

文章编号 :1009 - 038X(2002)04 - 0393 - 04

# EDTA 对木质素过氧化物酶在染料脱色中的影响

鲁时瑛, 李华钟, 陈坚

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214036)

**摘要:**在反应液中含 2 mmol/L EDTA 时, 24 h 后染料甲基橙的脱色率比未加 EDTA 的下降约 70%。添加 2 mmol/L EDTA 明显地抑制了木质素过氧化物酶(LiP)对多种染料的脱色。酶动力学研究表明:EDTA 对 LiP 的抑制属非竞争性抑制。添加比 EDTA 稍大量的  $Zn^{2+}$  能解除 EDTA 对 LiP 的抑制,其他多种金属离子也能减轻 EDTA 的抑制作用。

**关键词:**木质素过氧化物酶;乙二胺四乙酸(EDTA);螯合剂;非竞争性抑制;脱色;染料

中图分类号:TQ 464.8

文献标识码:A

## Effect of Ethylenediamine Tetraacetic Acid on Dye-decolorization by Lignin Peroxidase

LU Shi-ying, LI Hua-zhong, CHEN Jian

(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology under Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** The decoloration rate of methyl orange was reduced by 70% after 24 hours when 2 mmol/L ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA) was added in fungal cultures of *Phanerochaete chrysosporium* adding. The decolorations of different dyes were reduced because EDTA inhibited the activity of lignin peroxidase(LiP). Kinetic analysis showed that the reaction was a non-competitive inhibition. When the concentration of  $Zn^{2+}$  was slightly more than that of the EDTA, the EDTA-mediated inhibition to LiP could be reduced. In addition to  $Zn^{2+}$ , several other metal ions were also analyzed to determine their abilities to relieve EDTA-mediated inhibition to LiP.

**Key words:** lignin peroxidase(LiP); ethylenediamine tetraacetic(EDTA); chelator; non-competitive inhibition; decoloration; dye

木质素过氧化物酶是黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)在一些主要营养物质(碳源、氮源等)受到限制时形成的,它对各种异生物质具有独特的降解能力<sup>[1,2]</sup>。大量研究表明,该菌可以降解多种染料<sup>[3]</sup>,包括偶氮类、三苯甲烷类、杂环类、聚合染料等,对底物的氧化表现出高度非特异性的特

点,在染料废水处理方面具有广泛的应用前景<sup>[4]</sup>。降解过程中起主要作用的有两种酶:木质素过氧化物酶(Lignin Peroxidase, LiP)和锰过氧化物酶(Manganese Peroxidase, MnP),它们合成后分泌到胞外,经  $H_2O_2$  启动一系列自由基链反应,依靠氧化还原反应降解各种结构的染料。

收稿日期:2002-03-07; 修订日期:2002-03-12.

作者简介:鲁时瑛(1978-)女,浙江绍兴人,环境工程硕士研究生。

万方数据

目前关于黄孢原毛平革菌降解染料的大量研究主要采用共培养的方式<sup>[5,6]</sup>,在培养开始时或至LiP的酶活达到最大时,将染料加入培养体系共同培养,考察染料的降解脱色情况.研究发现,木质素过氧化物酶对多种染料具有脱色作用<sup>[7]</sup>,但在印染工业中,除染料外,往往要添加染料助剂,有些染料助剂抑制酶对染料的脱色<sup>[8]</sup>.EDTA是染料助剂的一种,为了确证EDTA对LiP的抑制作用,作者以甲基橙为代表,研究了EDTA对染料脱色效果的影响及其作用机理.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种及培养条件

**1.1.1 菌种** 黄孢原毛平革菌(*P. chrysosporium*)WX213,由江南大学生物工程学院微生物实验室提供.

### 1.1.2 培养基制备

基本培养基:参照文献[9],葡萄糖 10 g/L,酒石酸铵 0.2 g/L,苯甲醇 0.54 g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.71 g/L,吐温 80 1 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.56 g/L, VB<sub>1</sub> 0.001 g/L, 邻苯二甲酸缓冲液 10 mmol, 微量元素液 70 mL, pH 4.5.

微量元素液:氨基乙酸 0.6 g/L, NaCl 1 g/L, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g/L, CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.22 g/L, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.56 g/L, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g/L, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.1 g/L, AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·12H<sub>2</sub>O 0.01 g/L, HBO<sub>3</sub> 0.01 g/L, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.01 g/L.

无LiP的培养物:在以上的培养基中添加终质量浓度 0.4 g/L 的酒石酸铵.

