活回收率 Activity yield (%)
可溶性 POD SPOD	600	206 400	344	-	-
粗酶液 Crude extract	78	266 560	3 417	1	100
双水相萃取 ATPE	43	258 840	6 020	1.8	97
透析 Dialysis	32	229 242	7 176	2.1	86
DEAE-Sephacel FF	2.7	51 186	18 999	5.6	19

### 2.2 POD 性质

#### 2.2.1 POD 的温度稳定性

将真空冷冻干燥后的纯酶,用适量 pH 5.0 的乙酸缓冲液溶解,1.5 mL 试管分装在不同温度水浴中保存,并以 20 °C 酶活性作为对照,分别测定不同时间的相对酶活。在 80 °C 水浴中保存的纯酶,酶活性迅速下降(图 5),1 h 内酶活性下降至 15% 以下。在 70 °C 和 80 °C 水浴加热 4 h 左右酶活性几乎全部损失。酶活性在 50 °C 水浴加热下无明显损失;而在 60 °C 水浴 1 h,酶活性仍剩余 75%。说明深山含笑

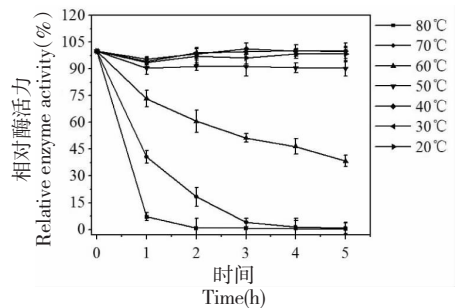


图5 深山含笑叶 POD 的热稳定性

Fig. 5 Stability of temperature of POD from *Michelia maudiae* Dunn leaf

叶 POD 热稳定性较好,不易失活。

### 2.2.2 POD 的 pH 稳定性

将真空冷冻干燥后的纯酶,用适量不同 pH 的缓冲液溶解,在与缓冲液 pH 值相同的条件下分别测定酶活性(图 6),可见 pH 在 5.5~9.5 之间,深山含笑叶 POD 酶活性均保持在较高水平,说明深山含笑叶 POD 酸碱稳定性较好,具有较宽的 pH 适应范围。

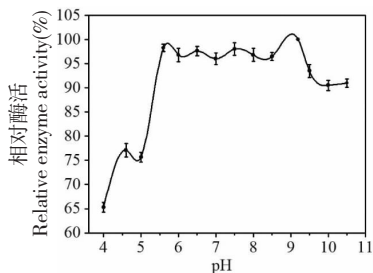


图 6 深山含笑叶 POD 的 pH 稳定性

Fig. 6 Stability of pH of POD from *Michelia maudiae* Dunn leaf

### 2.2.3 POD 的最适温度

反应体系在 Carry 100/300 比色皿恒温夹套上保温,达到预定温度后,加入 0.1 mL 酶液,立即测定 OD<sub>470</sub> 时间变化率;结果显示,在 50 °C 时 POD 酶活性较其他温度下酶活性高(图 7);表明深山含笑叶 POD 最适温度为 50 °C。

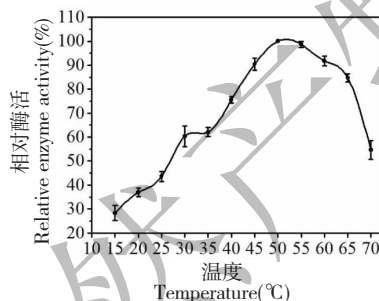


图 7 温度对深山含笑叶 POD 活性的影响

Fig. 7 Effect of temperature on activity of POD from *Michelia maudiae* Dunn leaf

### 2.2.4 POD 的最适 pH

以愈创木酚作为底物,由图 8 可以看出,在 pH 4.0~5.5 条件下,相对酶活性均高于 90%,在 pH 4.5 时达到最高值,表明深山含笑叶 POD 的最适 pH 为 4.5。

