

DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2021041604

王梦杰, 李建华, 彭建彪, 等. 过氧化物酶对水中 17 β -雌二醇光降解的影响机制[J]. 环境化学, 2021, 40(11): 3351-3359.

WANG Mengjie, LI Jianhua, PENG Jianbiao, et al. The effect mechanism of peroxidase on the photodegradation of 17 β -estradiol in water[J]. Environmental Chemistry, 2021, 40 (11): 3351-3359.

过氧化物酶对水中 17 β -雌二醇光降解的影响机制*

王梦杰^{1,2} 李建华³ 彭建彪⁴ 高士祥² 刘国强¹ 张亚^{1**}

(1. 生态环境部南京环境科学研究所/国家环境保护土壤环境管理与污染控制重点实验室, 南京, 210042; 2. 南京大学环境学院污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京, 210023; 3. 南京理工大学环境与生物工程学院江苏省化学污染控制与资源化重点实验室, 南京, 210094; 4. 河南师范大学环境学院, 黄淮水环境污染与防治教育部重点实验室, 河南省环境污染控制重点实验室, 新乡, 453007)

摘要 过氧化物酶广泛存在于天然水体,在外加过氧化氢(H₂O₂)的条件下可有效地降解水体中的有机污染物.17 β -雌二醇(E2)是水体中常见的雌激素,低浓度下仍具有极强的内分泌干扰效应,过氧化物酶可通过利用腐殖质产生的H₂O₂从而影响腐殖质介导的E2的光化学过程,但其是否可直接影响E2的光转化尚不清楚.本文系统地研究了辣根过氧化物酶(HRP)对E2光降解过程的影响.研究发现有活性的HRP可显著促进E2的光化学转化,且促进作用随着活性的增大而增强.活性氧猝灭实验结果表明E2自敏化产生的活性物种可激活HRP,从而促进了E2在光照条件下的酶降解,且E2在HRP溶液中的光解产物实验进一步证实了这一过程.HRP对E2酶降解的效率高于常见水质成分 Suwannnee River Humic Acid (SRHA)和Fe³⁺的促进效率,弱于NO₃⁻引起的促进效率,表明HRP对污染物在天然水体中的环境归趋的影响是值得关注的.本文为深入认识雌激素的环境归趋提供科学数据,并为酶处理技术在水处理方面的应用带来巨大前景.

关键词 辣根过氧化物酶, 17 β -雌二醇, 酶降解, 光降解, 水质成分.

The effect mechanism of peroxidase on the photodegradation of 17 β -estradiol in water

WANG Mengjie^{1,2} LI Jianhua³ PENG Jianbiao⁴ GAO Shixiang²
LIU Guoqiang¹ ZHANG Ya^{1**}

(1. State Environmental Protection Key Laboratory of Soil Environmental Management and Pollution Control, Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Ecology and Environment of China, Nanjing, 210042, China; 2. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing, 210023, China; 3. Jiangsu Key Laboratory of Chemical Pollution Control and Resources Reuse, School of Environmental and Biological Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing, 210094, China; 4. Henan Key Laboratory for Environmental Pollution Control, Key Laboratory for Yellow River and Huai River Water Environment and Pollution Control, Ministry of Education, School of Environment, Henan Normal University, Xinxiang, 453007, China)

Abstract Peroxidase is widely widespread in aqueous environment, it can effectively degrade organic pollutants in the presence of hydrogen peroxide (H₂O₂). 17 β -estradiol (E2), as a common estrogen, exhibits strong endocrine disrupting effect even at relatively low concentration. It is well known that peroxidase can affect humus induced photochemical process of E2 via the interaction

2021年4月16日收稿(Received: April 16, 2021).

* 国家自然科学基金(21577059)资助.

Supported by The National Natural Science Foundation of China (21577059).

** 通讯联系人 Corresponding author, Tel: 025-85287637, E-mail: zhangya@nies.org

with H_2O_2 , while whether peroxidase can directly interact with E2 still remains unclear. In this study, the impact of horseradish peroxidase (HRP) on photochemical transformation of E2 was systematically evaluated. Our results revealed that active HRP could significantly promote the photodegradation of E2, and the promotion effect increased with the augment of enzyme activity. Self-sensitization of E2 was proposed to activate HRP, leading to the formation of a series of reactive oxygen species (ROS), which in turn oxidized E2. Such mechanisms were further verified by ROS quenching experiments and photoproducts identification. In addition, the promotion effect of HRP was found to be more pronounced than water components Suwannee River Humic Acid (SRHA) and Fe^{3+} , while less effective than nitrate, indicating that the involvement of HRP in the environmental fate of pollutants in natural water is noteworthy. The present study would provide scientific data for better understanding of the environmental fate of estrogen and bring great prospects for the application of enzyme treatment technology in water treatment.

Keywords horseradish peroxidase, 17β -estradiol, enzyme degradation, photodegradation, water components.

