

链霉菌 LD048 硫化物氧化酶的固定化及催化操作研究

张春明¹, 栾兴社², 王桂宏³, 肖敏¹

(1. 山东大学微生物技术国家重点实验室, 山东 济南 250014; 2. 山东建筑大学市政与环境工程学院, 山东 济南 250101; 3. 中国海洋大学生命科学与技术学院, 山东 青岛 266003)

摘要:以壳聚糖为载体、戊二醛为交联剂对链霉菌 LD048 在液体培养的条件下合成的硫化物氧化酶进行了固定化, 确定的最适固定化条件为: 酶与载体的质量比为 1:4, 交联剂质量分数 0.05%, 吸附 3 h, 交联 6 h。固定化后酶的活性回收率为 58.8%, 每克固定化酶的催化活性达到 2 000 U, K_m 值为 2.43×10^{-5} mol/L, 固定化酶在 100°C 保温 2 h, 酶活仅下降 6%。在以 2.5 mg/(L·h) 的容积负荷对固定化酶进行的装置化运行实验中, 连续 15 天的催化操作后, 固定化酶对 S^{2-} 的去除效果仍在 85% 以上。

关键词:链霉菌 LD048; 硫化物氧化酶; 壳聚糖; 固定化

中图分类号: TQ426.97

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2007)08-0045-03

Immobilization of heat-stable sulfide-oxidizing enzyme on chitosan and its catalytic operation

ZHANG Chun-ming¹, LUAN Xing-she², WANG Gui-hong³, XIAO Min¹

(1. State Key Laboratory of Microbial Technology Shandong University, Jinan 250014, China;

2. College of Municipal and Environmental Engineering, Shandong Jianzhu University, Jinan 250101, China;

3. College of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Sulfide-oxidizing enzyme synthesized by *Streptomyces* sp. D048 cultivated in liquid medium was immobilized on carriers of chitosan by covalent coupling with glutaraldehyde as cross-linker. Conditions of immobilization were optimized as: 1:4 of the quality ratio of enzyme and carries, 0.05% of the cross-linker concentration, 3 hours of absorbing and 6 hours of coupling. The catalytic activity recovery of this enzyme was 58.8% after immobilized, and the activity for per gram immobilized enzyme is up to 2 000 U. K_m value of immobilized enzyme is 2.43×10^{-5} mol/L, and only 6% of activity decrease can be detected when immobilized enzyme was kept at 100°C for 2 hours. Catalytic operation showed that the removing rate of immobilized enzyme to S^{2-} supplied by this test still maintained above 85% after 15 days of continuous catalytic operation in installed experiment for immobilized enzyme with 2.5 mg/(L·h) of volumetric load.

Key words: *Streptomyces* sp. LD048; sulfide-oxidizing enzyme; chitosan; immobilization

H_2S 的治理问题一直受到关注, 生物法由于其节能、环保、效率高及无二次污染等优点, 从而成为新的 H_2S 工程治理方法研究中的热点^[1-3]。固定化自养微生物如 *Thiobacillus thioparus*、*Thiobacillus thiooxidans*、*Thiobacillus concretivorus*、*Hyphomicrobium neptunium* 及一些异养微生物如 *Pseudomonas putida*、*Xanthomonas* sp. 用于去除 H_2S 的研究已有报道^[4-8]。日本和德国利用固定化微生物装置去除 H_2S 已取得了显著效果, 然而由于报导菌种产酶活性及酶性质方面的原因, 酶法处理并固定化应用未见报道。目前已有不少研究者将壳聚糖作为固定化酶的载体, 其开发应用前景广阔。笔者以壳聚糖为

载体对硫化物氧化酶的固定化条件进行了研究, 并对其装置化运行的催化操作进行了探索。

1 实验部分

1.1 实验材料

菌株链霉菌 LD048, 本实验室筛选保藏。壳聚糖(脱乙酰度 85%), 山东济南海得贝海洋生物工程有限公司提供。戊二醛(25%, 体积分数)和其他试剂均为国产分析纯。

1.2 制备和活性

壳聚糖载体的制备: 称取一定量的壳聚糖溶于含醋酸体积分数为 1% 的溶液中, 制得质量分数为

收稿日期: 2007-05-29

基金项目: 山东省济南市明星计划(济青科合字(2005)第 106 号)