## 2.3 POD 对 BPA 的清除效应

### 2.3.1 最佳清除酶浓度确定

取纯化酶少量,用适量 pH 5.0 的乙酸缓冲液溶

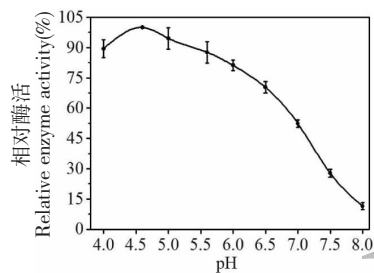


图 8 pH 对深山含笑叶 POD 活性的影响

Fig. 8 Effect of pH on activity of POD from *Michelia maudiae* Dunn leaf

解,添加溶解后的酶适量使反应体系中的酶活性单位分别达到 5 U/mL、10 U/mL、15 U/mL,在 pH 值为 5, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/BPA 为 2 的条件下,将反应混合物置 25 °C 的恒温水浴磁力搅拌器中进行反应。分别在 1、3、5、15、45、90、120 和 180 min 取样,用甲醇和硫酸铝钾终止反应,测定 BPA 浓度。结果(如图 9)显示酶浓度在 15 U/mL 时,BPA 在反应 3 min 后,剩余率低于 10%,反应 90 min 后,BPA 被完全清除。为了研究 POD 清除 BPA 的化学过程,选定 15 U/mL 为合适的酶浓度实验条件。

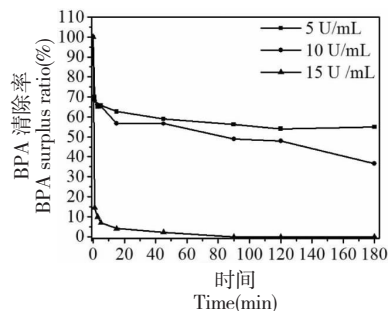


图 9 不同酶浓度对深山含笑叶 POD 清除 BPA 的影响

Fig. 9 Effects of different enzyme concentrations on POD from *Michelia maudiae* Dunn leaf removal of BPA

### 2.3.2 pH 对 POD 清除 BPA 的影响

研究不同 pH 对 POD 清除 BPA 的影响,如图 10 所示,pH 在 4.0~7.0 条件下,经过 3 h 清除反应,BPA 清除率均达到 95% 以上;表明深山含笑叶 POD 在清除 BPA 时具有较广的酸性 pH 范围;但它们在 1 min 钟内达到的清除速率不一致,pH 3.0 仅清除 36.5%,而 pH 7.0 清除率可达 92.3%,在 pH 3.0~7.0 范围内,1 min 内的清除速率随 pH 上升而逐渐上升;pH 8.0~11.0 条件下,清除率均小于 80%;这可能与深山含笑叶 POD 的最适反应 pH 及 pH 稳定性有关,酶的最适 pH 在 4.0~5.5 范围内(图 8),而

酶在 pH 5.5 ~ 9.5 范围内稳定(图 6)。

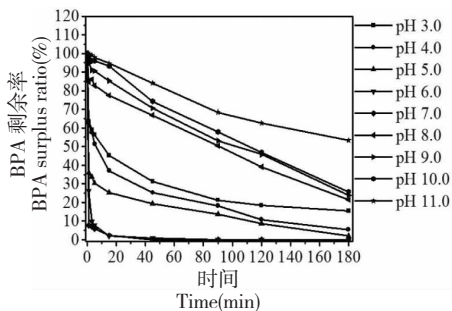


图 10 pH 对深山含笑叶 POD 清除 BPA 的影响

Fig. 10 Effects of different pH on POD from *Michelia maudiae* Dunn leaf removal of BPA

### 2.3.3 温度对 POD 清除 BPA 的影响

研究不同温度对 POD 清除 BPA 的影响,分别在集热式恒温加热磁力搅拌器上操作,控制 pH 为 7.0、酶浓度为 10 U/mL、 $H_2O_2$ /BPA 摩尔浓度比值为 2,反应时间 3 h,在此反应体系中,对清除速度,底物完全清除时间进行比较,从图 11 可见,在 30 ~ 40 °C 范围内,反应 3 h, BPA 清除率达到 90% 以上,当温度达到 60 °C 时, BPA 清除率下降至 53.3%。

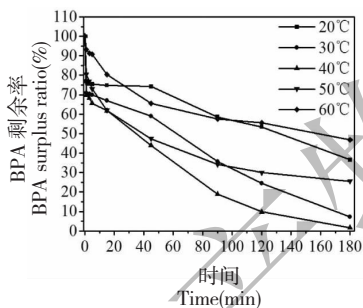


图 11 不同温度对深山含笑叶 POD 清除 BPA 的影响

Fig. 11 Effects of different temperature on POD from *Michelia maudiae* Dunn leaf removal of BPA

### 2.3.4 最佳清除 $H_2O_2$ /BPA 比值确定

研究  $H_2O_2$ /BPA 摩尔浓度比值对 POD 清除 BPA 的影响时,设定比值分别为 0.2、0.5、0.8、1.2、2、5 倍,控制温度、酶浓度、pH 相同,在此条件下,对清除速度、底物完全清除时间进行比较。如图 12 所示,当  $H_2O_2$ /BPA 摩尔浓度比值为 0.2 ~ 2 的范围时,反应 3 h, BPA 清除率可达 95%,但 1 min 内达到的清除速率不同;当比值为 2 时, BPA 清除率可达 51%,当  $H_2O_2$ /BPA 摩尔浓度比值达到 5 倍时,1 min 内 BPA 清除率达到 55.4%,由于高浓度  $H_2O_2$  抑制酶活性(图 13),随后 BPA 清除速率下降,3 h