近年来,天然和人工合成激素的不断排放严重影响了生态和环境健康^[1-3],这引起了研究学者的关注^[4-5].其中天然雌激素 17β -雌二醇(E2)是一种广泛用于人类内分泌疾病治疗的天然雌激素^[6],是天然水体中雌激素活性的主要贡献者^[7].E2已被检出于多种天然水体,如夏季在来自日本 109 条河流的 256 个样品中检出率为 86.72%,平均浓度 $2.1 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[8];德国的一些饮用水水样中 E2 的平均检出浓度为 $0.7 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[9];此外 E2 在阿肯色州西北部的地下水体中也被检测到,浓度范围为 $6\text{--}66 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[10].有文献报道 E2 在低浓度甚至环境浓度下足以干扰内分泌系统的功能,损害水生生物和人类健康,如对鱼性别产生诱导的最低可见效应浓度为 $10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[11],雌性虹鳟鱼中 E2 诱导卵黄蛋白原的阈值浓度为 $4.7 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $7.9 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[12].E2 等污染物在天然水体中的自然衰减途径主要有物理、化学和生物过程,如蒸发、稀释、水解、吸附、光降解和生物降解等,其中光降解和生物降解是污染物自然衰减的两个重要过程^[13],对污染物的转化和归趋有着极其重要的影响.

光解分为直接光解和间接光解,前者是污染物可以有效地吸收光子从而发生光解,且污染物直接光解的量子产率越高,光化学活性越高;后者是水体中存在的光敏剂会产生活性氧物种(ROS)或将能量转移至污染物,从而导致污染物发生光解^[14].据报道,E2 可直接吸收 290—320 nm 范围内的太阳光而发生直接光降解,且水质成分,如腐殖酸、 Mn(III) 和溶解性黑碳等,可明显促进 E2 的光降解^[4, 15-16].生物转化主要是通过酶来降解这些污染物^[17],其中过氧化物酶(POD)广泛存在于天然环境^[18],且活性相当高,如在芬兰 Mekkojärvi 湖表层水中活性范围为 $73.6\text{--}272.9 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ^[19];在德国湖泊中浓度可达到 $0.06\text{--}4.71 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ^[20].有文献报道,辣根过氧化物酶(HRP)、木质素过氧化物酶以及大豆过氧化物酶等 POD 可通过氧化偶联反应有效去除三氯生、E2 和乙酰氨基酚等多种污染物,且主要底物为酚类污染物^[21-23].在天然水体中,光降解和酶促反应通常同时发生,且已有研究学者关注光降解和酶转化的复杂过程.如 HRP 可利用腐殖质光解产生的 H_2O_2 进行氧化偶联反应去除 E2,同时,腐殖质生成 ROS 促进 E2 的光降解^[24],但是 HRP 在无腐殖质存在的条件下是否可直接影响 E2 的光转化尚不清楚,因此有必要进行这方面的研究.

本文通过降解动力学、活性氧物种鉴定、光酶结合产物鉴定以及常见水质成分比较等实验系统地研究了 HRP 对 E2 光解的影响机制,对光酶协同转化过程有更深入的理解,为 E2 的环境归趋和酶处理技术在水处理方面的应用提供参考数据.

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 材料

17β -雌二醇 (E2,纯度 98%)、2,2'-连氨基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS, 纯度

98%) 和辣根过氧化物酶(HRP, EC 1.11.1.7, 52 U·mg⁻¹) 购自美国 Sigma-Aldrich 有限公司; 色谱级甲醇来自美国 Tedia 公司; Suwannee 河的腐殖酸(SRHA) 购自于国际腐殖质协会(IHSS). 实验所用水均来自 Milli-Q 纯化系统的去离子水 18.25 M Ω ·cm.

1.2 HRP 酶活测定方法

用 ABTS 方法测定辣根过氧化物酶 HRP 的酶活, 酶活的定义为: 1 单位酶活是每分钟催化氧化 1 μ mol ABTS 的酶量. 具体步骤为: 在 1 cm 比色皿中, 加入 2.3 mL 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(PBS)、0.3 mL 2 mmol·L⁻¹H₂O₂ 和 0.3 mL 2 mmol·L⁻¹ABTS, 最后加入 0.1 mL 的 HRP 溶液, 迅速混合启动反应. 并立即将比色皿放置到紫外分光光度计中, 每 15 s 记录 1 次在 420 nm 处的吸光度, 共记录 3 min, 计算出 k 值, 然后根据公式 1 计算酶活.

$$\text{酶活(U} \cdot \text{mL}^{-1}) = k(\text{cm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}) \times 30/36((\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \quad (1)$$

1.3 光降解实验

光降解实验均在 50 mL 带有石英塞的石英比色管中进行, 反应体积为 25 mL, 含有 1.6 μ mol·L⁻¹ 的 E2 溶液, 酶活范围为 0.001—0.1 U·mL⁻¹ 或失活的 HRP, 反应介质为 0.01 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲溶液(PBS, pH=7.0). 将比色管置于 XPA-VII 型光化学反应仪(南京胥江机电厂, 中国)中, 并使其围绕光源旋转保证反应溶液受光均匀, 并以铝箔纸完全包裹的相同反应溶液为黑暗对照. 使用带有通过型滤光片($\lambda > 290$ nm)的 1000 W 氙灯作为光源, 并用紫外线辐照器(北京师范大学光电仪器厂, 中国)测得 365 nm 处的辐照强度为 46.5 mW·cm⁻² 左右, 接近南京(32°20'N)夏季中午的光照强度. 通过冷却的循环水浴将反应溶液的温度保持在(25.0 \pm 1.0) °C. 在预设的反应间隔取样, 用于 HRP 和 E2 的分析.

HRP 失活方法: 将 HRP 溶液在 90 °C 水浴锅中保持 60 min, 结束后用 1.2 节 HRP 酶活测定方法测定不到 HRP 酶活.

