

**І.І. Романовська, О.В. Осійчук, Ю.А. Шестеренко, О.В. Севастьянов**

Фізико-хімічний інститут імені О.В. Богатського НАН України, Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна, тел.: 8 (048) 76 594 31, e-mail: irinagoma@gmail.com; osey4uk@gmail.com

## **ФЕРМЕНТАТИВНІ МЕТОДИ ЕЛІМІНАЦІЇ ФЕНОЛЬНИХ ПОЛЮТАНТІВ**

*З використанням частково очищених препаратів окиснювано-відновлюваних ферментів: пероксидази хрону і тирозинази грибів *Agaricus bisporus* розроблені методи кількісної елімінації фенолу при оптимальних значеннях рН, температури, часу, концентрацій ферментів, субстратів і неорганічних коагулянтів. Показано вплив природи фенольного субстрату у розташування замісників у його молекулі (о-, м-, п-хлорфеноли) на процес пероксидазного окиснення.*

*Ключові слова: пероксидаза, тирозиназа, елімінація, фенольні сполуки*

Існуючі методи очищення стічних вод від фенолів, небезпечних забруднювачів навколишнього середовища (хімічне окиснення, мікробна деградація, адсорбція активованим вугіллем, екстракція розчинниками), незважаючи на їх ефективність, мають низку істотних недоліків, таких як висока вартість, неповнота очищення, утворення токсичних продуктів.

Перспективним напрямом в очищенні стічних вод є розробка нових технологій з використанням окиснювано-відновлюваних ферментів (пероксидази хрону та тирозинази з грибів) завдяки їх селективності, можливості застосування у широкому діапазоні рН, температур, концентрацій токсикантів, утворенню менш токсичних продуктів [1 – 3].

Пероксидаза (К.Ф. 1.11.1.7) каталізує у присутності пероксиду водню окиснення фенолів [4] з утворенням, в основному, нерозчинних, легко відокремлюваних продуктів окиснення; однак, пероксид водню може стати додатковим забруднювачем навколишнього середовища.

Тирозиназа (К.Ф. 1.14.18.1) каталізує окиснення фенольних субстратів у присутності молекулярного кисню до відповідних о-хінонів, які піддаються неферментативному окисненню до розчинних темно-забарвлених олігомерних продуктів [5], внаслідок чого виникає необхідність застосування коагулянтів для їх видалення. Однак, відомі методи елімінації продуктів біоконверсії за допомогою полімерів природного та синтетичного походження [2, 3] є не досить економічними.

Одним з суттєвих факторів, що обмежують застосування ферментів, є висока вартість їх комерційних препаратів, тому доцільно дослідження елімінації фенольних полютантів з використанням частково очищених препаратів ферментів.

Метою даного дослідження є розробка ферментативних методів видалення фенольних сполук з використанням частково очищених препаратів пероксидази хрону (ПОХ), тирозинази грибів (ТИР) та неорганічних коагулянтів.



### Матеріали і методи

У роботі використовували частково очищені препарати пероксидази хрону і тирозинази з грибів *Agaricus bisporus*, виділені за модифікованими нами методами [6] та [7], відповідно. У ферментних препаратах визначали вміст білка методом Лоурі в модифікації Хартрі [8], активність за тирозином [7] (ТИР), спектральний показник чистоти ( $RZ=A_{403}/A_{278}$ ), (ПОХ) [6], ступінь очищення за вмістом іонів міді (ТИР) [3], рН-, термооптимум, строк зберігання і вартість.

Концентрацію пероксидази та пероксиду водню визначали спектрофотометрично, використовуючи молярні коефіцієнти поглинання  $\varepsilon=102000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  при 403 нм і  $\varepsilon=72,4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  при 230 нм, відповідно [7]. Концентрації субстратів (фенолу, *o*-, *m*-, *p*-хлорфенолів) визначали 4-аміноантипіриновим методом [9].

рН-залежність реакції трансформації фенолів вивчали в діапазоні значень рН 3,0 – 10,0 з використанням відповідних буферних розчинів; вплив температури реакції в інтервалі 5 – 70 °С при рН 7,0.