后 BPA 清除率为 76.7%;确定  $H_2O_2$ /BPA 摩尔浓度比值为 2 倍。

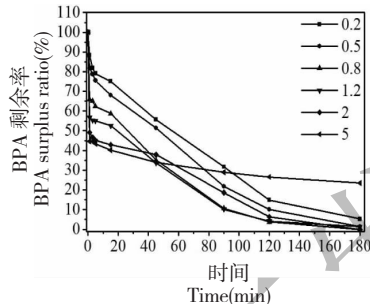


图 12 不同过氧化氢比例对深山含笑叶 POD 清除 BPA 的影响

Fig. 12 Effects of different mole ratio of  $H_2O_2$  to BPA on POD from *Michelia maudiae* Dunn leaf removal of BPA

注:不同字母表示在  $P < 0.05$  水平上差异显著。

Note: Values followed by a different letter are significantly different at the 0.05 probability level.

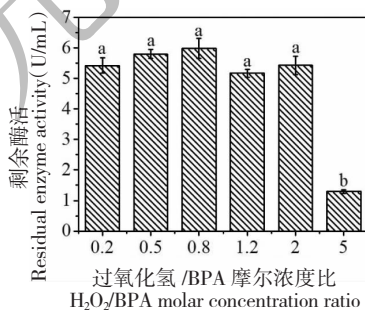


图 13 不同过氧化氢比例对深山含笑叶 POD 清除 BPA 后剩余酶活的影响

Fig. 13 Effects of different mole ratio of  $H_2O_2$  to BPA on residual POD activity from *Michelia maudiae* Dunn leaf removal of BPA

## 3 结论

植物 POD 与逆境胁迫下植物清除细胞内自由基以及植物次生物质合成等生化过程有密切关系<sup>[1]</sup>。已有学者研究了不同植物来源 POD 的性质:皱皮木瓜和日本木瓜的 POD 有 2 个最适 pH 值,分别是 5 和 6 ~ 6.5、5 和 5 ~ 6<sup>[14]</sup>;而纯化后的银杏叶 POD 最适 pH 值为 5<sup>[15]</sup>;木兰科植物厚朴叶 POD 的反应最适 pH 为 6<sup>[13]</sup>;它们的最适反应 pH 较为相近。本研究显示深山含笑叶 POD 最适 pH 为 4.5,与木瓜和银杏叶 POD 最适 pH 比较接近,均在酸性 pH 范围内。银杏叶 POD 经 50 °C 热处理 30 min 后活性剩余 50%,而 SBP<sup>[16]</sup> 在 75 °C 时保温 1 h 仍可保持较高活力,90 °C 下加热 1 h 活性仍未完全消失。

本研究中,深山含笑叶片 POD 在 50 °C 以下水浴 5 h,酶活性无明显损失,在 60 °C 以下水浴加热 2 h,剩余酶活力达 60% 以上;与热稳定性超高的大豆 POD 比较接近,说明深山含笑叶片 POD 耐热性较好,有利于实际生产应用。

金银花 POD 催化愈创木酚氧化的最适反应温度为 30 °C 左右<sup>[17]</sup>;银杏叶 POD 酶促反应最适温度为 37 °C,随着温度升高,酶活力逐渐下降;温度对厚朴叶片 POD 活力影响较小,随温度升高酶活力下降缓慢,75 °C 保温 60 min 后仍然保持 70% 酶活性<sup>[13]</sup>,本研究中同为木兰科植物的深山含笑叶 POD 最适反应温度为 50 °C,在 60 °C 中保温 1 h,酶活性仍剩余 75%,两者具有相似性,而藕带中 POD 在 80 °C 下酶活性基本丧失<sup>[18]</sup>;显示不同植物来源 POD 的热稳定性差异较大。