鉴定 E2 反应过程中的活性氧物种(ROS) 实验: 分别用 10 μ mol·L⁻¹ 山梨酸(sorbic acid)、100 mmol·L⁻¹ 异丙醇(2-propanol)、1.0 mmol·L⁻¹ 咪喃甲醇(FFA)和 0.5 mmol·L⁻¹ 硝基蓝四唑(NBT)捕获三重态、羟基自由基(-OH)、超氧负离子(O₂⁻)和单线态氧(¹O₂)^[4, 25-26].

常见水质成分对 E2 光降解的影响实验: (1) 1.6 μ mol·L⁻¹ E2 溶液; (2) 1.6 μ mol·L⁻¹ 的 E2 和 0.01 U·mL⁻¹ HRP; (3) 1.6 μ mol·L⁻¹ 的 E2 和 5 mg·L⁻¹ SRHA; (4) 1.6 μ mol·L⁻¹ 的 E2 和 1 mmol·L⁻¹ NO₃⁻和 (5) 1.6 μ mol·L⁻¹ 的 E2 和 30 μ mol·L⁻¹ Fe³⁺.

所有实验均设 3 个平行, 标准偏差在 95% 置信区间.

1.4 产物实验

为了更好地阐明雌激素与 HRP 之间的相互作用机制, 进一步研究了 E2 在 HRP 溶液中的光降解产物. 反应体系为 1.6 μ mol·L⁻¹ E2 和 1.6 μ mol·L⁻¹ E2 + 0.01 U·mL⁻¹ HRP, 按照 1.3 节光照条件对这两个反应体系进行光照实验, 光照结束后, 立刻加入 0.5 mL 2.4 mol·L⁻¹ 盐酸将反应溶液 pH 值调至 2.0 以下, 使 HRP 完全失活. 最后用 CNW LC-C18 柱进行固相萃取(SPE), 具体步骤如下: 1) 将 C18 小柱先用 10 mL 甲醇活化, 再用 10 mL 去离子水平衡; 2) 以约 0.5 mL·min⁻¹ 的流速加载光降解溶液, 然后用 10 mL 去离子水淋洗; 3) 真空抽干 C18 小柱后, 用 3 \times 1 mL 甲醇洗脱; 4) 收集洗脱液后用 N₂ 吹干, 并用 1 mL 甲醇重溶后进液相色谱飞行时间质谱联用仪(LC-TOF-MS)测定.

1.5 分析方法

E2 的浓度用配备有荧光检测器的安捷伦高效液相色谱(HPLC1200, 美国)测定, 激发和发射波长分别为 220 nm 和 310 nm. 色谱分离柱为安捷伦 Eclipse XDB-C18 柱(250 mm \times 4 mm, 5 μ m)(安捷伦, 美国), 流速为 0.7 mL·min⁻¹, 流动相为 80% 的乙腈和 20% 的水, 进样量 30 μ L.

LC-TOF-MS: 用配有电喷雾离子源的 Triple TOF 5600 高效液相/飞行时间质谱联用仪(AB SCIEX, 美国)分析 E2 的光降解产物. 离子源参数如下: 离子喷雾电压 -5500 V, 气帘气电压 35 psi, 载气电压 55 psi, 辅助气电压 55 psi 和温度 550 °C. 液相条件是: Eclipse XDB-C18 反相色谱柱(150 mm \times 2.1 mm, 2.4 μ m), 200 μ L·min⁻¹ 流速, 5.00 μ L 进样量, 90% 甲醇和 10% 水的流动相和 30 °C 柱温.

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 HRP 存在下 17β -雌二醇的光降解动力学

在黑暗条件, E2 的浓度在 24 h 内未观察到显著变化, 这表明水解、挥发和石英管壁上的吸附对 E2 的去除没有影响. E2 在模拟太阳辐射下在 PBS 中的直接光解符合假一级动力学 (图 1), 速率常数为 0.0197 h^{-1} ($R^2=0.972$), 半衰期为 35.19 h, 说明 E2 直接光解很慢, 这与 E2 具有低的量子产率(0.07)是一致的^[27], 这是因为 E2 在 290—320 nm 波长范围内的吸收比较微弱, 与文献一致^[4].

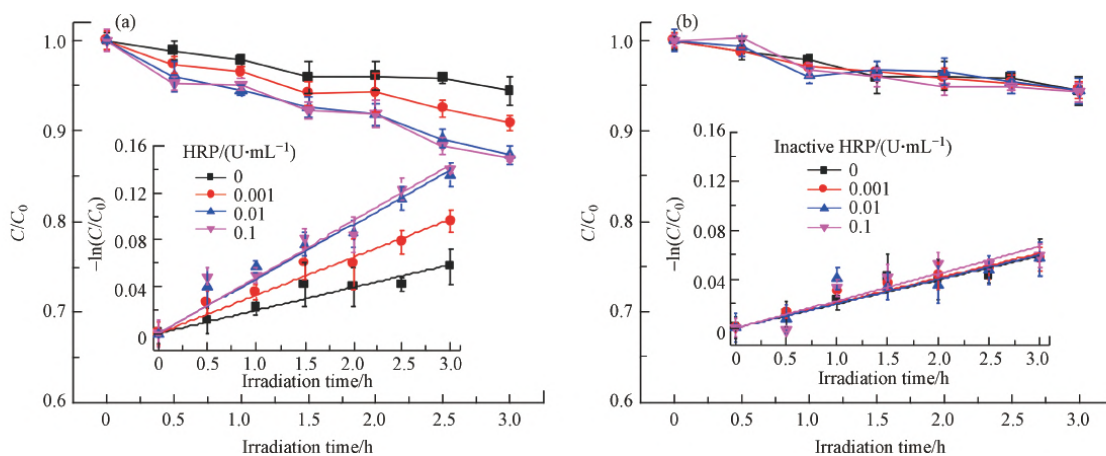


图 1 E2 在不同酶活 (a) 和失活的 HRP (b) 溶液中的光降解动力学

Fig.1 Photodegradation kinetics of E2 in the presence of active HRP with varying activity (a) or inactive (b)