Коагуляцію продуктів ферментативного окиснення фенолу проводили за допомогою алюмоамонійних, алюмокалієвих та залізоамонійних галунів, при вихідній концентрації фенолу 0,5 – 10 ммоль/дм<sup>3</sup>, концентрації коагулянтів 1 – 20,7 г/дм<sup>3</sup>. При визначенні необхідної для очищення води концентрації коагулянтів використовували методику пробного коагулювання [10], що імітує коагуляційне очищення з наступним відстоюванням. Ступінь видалення продуктів окиснення фенолу визначали спектрофотометрично [2].

### Результати та їх обговорення

З метою оптимізації пероксидазного методу елімінації фенолів з використанням ПОХ, був виділений фермент з коренів хрону за модифікованим методом Баха та вивчені його біохімічні властивості.

Як видно з даних, представлених у табл. 1, вивчення біохімічних властивостей виділеного ферменту ( $RZ$ , активність, рН-, термооптимум), зберігання і порівняння отриманих характеристик з аналогічними даними комерційного препарату ПОХ ("Sigma",  $RZ = 2,7$ ) свідчить про досить близькі властивості препаратів ферменту, за винятком ступеня чистоти, строків зберігання і вартості. Отриманий препарат ПОХ відрізняється більшою економічністю у порівнянні із комерційним.

Таблиця 1

#### Характеристики частково очищеної і комерційної ПОХ

Характеристики ферменту	Частково очищений препарат ПОХ	Комерційний препарат ПОХ ("Sigma")
$RZ (A_{403}/A_{278})$	1,0	2,7
Активність, од/хв · мг ферменту	100	100
рН-оптимум	6,0-7,0	6,0-7,0
Термооптимум, °С	30-40	30-40
Строк зберігання, міс.	5	24
Вартість 1г, грн	65	1580



З грибів *Agaricus bisporus* отримано частково очищений препарат тирозинази. Метод виділення ферменту був модифікований додаванням полікапроаміду, що привело до збільшення активності ТИР в 3 рази та зниження її вартості порівняно з комерційною (Fluka) в 11 разів. Отримано препарат ТИР з питомою активністю 500 од/хв · мг білка, вмістом білка 0,3 мг/г, строком зберігання 6 міс; вмістом міді в препараті 0,193 %, що дозволило розрахувати ступінь його чистоти — 84,5 %.

Важливо було встановити, наскільки ефективність процесу дефенізації, що каталізується частково очищеними ферментними препаратами, залежить від рН, температури інкубаційного середовища, концентрації реагентів і часу проведення реакції.

Як свідчать дані, представлені на рис. 1, максимальний ступінь біоконверсії досліджуваних полютантів (фенолу — 80,4 %, *o*-, *m*-, *p*-хлорфенолів — 68,1 %, 25,2 %, 71,0 %, відповідно) з використанням ПОХ спостерігається в інтервалах 6,0 — 7,5 і 4,0 — 5,0 од. рН і в діапазоні 20 — 40 °С — для фенолу, 30 — 40 °С — для хлорфенолів.

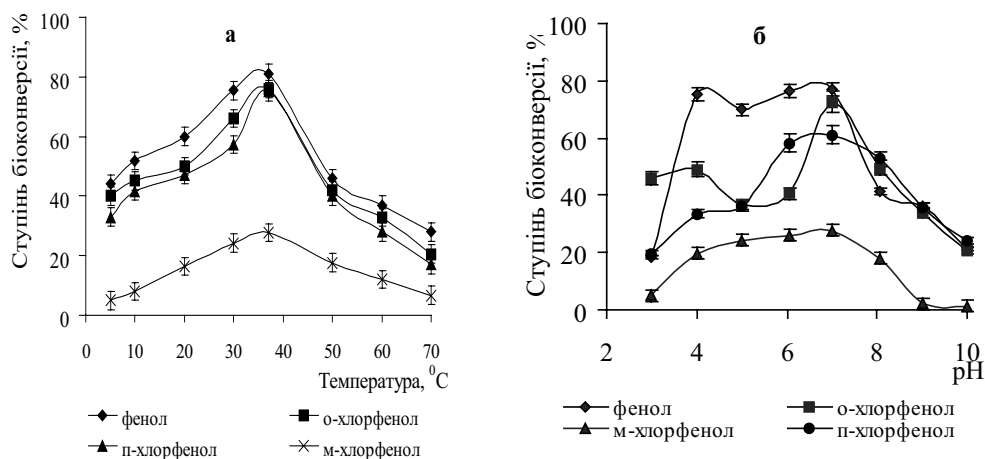


Рис. 1. Залежність ефективності пероксидазного окиснення фенолів від температури (а) і рН (б) інкубаційного середовища ([фенольний субстрат] = 1,0 ммоль/дм<sup>3</sup>, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 1,0 ммоль/дм<sup>3</sup>, активність ПОХ 0,1 од/см<sup>3</sup>, рН 7,0, t = 37 °С, τ = 1 год.)