杜红霞<sup>[19]</sup>探讨了 HRP 和双氧水对 BPA 的降解性能。实验结果表明,该酶促反应的最适温度为 25 °C;最适 pH 值为 6;H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/BPA 最佳比例为 2:1(摩尔比);经过 120 min,0.5 U/mL HRP 对 BPA 的降解效果最好。Duarte-Vázquez 等<sup>[20]</sup>研究了萝卜过氧化物酶(Turnip Peroxidase, TP)对酚类物质的清除效果,结果显示,在 pH4~8,温度 25 °C, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度 0.8 mmol/L 条件下,经过 3 h,1.28 U/L TP 对 0.5 mmol/L 酚类物质 BPA 清除率可达 85%;本研究中,在 pH4~7,温度 30~40 °C, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/BPA 值为 2 的条件下,经过 3 h,10 000 U/L 深山含笑叶 POD 对 0.2 mmol/L BPA 清除率可达 90% 以上。与 Duarte-Vázquez 的研究结果类似,具有较宽的酸性 pH 范围及良好的温度适应性,表明深山含笑叶 POD 具有工业化应用的前景。本研究中, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/BPA 浓度之比达 0.8 以上时,深山含笑叶 POD 对 BPA 清除率显著提高,这一结果与来自 HRP 和 SBP 的研究结论是一致的<sup>[11,21]</sup>。同时,当处于高浓度过氧化氢条件下时,酶清除 BPA 的速率明显降低,与 Flock 等<sup>[5]</sup>研究的高浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 导致 SBP 对 3-氯酚清除率持续下降结果具有一致性,工业应用时应注意高浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对酶活性的抑制作用。

综上所述,经过非离子表面活性剂抽提、双水相萃取、DEAE-Sephrose FF 层析分离,首次从深山含笑叶片分离提纯得到一种热稳定性较高的 BPOD,该酶的比活力可达 18999 U/mg 蛋白,该酶在 pH4~7,温度 30~40 °C, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/BPA 摩尔浓度之比达 0.8 条件下,对 BPA 清除率达 90% 以上。相对于 HRP、TP 以及 SBP 等 POD,在清除 BPA 上,深山含笑叶 POD 具有更宽的 pH 和温度适应范围以及更高的清

除率;且在本研究中采用双水相萃取法,具有容易工业放大、生物相容性好等特点,酶活性回收率高(见表 1),显示了深山含笑叶 POD 将来应用于 EDCs 污染治理的巨大潜力。由于游离酶催化的酚类物质降解反应会导致酶活性逐步丧失,利用酶工程技术进一步探索深山含笑叶 POD 的固定化途径,可以为工业应用提供技术支撑,从而为深山含笑叶经济价值的有效实现提供保障,促进深山含笑综合价值的可持续利用。

#### 参考文献

- 1 Tian GZ, Li HF, Qiu WF. Advances on research of plant peroxidases[J]. Plant Sci J(植物科学学报), 2001, 19: 332-344.
- 2 Ahmedi A, Abouseoud M, Abdeltif A, et al. Effect of diffusion on discoloration of congo Red by alginate entrapped Turnip (*Brassica rapa*) peroxidase[J]. Enzyme Res, 2015: 22-32.
- 3 Nicell JA, Bewtra JK, Biswas N, et al. Enzyme catalyzed polymerization and precipitation of aromatic compound[J]. Water Sci Technol, 1991, 25: 157-164.
- 4 Zhao GH, Xiang YR, Hong J, et al. Removal of endocrine disruptors BPA by *Erythrina variegata* leaves peroxidase[J]. J Hubei Univ for National Nat Sci(湖北民族学院学报: 自然科学版), 2017, 35: 366-369.
- 5 Flock C, Bassi A, Gijzen M. Removal of aqueous phenol and 2-chlorophenol with purified soybean peroxidase and raw soybean hulls[J]. J Chem Technol Biot, 2015, 74: 303-309.
- 6 Yamamoto T, Yasuhara A. Chlorination of bisphenol A in aqueous media: formation of chlorinated bisphenol A congeners and degradation to chlorinated phenolic compounds[J]. Chemosphere, 2002, 46: 1215-1223.
- 7 Suzuki N, Hattori A. Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish[J]. J Pineal Res, 2010, 33: 253-258.
- 8 Nakagawa Y, Tayama S. Metabolism and cytotoxicity of bisphenol A and other bisphenols in isolated rat hepatocytes[J]. Arch Toxicol, 2000, 74: 99-105.
- 9 Šukalovic VHT, Vuletic M, Vučinić Ž. The role of p-coumaric acid in oxidative and peroxidative cycle of the ionically bound peroxidase of the maize root cell wall[J]. Plant Sci, 2005, 168: 931-938.
- 10 Niu HJ, Li JW, Zhang D, et al. Changes of several isoenzymes of biomass in two kinds of photosynthetic bacteria biotransformation mistletoe culture fluid[J]. Microbiology(微生物学通报), 2011, 38: 1043-1050.
- 11 Amako K, Chen GX, Asada K. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants[J]. Plant Cell Physiol, 1994, 35: 497-504.