加入 HRP, E2 的光降解被显著的促进, 但是促进程度随着酶活的增加先增加后趋于饱和, 且当酶活高于 $0.01 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时促进效果不再显著增加, 说明 HRP 促进 E2 光解的最佳酶活为 $0.01 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$. E2 在 HRP 存在下的光降解仍然符合假一级动力学, 且 R^2 均大于 0.98, 说明线性很好. E2 在 0.001 、 0.01 、 $0.1 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ HRP 溶液中的光解速率常数分别为 0.0325 、 0.0465 、 0.0480 h^{-1} , 其中, 在最佳酶活 $0.01 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ HRP 下的光解速率常数约为直接光解速率常数的 3 倍, 表明环境水体中的 HRP 可显著影响雌激素的光化学行为. 将相对应不同初始酶活的 HRP 失活, 研究失活 HRP 对 E2 光降解的影响, 结果表明, 失活的 HRP 对 E2 的光解几乎没有影响, 表明只有有活性的 HRP 才能和光协同促进 E2 的光解.

由于酶活影响 E2 的光转化过程, 接下来, 测定了 E2+HRP 溶液中酶活随光照时间的变化. 结果发现, 酶活随着光照时间的增加逐渐下降, 这是因为 HRPFe(III) 在光照条件下会被还原为 HRPFe(II) , 而 HRPFe(II) 无法提供空轨道与 H_2O_2 配位, 从而导致酶活性降低^[28]. 但对于不同酶活来讲, 活性越高, 失活越慢 (图 2). 初始酶活为 0.001 、 0.01 、 $0.1 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 HRP 在光照 3 h 后分别降低了 70%、35% 和 20%, 表明 E2 在环境水体中较长时间内都能被光酶协同降解.

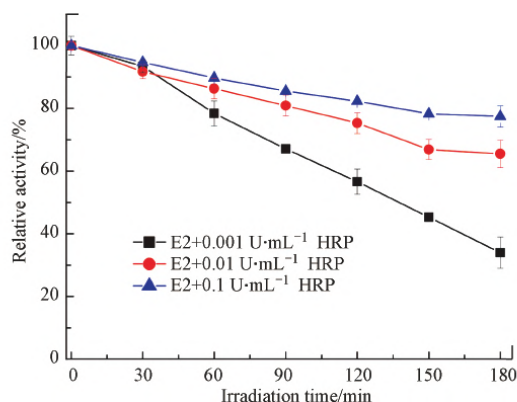


图 2 HRP 的酶活在 E2 和不同酶活的 HRP 反应体系中随光照时间的变化

Fig.2 The activity of HRP in the reaction systems containing E2 and HRP with different activities as a function of irradiation time

2.2 HRP 对 17 α -乙炔基雌二醇光解的影响机制

HRP 中含有色氨酸、组氨酸和酪氨酸等氨基酸, 这些氨基酸能够吸收光从而可能会与 E2 竞争光而抑制其直接光解^[29], 类似于腐殖质的光屏蔽作用, 因此, 通过公式 2—3 计算不同活性下 HRP 的光屏蔽因子 S_{λ} , 扣除其对 E2 光降解的屏蔽作用。

$$S_{\lambda} = \frac{1 - e^{-2.303 \times A \times b}}{2.303 \times A \times b} \quad (2)$$

$$S_{290340} = \frac{\int_{290}^{340} S_{\lambda} d\lambda}{340 - 290} \quad (3)$$

其中, S_{λ} 是屏蔽因子, A (cm^{-1}) 是特定波长下的衰减系数, b (2 cm) 是光化学反应中比色管的路径长度。由计算可得, 在考察的酶活范围内 HRP 的 S_{λ} 值均接近于 1, 即没有发现 HRP 的光屏蔽作用, 这可能是因为 HRP 对光的吸收较弱或浓度较低。这些结果表明 HRP 只促进了 E2 的光降解, 没有光屏蔽作用。