**1.1.3 培养条件** 250 mL 三角瓶装液量 90 mL, 接种量为 1×10<sup>6</sup> 个孢子/mL, 培养温度 37 °C, 转速 150 r/min, 培养 5~6 d.

### 1.1.4 染料的脱色

1) EDTA 对甲基橙脱色的影响:在 1.1.3 条件下,培养 6 d 后在培养物中加入一定量的 EDTA,使 EDTA 终浓度分别为 0, 1, 2, 8 mmol/L, 染料终质量浓度为 40 mg/L, 继续培养 1 d.

2) EDTA 对其他染料脱色的影响:在 1.1.3 条件下,培养 6 d 后,在无 LiP 的培养物中加入终质量浓度为 40 mg/L 的各种染料和 2 mmol/L 的 EDTA,在有 LiP 的培养物中加入终质量浓度为 40 mg/L 的各种染料和终质量浓度为 2 mmol/L 的 EDTA.

## 1.2 分析方法

**1.2.1 酶活性的测定** 见文献[9].

**1.2.2 脱色率的测定** 加入染料后混匀,在染料的最大吸收波长(310 nm)下测定初始吸光值  $A$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 启动反应一段时间后测定吸光值  $A_1$ , 根据标准曲线,将  $A$  和  $A_1$  转化为染料浓度  $c$ 、 $c_1$ , 计算该段时间的脱色率<sup>[10]</sup>.

$$\text{脱色率}/\% = (c - c_1) / c$$

**1.2.3 EDTA 对 LiP 酶活的抑制** 在 LiP 酶活测定体系<sup>[9]</sup>中,藜芦醇的浓度分别为 4, 2, 1, 0.67 mmol/L, 每一浓度分别添加终浓度为 0, 1, 2, 8 mmol/L 的 EDTA, 30 °C 下反应 2 min, 测 310 nm 下的吸光度变化.

**1.2.4 Zn<sup>2+</sup>解除 EDTA 对 LiP 酶活抑制作用** 在 LiP 酶活测定体系<sup>[9]</sup>中,分别添加不同量的 EDTA 和 Zn<sup>2+</sup>, 30 °C 反应 2 min, 测 310 nm 下的吸光度变化.

**1.2.5 金属离子减轻 EDTA 对 LiP 酶活抑制作用** 在 LiP 酶活测定体系<sup>[9]</sup>中,添加终浓度为 4 mmol/L 的不同金属离子, 30 °C 反应 2 min, 测 310 nm 波长下的吸光度变化.

## 2 结果与讨论

### 2.1 EDTA 对甲基橙脱色的影响

由图 1 可以看出,EDTA 的加入明显地影响了染料的脱色效果.在未加 EDTA 时,24 h 后脱色率已达到 91.67%, 而相同条件下加入 2 mmol/L 的 EDTA 时,脱色率下降约 70%;加入 8 mmol/L 的 EDTA, 脱色率下降约 83%. 以前的实验证实,起脱色作用的主要是 LiP 和菌球,很有可能是 EDTA 螯合了 LiP 上的某些活性位点,影响了 LiP 的氧化能力<sup>[11]</sup>.

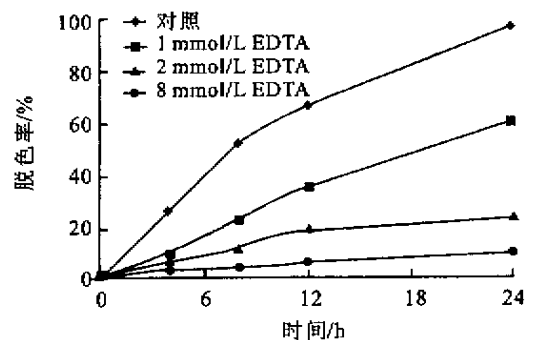


图 1 EDTA 对甲基橙脱色的影响

Fig. 1 Effect of the EDTA on methylene orange decoloration

### 2.2 EDTA 对各种染料脱色的影响

目前印染工业中偶氮类染料使用较为普遍,其次为三苯甲烷类等染料.选取 5 种具代表性的染

料,测定 EDTA 对脱色的影响,见表 1.