作者简介: 张春明(1978-), 女, 博士生; 肖敏(1962-), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事应用微生物技术、生物催化、微生物分子生物学方面的研究, 通讯联系人, 0531-88365128, minxiao@sdu.edu.cn。

2.5%的壳聚糖酸性溶胶。在烧杯中加入体积比为 3:1 的 1 mol/L 的氢氧化钠与甲醇的混合液作为成球液,边搅拌边将壳聚糖溶胶以 60~70 滴/min 的速度滴入其中,溶胶液滴均匀分散成球,室温搅拌 30 min,蒸馏水洗涤至中性,真空干燥后,过筛选取直径为 1.5 mm 壳聚糖小球,备用。

硫化物氧化酶的制备:硫化物氧化酶产生菌链霉菌 LD048 经活化培养 12 h 后,按体积分数为 2% 的接种量接入产酶培养基中^[9-10],于 37℃、170 r/min 摇床培养 18 h。将发酵液倒入离心管,5 000 r/min 下离心,弃去菌体,收集上清液得硫化物氧化酶的粗酶液。

酶活性的测定方法采用亚甲蓝法,在 50 mL 三角瓶中加入 8 mL 质量浓度为 1 mg/mL 的 Na₂S 溶液、2 mL 酶液,严密封口,在 125 r/min、30℃ 下反应 2 h。测定反应体系中 S²⁻ 的减少量。对照为相同量的底物溶液与蒸馏水的混合体系。酶活的单位定义为每小时氧化 S²⁻ 的微摩尔数,以 U 表示。

1.3 硫化物氧化酶的固定化

取制备好的壳聚糖载体 0.01 g,浸在体积比为 3:1 的 1 mol/L 的氢氧化钠与甲醇的混合液中,于 4℃ 冰箱中放置过夜,然后用蒸馏水洗涤至中性。加入一定量的硫化物氧化酶粗酶液吸附一定时间后,再加入体积分数为 5% 的戊二醛溶液,使其在不断搅动的情况下进行交联。用蒸馏水洗去多余的戊二醛溶液,吸干水分测酶活性。固定化酶活回收率按下式计算:固定化酶活回收率 = (固定化酶总活 U/溶液酶总活 U) × 100%。

1.4 硫化物的处理

将一定量的硫化物氧化酶固定化颗粒装入 Φ 3 cm × 50 cm 的玻璃反应柱中,固定化微球分 3 段装填于塔内,每层的填充高度为 10 cm,每层间隔 2.5 cm。含有 2 价硫的水样自下而上流经此塔,处理后水样经饱和氢氧化钠洗涤吸收,反应装置连续运行,定时取样测定进、出的硫化物的浓度,检测固定化酶反应装置的去效率。

2 结果与讨论

2.1 硫化物氧化酶固定化

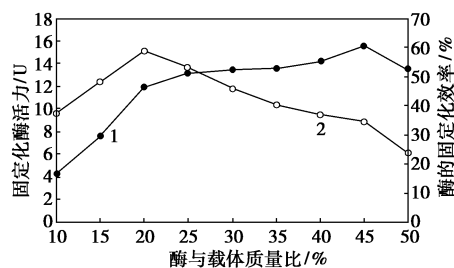
2.1.1 交联剂戊二醛浓度的影响

取已吸附有酶的等量壳聚糖载体 0.01 g 与 5 mL 不同浓度的戊二醛(体积分数 0.01%~2.50%)溶液混合,室温下搅拌交联 6 h,抽滤、水洗得固定化酶颗粒,测定酶活。结果显示在 0.1% 体

积分数的戊二醛浓度范围内,固定化酶活随戊二醛浓度增大而增加,并在 0.1% 时达到最大值 19.62 U;随后酶活呈逐渐下降的趋势,高浓度戊二醛抑制了酶的活性。

2.1.2 给酶量与固定化酶活的关系

取等量处理好的载体 0.01 g,分别加入不同比例的酶(10%~50%),吸附完成后,采用 0.1% 体积分数的戊二醛进行交联固定,制备固定化硫化物氧化酶。图 1 表明酶量为载体质量的 20% 时固定化酶活相对较好,此时载体对酶的活性回收率达到 58.8%。随着给酶量的增加,单位载体的固定化酶活缓慢上升,但载体对酶的活性回收率则急剧下降。