有学者认为光照条件下量子点 CdS QDs 产生的活性氧物种 (ROS) 如 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 可激活 P450 单加氧酶^[30], 且 Fruk 等人证明了该量子点可激活活性中心为亚铁血红素的多种过氧化物酶, 包括细胞色素 C、HRP 和肌红蛋白过氧化物酶^[31]。因此, 通过活性氧猝灭实验测定 E2 体系中产生的 ROS, 结果如图 3 所示。分别加入 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 捕获剂 NBT、 $^1\text{O}_2$ 捕获剂和三重激发态捕获剂山梨酸后, 与对照相比, E2 的光解分别被抑制了约 64.5%、66.3% 和 19.4% (根据假一级动力学速率常数计算), 表明 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $^1\text{O}_2$ 对 E2 的光解起着不可或缺的作用, 且三重激发态也参与了 E2 的光解, 而在 $\cdot\text{OH}$ 猝灭剂 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 异丙醇存在下, E2 的光降解动力学曲线与直接光解接近, 表明 $\cdot\text{OH}$ 对 E2 光降解的贡献微不足道。除此之外, 本实验通过过氧化物酶-萘苝荧光衰减法测到了 E2 体系中的 H_2O_2 , 且 H_2O_2 的生成符合零级动力学, 生成速率为 35 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, 上述结果说明 E2 在光照条件下可生成 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $^1\text{O}_2$ 和 H_2O_2 。根据相关文献^[32-34] 推测 E2 自敏化生成 ROS 的过程为: E2 在光照激发下形成单重态, 然后通过系间窜越 (intersystem crossing, ISC) 形成三重态, 接下来, 三重态将能量传递给 O_2 形成 $^1\text{O}_2$ 或通过自电离形成自由基 (E2^+ 、 $\text{E2}^{\cdot-}$) 和 e_{aq}^- , 而 e_{aq}^- 可与 O_2 发生电子转移形成 $\text{O}_2^{\cdot-}$, 然后 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 会和溶液中的 H^+ 结合生成 H_2O_2 。因此可以推测 E2 自敏化产生的 ROS 激活了 HRP, 从而促进了 E2 的酶降解。

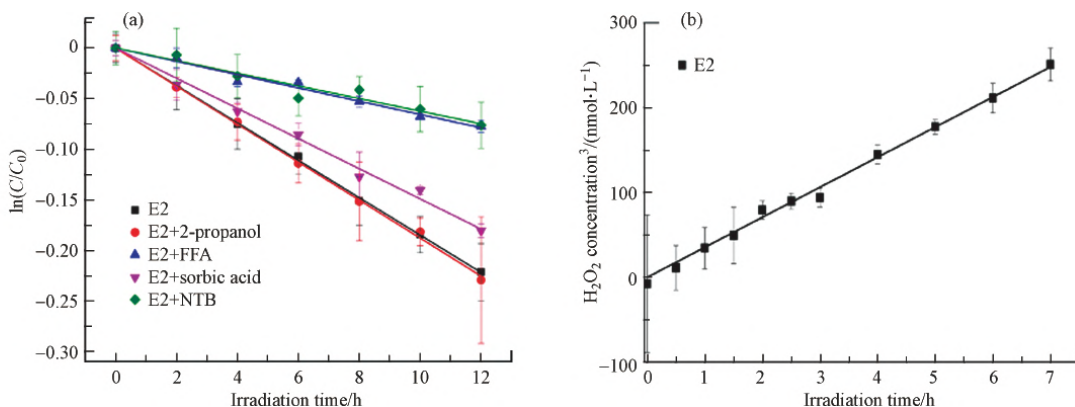


图 3 E2 在 PBS 溶液中产生的活性氧物种鉴定实验

Fig.3 Identification the ROS generated by E2 photolysis in PBS

另外, 有学者认为 $\cdot\text{OH}$ 也能激活酶^[30-31], 因而导致光酶协同降解雌激素。 $\cdot\text{OH}$ 、 $^1\text{O}_2$ 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 普遍存在于天然水体中, 浓度范围分别为 10^{-14} — 10^{-19} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 10^{-12} — 10^{-14} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 10^{-9} — 10^{-11} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 10^{-9} — 10^{-7} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[35], 且与过氧化物酶和污染物并存, 因此, 过氧化物酶会对污染物的光化学归趋产生重大影响。除此之外, 本研究对于酶处理技术在水处理方面的应用同样有参考价值。在酶处理技术中, H_2O_2 的存在需要严格的条件, 又会影响酶的稳定性^[36], 同时, 过量的 H_2O_2 会排入天然水环境, 从而影响水生生态系统。若能将过氧化物酶与光结合, 既不用像之前一样通过添加辅助因子来激活酶, 又能促进污染物的降解, 还可精准控制酶活, 形成多赢的局面。

2.3 E2 在 HRP 溶液中的光降解产物

为了进一步研究 HRP 和光协同促进雌激素光酶降解的机制,通过 SPE/LC/MS 方法分析了 E2 在 PBS 和 HRP 共存溶液中的光转化产物以及黑暗对照组(E2 和 HRP 及外加 H_2O_2 反应体系)中的酶降解产物.结果如图 4 所示,在酶降解体系中,共鉴定出 5 种二聚物(Dimer1-5),其中,二聚物 3(Dimer3)峰面积最大.在 E2 的直接光解体系中,鉴定出 3 种聚合物(Dimer1-3),说明二聚物 4、5(Dimer4、5)是酶降解的专一产物.在 E2 和 HRP 共存的光降解溶液中鉴定出来的产物种类与酶降解相同(Dimer1-5),这说明了光解过程伴随着酶降解的发生;而产物峰面积有所差异,二聚物 2(Dimer2)和二聚物 3(Dimer3)峰面积接近,这也进一步暗示了酶降解和光降解共存.另外, Mao 等研究 E2 在过氧化物酶催化转化下的聚合产物与本文光酶体系中检测到的产物类似,且通过雌激素活性测定发现耦合产物是没有雌激素效应的^[23],说明 E2 通过光酶协同降解后,生态风险被降低.