表 1 EDTA 对染料脱色的影响

Tab.1 Effect of the EDTA on decoloration of different dyes by LiP

项 目	脱色率/%				
	甲基橙	橙 I	直接湖蓝	结晶紫	次甲基蓝
无 LiP 培养物	25.5	33.6	38.5	40.1	24.4
无 LiP 培养物 + 2 mmol/L EDTA	23.9	32.2	38.0	41.2	25.0
LiP 培养物	88.4	87.6	63.5	53.7	86.5
LiP 培养物 + 2 mmol/L EDTA	40.6	40.8	37.5	45.3	43.3

由表 1 可知,有 LiP 存在时,染料的脱色率远大于无酶存在的情况.该酶对 5 种染料均有显著的脱色效果,其中甲基橙、橙 I 以及次甲基蓝脱色情况最好,脱色率接近 90%,直接湖蓝次之,较难降解的是结晶紫,脱色率只能达到 50%左右.无 LiP 酶活情况下染料也有明显的脱色,24 h 后脱色率至少在 20%以上,此时观察到原本白色的菌球因吸附染料分子而呈现出染料的颜色,说明菌球吸附也是染料脱色的一个重要原因. Cripps<sup>[12]</sup>指出,在 *P. chrysosporium* 除去染料的过程中,生物降解和吸附都起到了重要作用.在无 LiP 的培养物中加入 2 mmol/L EDTA 对脱色基本无影响,而在产 LiP 的培养物中加入 EDTA 后各染料的脱色率有不同程度的下降,很有可能 EDTA 抑制了酶活,或者 EDTA 与反应体系中的某些物质结合后抑制了酶活,进而影响脱色.

2.3 EDTA 抑制 LiP 反应体系的酶动力学

不同浓度的 EDTA 在不同浓度藜芦醇条件下对酶活的抑制情况见图 2.以底物藜芦醇浓度的倒数(1/[s])为横坐标,反应速率的倒数(1/v)为纵坐标,进行线性回归,得出不同 EDTA 添加量下酶反应动力学中的米氏常数  $K_m$  值.

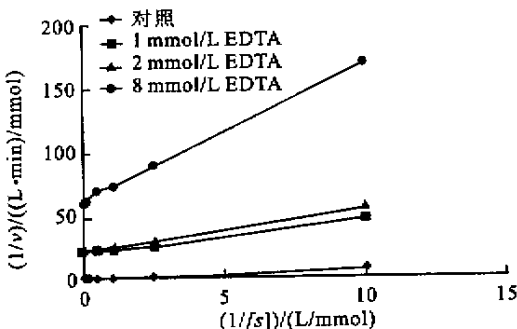


图 2 有 EDTA 抑制时的 Lineweaver-Burk 图(1/v 对 1/[s] 曲线)

Fig.2 Lineweaver-Burk plot of Lip and its inhibition by EDTA

由表 2 得,添加不同量的 EDTA, $K_m$  值基本不变,表明 EDTA 对 LiP 的抑制属非竞争性抑制.EDTA 的结合位点可能是底物的首要结合位点(血红素的集中区),而不是次要结合位点,不会因底物浓度的升高而解除<sup>[13]</sup>.

表 2 不同 EDTA 添加量下的  $K_m$  值

Tab.2  $K_m$  under different concentration of EDTA added

EDTA 添加量/(mmol/L)	米氏常数 $K_m$ /(mmol/L)
0	0.13
1	0.13
2	0.14
8	0.16

2.4 金属离子减轻 EDTA 对 LiP 的抑制作用

2.4.1 不同金属离子减轻 EDTA 对 LiP 抑制作用

在加有 2 mmol/L EDTA 的体系中通过添加 4 mmol/L 不同的金属离子,考察不同金属离子减轻 EDTA 对 LiP 活性的抑制作用.由表 3 可知,4 mmol/L 的  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  和  $Na^+$  能不同程度解除 EDTA 对 LiP 的抑制作用,这与 Tuisel 等的结果基本相符合<sup>[14]</sup>,而  $Mg^{2+}$ ,  $Li^+$ ,  $Ca^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  则对 EDTA 的抑制作用无解除作用,甚至还不同程度地增强了抑制作用.该现象说明,不同类型的金属离子减轻 EDTA 抑制的能力是不同的,它们的作用方式可能存在微妙的差别.