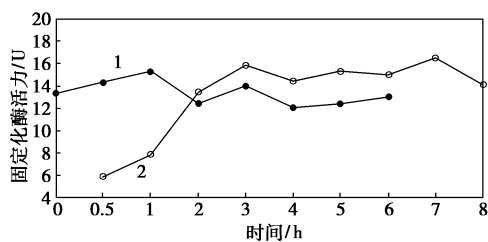


1—固定化酶活;2—固定化效率

图 1 给酶量对固定化酶活性的影响

2.1.3 吸附时间与交联时间的影响

恒定固定化酶载体的给酶量为其质量分数的 20%,进行 0、0.5、1、2、3、4、5、6 h 的吸附后,加入 5% 体积分数的戊二醛使其最终质量分数为 0.1%,交联 6 h 后测固定化酶的酶活,进行吸附时间对固定化酶活的影响实验。在交联时间的影响实验中,吸附时间均设为 1 h,交联时间为 0.5、1、2、3、4、5、6、7、8 h,分别制备固定化酶,结果从图 2 上可以看到,进行 1 h 的吸附对固定化酶活性最好,长时间的吸附反而不利于酶的固定化。交联时间对固定化酶的影响恰恰相反,随着时间的延长,固定化酶活显著增加,在 3 h 达到最佳,为 15.79 U,随后呈缓慢上升的趋势。



1—吸附时间;2—交联时间

图 2 吸附与交联时间对固定化酶活性的影响

2.1.4 吸附与交联温度的影响

恒定固定化酶载体的给酶量为其质量分数的

20%,交联剂戊二醛的体积分数为0.1%,吸附时间为1h,交联时间为3h,分别改变吸附与交联温度为20、30、40、50、60℃,制备固定化酶颗粒,结果如图3所示。30℃为酶吸附的最适温度,最适交联温度为60℃,此时的酶活比20℃交联的结果提高30%。

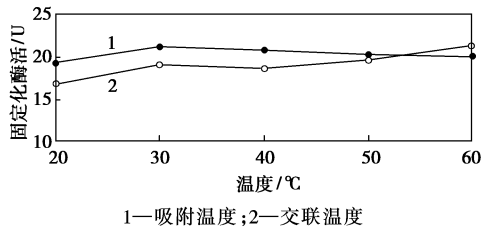


图3 吸附与交联温度对固定化酶活性的影响

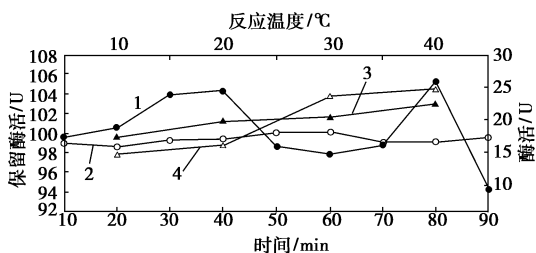
2.1.5 固定化正交实验结果

选取交联剂质量分数(0.01%、0.05%、0.1%、0.15%)、给酶量(10%、15%、20%、25%)、吸附时间(0、1、3、5 h)及交联时间(1、3、6、9 h)4因素,每个因素4水平,以 $L_{16}(4^5)$ 为依据进行了固定化酶的正交化实验。结果指出给酶量的影响因素最大,其次的影响为交联剂浓度>交联时间>吸附时间,所确定的最优化固定化组合为:给酶量为载体质量的25%,交联剂浓度为0.05%,交联时间为6h,吸附时间为3h。

2.2 固定化硫化物氧化酶性质

2.2.1 固定化酶的最适反应温度及温度稳定性

在30~60℃温度范围内,测定不同温度下游离酶和固定化酶氧化二价硫的能力。图4表明,随着反应温度的提高,两者均呈现出了活性上升的趋势,高温有利于催化酶反应的进行。将固定化酶颗粒或游离酶置于100℃水浴中保温,定时取样检测其硫化物氧化活性(见图4),在实验的90min内,游离酶基本保留了原酶酶活,波动范围在2%以内。固定化酶的波动范围不超过10%,100℃水浴中保温90min后,酶活仅损失6%。固定化酶基本保留了游离酶的高温耐受性。