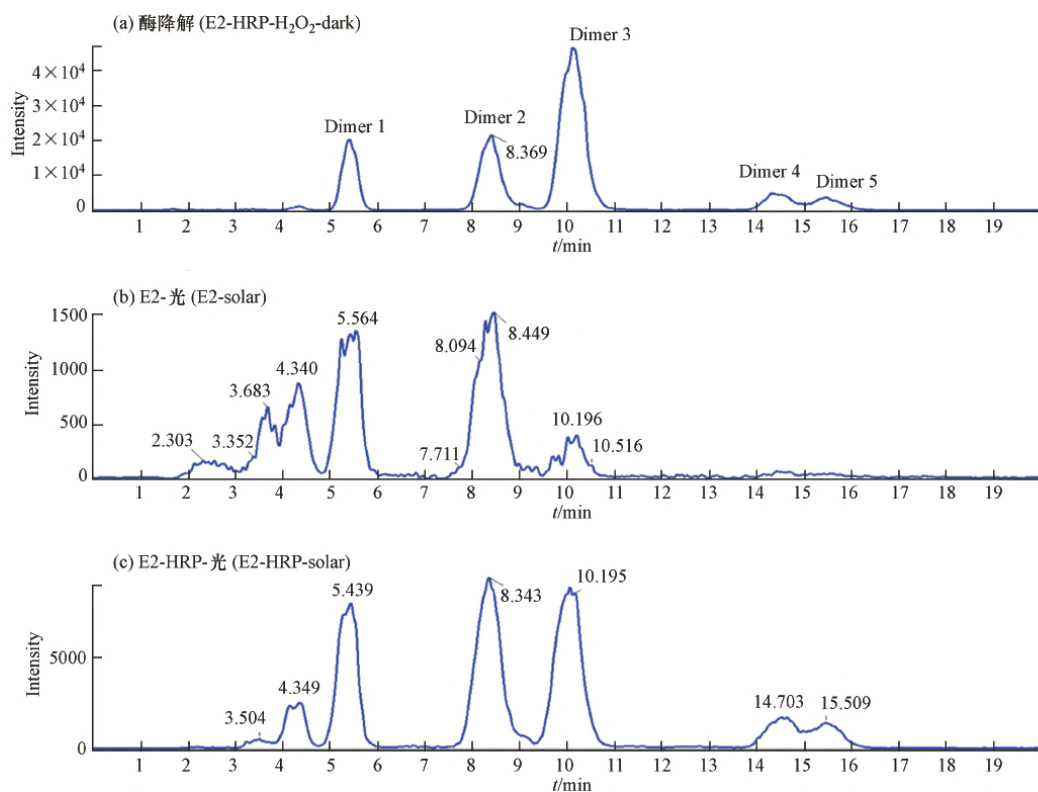


图 4 E2 在酶降解黑暗体系(E2、HRP 和外加 H_2O_2) (a)、PBS 光降解(b)或 HRP 光降解溶液中(c)的聚合产物
Fig.4 The dimer products of E2 degradation in (a) HRP and additional H_2O_2 under dark condition, (b) PBS solution under simulated sunlight, and (c) HRP solution under simulated sunlight

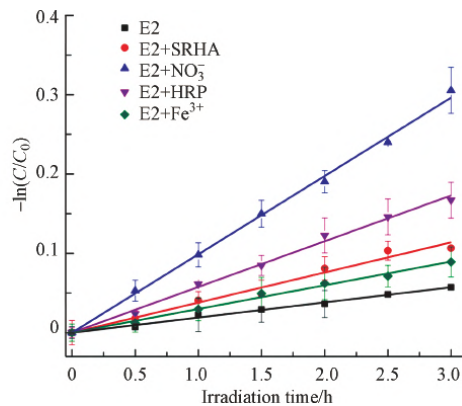
2.4 HRP 和常见水质成分对 E2 光解作用的比较

硝酸根(NO_3^-)、腐殖质和铁离子(Fe^{3+})普遍存在于天然水体,并有光化学活性,一般会影响污染物在天然水体的光化学行为,因此,本实验比较了环境浓度下的 HRP($0.01 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$)、 NO_3^- ($1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、 Fe^{3+} ($30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和 SRHA($5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{C}$)对 E2 光解的影响.结果如图 5 所示,E2 在这 4 个水质成分作用下的光降解仍呈假一级动力学,且这 4 个水质成分均促进了 E2 的光解,假一级速率常数 k_{obs} 从大到小依次为 $\text{NO}_3^- > \text{HRP} > \text{SRHA} > \text{Fe}^{3+}$ (表 1).但由于这几个环境因子都能与 E2 竞争吸收光子, k_{obs} 不能代表其对 E2 光解的真正贡献,因此扣除这几个因子的光屏蔽作用,校正 E2 的直接光解速率(式 4—5),并计算这 4 个环境因子引起的其他光解速率常数(表 1):

$$k_{\text{dp}} = k_{\text{PBS}} \times s_i \quad (4)$$

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{dp}} + k_{\text{other}} \quad (5)$$

其中, k_{PBS} 是 E2 在 PBS 缓冲液中的直接光解速率常数, k_{dp} 和 k_{other} 分别是 E2 在不同溶液中的校正直接光解速率常数和环境因子导致的其他光解速率常数.

图 5 E2 在 SRHA、NO₃⁻、HRP 或 Fe³⁺溶液中的光解动力学Fig.5 Degradation kinetics of E2 in SRHA, NO₃⁻, HRP or Fe³⁺ solutions表 1 E2 在不同反应溶液中的假一级动力学速率常数(k_{obs})和直接光解、其他降解预测贡献率Table 1 Observed pseudo-first-order rate constants (k_{obs}) and predicted contributions from direct photolysis and other degradation of E2 in different water solutions.