表 3 金属离子减轻 EDTA 对 LiP 的抑制

Tab.3 Reducing of the inhibition of EDTA on LiP with different metal ions

样品	残余酶活/%	样品	残余酶活/%
对照	100	$Na^+$	30.2
EDTA	23.0	$Mg^{2+}$	10.9
$Zn^{2+}$	111.2	$Ca^{2+}$	5.9
$Cu^{2+}$	78.8	$Li^+$	6.8
$Mn^{2+}$	0	$Al^{3+}$	41.6
$Co^{2+}$	64.0		

2.4.2  $Zn^{2+}$  解除 EDTA 对 LiP 的抑制作用

表 4 的结果表明,单独添加  $Zn^{2+}$  对酶活基本没有影响,但添加比 EDTA 稍大量的  $Zn^{2+}$  能较为有效地部分解除 EDTA 的抑制作用.说明并不是  $Zn^{2+}$  促进了酶活,很有可能是  $Zn^{2+}$  与 EDTA 螯合,使 EDTA 脱离酶的活性位点,恢复酶的活性<sup>[11]</sup>.在染料脱色时,考察不加任何物质、只添加  $Zn^{2+}$ ,同时添加 EDTA 和  $Zn^{2+}$  三种情况,发现三者的脱色率

相当.

表4 Zn<sup>2+</sup>解除EDTA对LiP的抑制

Tab.4 Relief of the inhibition of EDTA to LiP with Zn<sup>2+</sup>

项 目	残余酶活/%
对照	100
2 mmol/L Zn <sup>2+</sup>	101.4
1 mmol/L EDTA	21.0
1 mmol/L EDTA + 2 mmol/L Zn <sup>2+</sup>	81.0
2.5 mmol/L Zn <sup>2+</sup>	101.5
2 mmol/L EDTA	23.0
2 mmol/L EDTA + 2.5 mmol/L Zn <sup>2+</sup>	78.8
4 mmol/L Zn <sup>2+</sup>	102.1
2 mmol/L EDTA + 4 mmol/L Zn <sup>2+</sup>	111.3

### 3 结 论

1) EDTA影响染料甲基橙的脱色率,当EDTA浓度为2 mmol/L时,24 h后染料的脱色率比未加EDTA时下降约70%. EDTA影响LiP对多种染料的脱色,极有可能是EDTA抑制了LiP的酶活.

2) EDTA对LiP的抑制属非竞争性抑制,它的存在影响了LiP对底物藜芦醇的氧化.

3) 添加多种金属离子能减轻EDTA对LiP的抑制作用,其中Zn<sup>2+</sup>的效果较好,4 mmol/L的Zn<sup>2+</sup>可完全解除2 mmol/L EDTA的抑制作用.

### 参考文献:

- [1] BUMPUS J A, TIEN M, WRIGHT D, *et al.* Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus[J]. *Science*, 1985, 228: 1434 - 1436.
- [2] BARR D P, AUST S D. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants[J]. *Environ Sci Technol*, 1994, 28(2): 78 - 87.
- [3] PAULI OLLIKKA, KIRSI ALHONMAKI, VELI-MATTI LEPPANEN, *et al.* Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(12): 4010 - 4016.
- [4] 李华钟, 章燕芳. 白腐菌与染料废水处理[J]. 工业水处理, 2001, 21(5): 1 - 5.
- [5] BUMPUS J A, BROCK B J. Biodegradation of crystal violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54(5): 1143 - 1150.
- [6] 李华钟, 章燕芳, 华兆哲等. 黄孢原毛平革菌选择性合成木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶[J]. 过程工程学报, 2002, 2: 137 - 141.
- [7] 李慧蓉, 李华兵, 李文琼等. 黄孢原毛平革菌对6种染料的脱色降解[J]. 环境科学研究, 1999, 12(3): 14 - 17.
- [8] ELISA ABADULLA, LUISA M SILVA. Enzymatic decolorization of textile dyeing effluents[J]. *Textile Research*, 2000, 70(5): 409 - 414.
- [9] MING TIEN, T KENT KIRK. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Methods in Enzymology*, 1988, 161: 238 - 249.
- [10] BUMPUS J A, BROCK B J. Biodegradation of crystal violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54(5): 1143 - 1150.
- [11] BANERJEE A K. Mechanism of horseradish peroxidase-catalyzed conversion of iodine to iodide in the presence of EDTA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>[J]. *Biol Chem*, 1989, 264: 9188 - 9194.
- [12] CRIPPS C, BUMPUS J A, AUST S D. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56: 1114 - 1118.
- [13] CHOINOWSKI T, BLODIG W. The crystal structure of lignin peroxidase at 1.70 Å resolution reveals a hydroxyl group on the Cβ of tryptophan 171: a novel radical site formed during redox cycle[J]. *Mole Biol*, 1999, 286: 809 - 827.
- [14] AUST S D, TUISEL H, CHANG C W, *et al.* Oxidation of environmental pollutants by lignin peroxidase from white rot fungi[J]. *Biol Oxid Systems*, 1989, 1(1): 453 - 464.

(责任编辑 李春丽)