1—固定化酶温度耐受曲线;2—游离酶温度耐受曲线;
3—固定化酶反应温度曲线;4—游离酶反应温度曲线

图4 酶的高温耐受性及最适反应温度

2.2.2 固定化酶的最适 pH 及 pH 稳定性

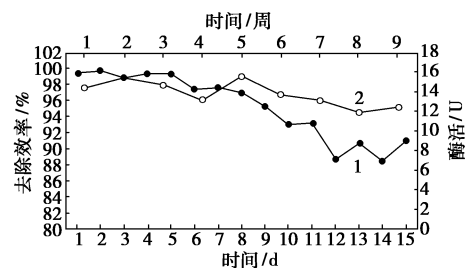
硫化物氧化酶的反应底物为硫化钠溶液中的二价硫离子,反应产物为亚硫酸根、硫酸根等硫的氧化物,整个反应体系是一个由碱性环境向酸性环境转变的过程,且不同的进样硫化钠浓度导致溶液反应前后的酸碱度也不同。笔者通过装置化运行实验考察固定化酶的酸碱耐受与反应,结果显示固定化酶的反应与耐受 pH 范围在3.0~11.0的一个较宽的范围内,这与固定化酶优良的运行稳定性相一致。

2.2.3 固定化酶的 K_m 值测定

取8份0.01g的固定化酶或游离酶液2mL,分别与一定量不同浓度的硫化钠(3~40 mmol/L)于37℃,反应2h,测定其反应速度,用双倒数法作图求得固定化酶与游离酶的米氏常数 K_m 值分别为 2.43×10^{-5} mol/L和 4.485×10^{-5} mol/L,该硫化物氧化酶经固定化后, K_m 值明显减小,这表明硫化物氧化酶经固定化后与底物的亲和力提高,提高比率近50%,这对酶促反应是极为有利的。

2.2.4 固定化硫化物氧化酶的贮存稳定性

将固定化硫化物氧化酶颗粒浸在pH=7.4的磷酸缓冲液中,于4℃保藏,每隔一周测一次酶活,结果见图5。经8周的测定酶活未见明显下降,仅由原来的14.39 U下降到12.46 U,说明固定化硫化物氧化酶有良好的贮存稳定性。



1—贮存稳定性;2—运行稳定性

图5 固定化酶的存贮及催化操作稳定性

2.2.5 固定化酶的装置化催化操作

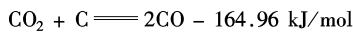
在 S^{2-} 的进样容积负荷为 $2.5 \text{ mg}/(\text{L} \cdot \text{h})$ 的情况下,使用该装置在室温条件下进行 S^{2-} 的连续去除实验,实验周期为15天,跟踪检测硫化物的氧化去除效果,结果见图5。在前8天的运行中,装置的去除净化效率均在97%以上。从第9天开始,去除效率呈波动性下降,整体下降幅度在10%左右。装置化连续运行15天,固定化酶仍保持85%的去除率。

(下转第49页)

在上吹制气阶段前,先用 CO_2 将吹风阶段余留在造气炉内含有 O_2 、 N_2 的吹风风从炉膛内置换掉。

(3) CO_2 上吹制气阶段

CO_2 吹净过程结束后,造气炉内的温度还是很高,此时用 CO_2 从造气炉底部进入,在高温下发生反应:



CO_2 与 C 反应生成 CO,反应吸热,炉内温度逐渐降低,且温度在造气炉反应区内呈上高下低趋势分布,当温度降到一定值时,停止 CO_2 进料,改为下吹制气。

(4) CO_2 下吹制气阶段

过程与上吹制气过程类似,随着反应进行,造气炉内温度进一步降低,炉气出口 CO_2 浓度不断增加,达到一定数值后,停止下吹过程,改为二上吹过程。

(5) 二上吹阶段

用 CO_2 吹扫炉膛下部,防止下一循环空气吹入时在炉膛下部形成爆炸性混合气。循环结束,重新进入空气吹气阶段,上吹制气及下吹制气过程产生的炉气,其 CO 的平均体积分数可达 60% 以上(由于炉气还回收了部分二上吹所生产的低浓度的 CO,所以炉气的 CO 浓度低于上下吹过程时的平均值)。