溶液 Solution	$k_{\text{obs}}/\text{d}^{-1}$	S_{λ}	$k_{\text{dp}}/\text{d}^{-1}$	$k_{\text{other}}/\text{d}^{-1}$	DP/%	Other/%
E2	0.456	1.00	0.456	—	100	—
E2+SRHA	0.911	0.784	0.358	0.553	40	60
E2+NO ₃ ⁻	2.37	0.995	0.454	1.916	19	81
E2+ HRP	1.383	1	0.456	0.927	33	67
E2 + Fe ³⁺	0.717	0.926	0.422	0.295	59	41

SRHA 和 Fe³⁺的 S_{λ} 分别为 0.784 和 0.926(表 1), 均小于 1.0, 表明 SRHA 和 Fe³⁺均具有光屏蔽效应, 对 E2 的光降解有抑制作用, 而 HRP 和 NO₃⁻基本上没有. 扣除 SRHA 和 Fe³⁺的光屏蔽因子之后, E2 在这俩溶液中的 k_{other} 值仍为正值, 表明 SRHA 和 Fe³⁺对 E2 的光降解还存在促进作用, 且促进作用占主导低位. 对于 E2 在 SRHA 和 NO₃⁻溶液中的光降解, 由它们导致的间接光解是 E2 转化的主要途径, 而对于 E2 在 HRP 溶液中的光降解, HRP 引起的酶降解是 E2 转化的主要途径, 但对于 E2 在 Fe³⁺溶液中的光降解, 直接光解是其转化的主要途径. 比较这些水质成分对 E2 转化的真正贡献率发现 HRP 的贡献率小于 NO₃⁻、大于 SRHA 和 Fe³⁺导致的贡献, 表明研究污染物在天然水环境中的光化学行为及其环境归趋时, 应重视 HRP 对这个过程的影响.

3 结论(Conclusion)

本文系统地研究了 HRP 对 E2 光降解过程的影响. 研究发现有活性的 HRP 可显著促进 E2 的光化学转化, 且促进作用随着活性的增大而增强. 这是由于 E2 自敏化产生的活性物种可激活 HRP, 从而促进了 E2 在光照条件下的酶降解, 且 E2 在 HRP 溶液中的光转化中间体中有酶降解产生的聚合物进一步证实了这个推测. HRP 对 E2 酶降解的效率高于常见水质成分 SRHA 和 Fe³⁺的效率, 弱于 NO₃⁻引起的贡献率, 表明应重视 HRP 对污染物在天然水体中的环境归趋的影响. 然而, 敏化剂在实际天然水体中往往是共存的, 情况非常复杂, 因此, 本文的研究结果具有一定的局限性, 在后续研究中, 应逐渐将反应体系复杂化. 另外, 若能将光和过氧化物酶结合, 既不用像之前一样通过添加辅助因子来激活酶, 又可促进污染物的降解, 还可精准控制酶活, 这将为酶处理技术在水处理方面的应用带来巨大前景.

参考文献 (References)

- [1] MILLS L J, CHICHESTER C. Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? [J]. Science of the Total Environment, 2005, 343(1/2/3): 1-34.
- [2] VOS J G, DYBING E, GREIM H A, et al. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the

- European situation [J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 2000, 30(1): 71-133.
- [3] ZUO Y G, ZHANG K, ZHOU S. Determination of estrogenic steroids and microbial and photochemical degradation of 17 α -ethinylestradiol (EE2) in lake surface water, a case study [J]. *Environmental Science. Processes & Impacts*, 2013, 15(8): 1529-1535.
- [4] ZHOU Z C, CHEN B N, QU X L, et al. Dissolved black carbon as an efficient sensitizer in the photochemical transformation of 17 β -estradiol in aqueous solution [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(18): 10391-10399.
- [5] PAPAEVANGELOU V A, GIKAS G D, TSIHRINTZIS V A, et al. Removal of Endocrine Disrupting Chemicals in HSF and VF pilot-scale constructed wetlands [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2016, 294: 146-156.
- [6] 李晓曼, 黄斌, 孙雯雯, 等. 类固醇雌激素环境行为研究进展 [J]. *环境化学*, 2014, 33(8): 1276-1286.
LI X M, HUANG B, SUN W W, et al. Research progress on the environmental behavior of steroid estrogens [J]. *Environmental Chemistry*, 2014, 33(8): 1276-1286 (in Chinese).
- [7] ONDA K, NAKAMURA Y, TAKATO H C, et al. The behavior of estrogenic substances in the biological treatment process of sewage [J]. *Water Science and Technology*, 2003, 47(9): 109-116.
- [8] TABATA A, KASHIWADA S, OHNISHI Y, et al. Estrogenic influences of estradiol-17 beta, p-nonylphenol and bis-phenol-A on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) at detected environmental concentrations [J]. *Water Science and Technology*, 2001, 43(2): 109-116.
- [9] KUCH H M, BALLSCHMITER K. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range [J]. *Environmental Science & Technology*, 2001, 35(15): 3201-3206.
- [10] YING G G, KOOKANA R S, RU Y J. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment [J]. *Environment International*, 2002, 28(6): 545-551.
- [11] METCALFE C D, METCALFE T L, KIPARISSIS Y, et al. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by *in vivo* assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2001, 20(2): 297-308.
- [12] MA L, YATES S R. Dissolved organic matter and estrogen interactions regulate estrogen removal in the aqueous environment: A review [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 640/641: 529-542.
- [13] WRITER J H, RYAN J N, KEEFE S H, et al. Fate of 4-nonylphenol and 17 β -estradiol in the redwood river of Minnesota [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(2): 860-868.
- [14] 马哲, 王杰琼, 陈景文, 等. pH对不同来源溶解性有机质光致生成活性物种量子产率的影响 [J]. *环境化学*, 2017, 36(9): 1889-1895.
MA Z, WANG J Q, CHEN J W, et al. Effect of pH on the quantum yield of reactive photo-induced species generated in different sources of DOM [J]. *Environmental Chemistry*, 2017, 36(9): 1889-1895 (in Chinese).
- [15] WANG X H, YAO J Y, WANG S Y, et al. Phototransformation of estrogens mediated by Mn(III), not by reactive oxygen species, in the presence of humic acids [J]. *Chemosphere*, 2018, 201: 224-233.
- [16] SILVA C P, LIMA D L D, OTERO M, et al. Photosensitized degradation of 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol: Role of humic substances fractions [J]. *Journal of Environmental Quality*, 2016, 45(2): 693-700.
- [17] GURR C J, REINHARD M. Harnessing natural attenuation of pharmaceuticals and hormones in rivers [J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(9): 2872-2876.
- [18] SENESI N, XING B, HUANG P M. Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems//formation mechanisms of humic substances in the environment[M]. John Wiley & Sons, 2009: 41-109.
- [19] MÜNSTER U, HEIKKINEN E, SALONEN K, et al. Tracing of peroxidase activity in humic lake water [J]. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 1998, 26(3): 158-166.
- [20] BUCK U, BABENZIEN H D, ZWIRNMANN E. Extracellular peroxidase activity in an experimentally divided lake (Große Fuchskuhle, northern Germany) [J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2008, 51: 97-103.
- [21] LU J H, HUANG Q G, MAO L. Removal of acetaminophen using enzyme-mediated oxidative coupling processes: I. reaction rates and pathways [J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(18): 7062-7067.
- [22] LI J H, ZHANG Y, PENG J B, et al. The effect of dissolved organic matter on soybean peroxidase-mediated removal of triclosan in water [J]. *Chemosphere*, 2017, 172: 399-407.
- [23] MAO L, HUANG Q G, LU J H, et al. Ligninase-mediated removal of natural and synthetic estrogens from water: I. reaction behaviors [J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(2): 374-379.
- [24] LI J H, ZHANG Y, HUANG Q G, et al. Degradation of organic pollutants mediated by extracellular peroxidase in simulated sunlit humic waters: A case study with 17 β -estradiol [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2017, 331: 123-131.
- [25] XU L P, LI H, MITCH W A, et al. Enhanced phototransformation of tetracycline at smectite clay surfaces under simulated sunlight via a lewis-base catalyzed alkalization mechanism [J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(2): 710-718.

- [26] SHI H H, WANG G W, HUANG Q G, et al. The mutual promotion of photolysis and laccase-catalysis on removal of dichlorophen from water under simulated sunlight irradiation [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 338: 392-400.
- [27] YAN S W, SONG W H. Photo-transformation of pharmaceutically active compounds in the aqueous environment: A review [J]. *Environmental Science. Processes & Impacts*, 2014, 16(4): 697-720.
- [28] 唐乾, 宫婷婷, 曹洪玉, 等. 光诱导辣根过氧化物酶催化活性变化及机理研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2018, 38(12): 3692-3698.
TANG Q, GONG T T, CAO H Y, et al. Mechanism of the variation of horseradish peroxidase catalytic activity induced by light [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2018, 38(12): 3692-3698(in Chinese).
- [29] BOREEN A L, EDHLUND B L, COTNER J B, et al. Indirect photodegradation of dissolved free amino acids: The contribution of singlet oxygen and the differential reactivity of DOM from various sources [J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(15): 5492-5498.
- [30] IPE B I, NIEMEYER C M. Nanohybride aus Quantenpunkten und Cytochrom P450 als Photokatalysatoren [J]. *Angewandte Chemie*, 2006, 118(3): 519-522.
- [31] FRUK L, RAJENDRAN V, SPENGLER M, et al. Light-induced triggering of peroxidase activity using quantum dots [J]. *Chembiochem*, 2007, 8(18): 2195-2198.
- [32] ZHANG S Y, CHEN J W, QIAO X L, et al. Quantum chemical investigation and experimental verification on the aquatic photochemistry of the sunscreen 2-phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid [J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(19): 7484-7490.
- [33] JI Y F, ZHOU L, ZHANG Y, et al. Photochemical degradation of sunscreen agent 2-phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid in different water matrices [J]. *Water Research*, 2013, 47(15): 5865-5875.
- [34] ZHANG Y, del VECCHIO R, BLOUGH N V. Investigating the mechanism of hydrogen peroxide photoproduction by humic substances [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(21): 11836-11843.
- [35] 周磊. 天然水体中防晒剂对氨基苯甲酸和碳纳米管的光化学行为研究[D]. 南京: 南京大学, 2014.
ZHOU L. Photochemical behavior of sunscreen agent p-aminobenzoic acid and carbon nanotubes in natural waters[D]. Nanjing: Nanjing University, 2014(in Chinese).
- [36] ARNAO M B, ACOSTA M, del RÍO J A, et al. A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1990, 1041(1): 43-47.