1.2 用 CO_2 制造 CO 的化学平衡及反应速度

(1) CO_2 与焦反应还原为 CO 的化学平衡

CO_2 与焦反应还原为 CO 的化学平衡浓度,很容易从各种资料上查到。图 1 为 CO_2 与 CO 平衡组成与温度的关系,平衡浓度随温度的变化有很大的差别,反应达到平衡时,如温度降低,则 CO 含量低, CO_2 含量升高;如温度升高,则 CO 含量高, CO_2 含量降低。

(上接第 47 页)

参考文献

- [1] Busca G, Pitarino C. Technologies for the abatement of sulphide compounds from gaseous streams: A comparative overview [J]. Journal of Loss Prevention in the Process Industries, 2003, 16: 363 - 371.
- [2] Khanal S K, Huang J C. ORP-based oxygenation for sulfide control in anaerobic treatment of high-sulfate wastewater [J]. Water Research, 2003, 37: 2053 - 2062.
- [3] Lee J H, Son H J. H_2S removal with an immobilized cell hybrid reactor [J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 2197 - 2203.
- [4] Oyarzún P, Arancibia F, Canales C, et al. Biofiltration of high concentration of hydrogen sulphide using *Thiobacillus thioiarius* [J]. Process Biochemistry, 2003, 39: 165 - 170.
- [5] Shinabe K, Oketani S, Ochi T, et al. Characteristics of hydrogen sulfide

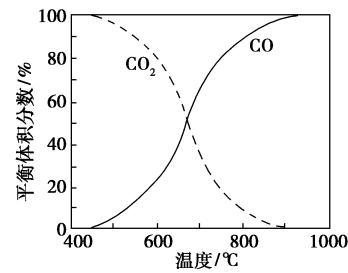
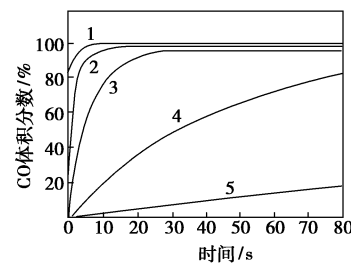


图 1 CO_2 与 CO 平衡组成与温度关系

(2) CO_2 与焦反应还原为 CO 的反应速度

图 2 表示了 CO_2 与焦反应还原为 CO 的反应速度与温度的关系。温度高则反应速度快,温度低则反应慢,但是实际的反应速度还与焦的化学活性、粒度、灰分等因素密切相关。



温度/°C: 1—1300; 2—1200; 3—1100; 4—1000; 5—900

图 2 CO_2 还原反应速度与温度关系

1.3 工艺关键部分

由以上的叙述可见,该过程类似固定层煤气炉生产水煤气或者半水煤气的工艺,只是把水蒸气换成了 CO_2 ,但是为了降低精制装置的投资及操作费用,要尽可能降低炉气中 N_2 、 H_2 等分离成本高的组分。例如 CO 是用于羰基合成,那么炉气中的 N_2 、 H_2 体积分数分别控制在 1% 左右,才能用简单的净化方法低成本得到体积分数在 97% 以上的 CO。为此要对造气炉的进出口管道进行改进,同时由于炉气

removal by *Thiobacillus thiooxidans* K51 isolated from a carrier-packed biological deodorization system [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1995, 80(6): 592 - 598.

- [6] Cho K S, Ryu H W, Lee N Y. Biological deodorization of hydrogen sulfide using porous lava as a carrier of *Thiobacillus thiooxidans* [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 90(1): 25 - 31.
- [7] Cho K S, Hirai M, Shoda M. Degradation of Hydrogen sulfide by *Xanthomonas* sp. DY44 isolated from peat [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(4): 1183 - 1189.
- [8] 肖亚中, 张书祥, 胡乔彦, 等. 壳聚糖固定化真菌漆酶及其用于处理酚类污染物的研究 [J]. 微生物学报, 2003, 43(2): 246 - 250.
- [9] 栾兴社, 王桂宏, 黄俊, 等. 链霉菌 LD048 硫化物氧化酶的催化机理及酶学特征 [J]. 现代化工, 2006, 27(S2): 88 - 91.
- [10] 栾兴社, 于伟正, 王桂宏, 等. 硫化物氧化兼性自养链霉菌 LD48 培养的影响因素研究 [J]. 化工科技, 2004, 12(5): 14 - 17. ■