Fig. 1. Correlation of fenol peroxidative oxidation efficiency with the temperature (a) and pH (b) of the incubative environment ( phenol substrate) = 1,0 Mmol/dm<sup>3</sup>, {H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>} = 1,0 Mmol/dm<sup>3</sup>, activity POX 0,14 U/cm<sup>3</sup> pH=7,0, t=37 °С, τ=1 hour

Як видно з даних, представлених у табл. 2, максимальний ступінь трансформації фенолу тирозиназою спостерігається при рН 5,5 — 7,0 і температурі 20 — 50 °С.

Ефективність трансформації фенолів ПОХ зростає при підвищенні концентрації окислювача-пероксиду водню (до 1,0 ммоль/дм<sup>3</sup>) (рис. 2а) і активності ПОХ (до 0,1 од/см<sup>3</sup>) (рис. 2б).

Вивчення ступеня біоконверсії фенольних сполук від їх концентрації свідчить про те, що в інтервалі концентрацій 0,1 — 3,0 ммоль/дм<sup>3</sup> спостерігається її зниження з 100 % до 25,2 % для фенолу, до 29,5 % — для *o*-хлорфенолу, до 17,2 % — для *p*-хлорфенолу і до 0 % — для *m*-хлорфенолу.



Вплив рН і температури інкубаційного середовища на ступінь окиснення фенолу, що каталізується тирозиназою

рН	Ступінь трансформації фенолу, % від макс.	Температура, °С	Ступінь трансформації фенолу, % від макс.
3	1,9	2	23,7
4	28,3	10	62,3
5	53,3	20	79,2
5,5	90,2	25	88,3
6	98,1	30	93,4
6,5	100,0	40	100,0
7	97,5	50	90,4
8	50,5	60	66,0
9	28,1	70	47,9
10	2,2	80	31,3

Час, необхідний для досягнення максимального ступеня біоконверсії досліджуваних фенолів, досягає 0,5 – 1 год. (мольне співвідношення фенол:  $H_2O_2 = 0,1(0,5):1$ , рН 7,0,  $t = 37\text{ }^\circ\text{C}$ , активність ПОХ 0,1 од/см<sup>3</sup>); збільшення часу інкубації до 24 годин істотно не сприяє (на 5 – 10 %) підвищенню ступеня трансформації токсикантів.

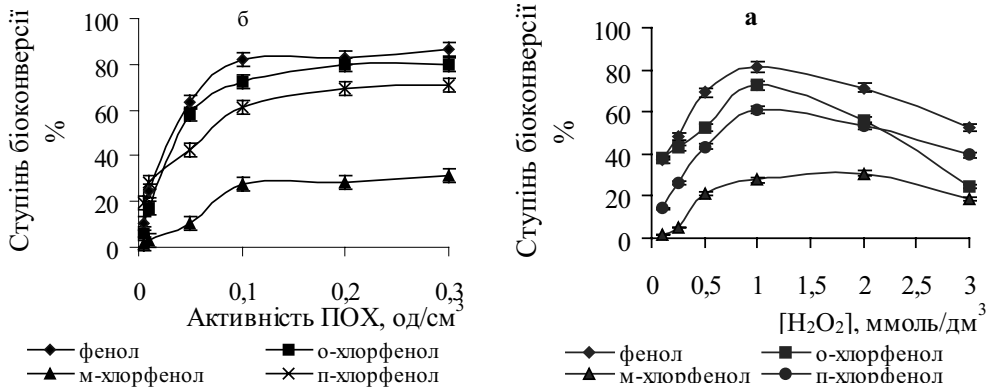


Рис. 2. Залежність ефективності пероксидазного окиснення фенолів від концентрації перексиду водню (а) ([фенольний субстрат] – 1,0 ммоль/дм<sup>3</sup>, активність ПОХ 0,1 од/см<sup>3</sup>, рН 7,0,  $t = 37\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 1$  год) і активності ПОХ (б) ([фенольний субстрат] – 1,0 ммоль/дм<sup>3</sup>,  $[H_2O_2] = 1,0$  ммоль/дм<sup>3</sup>, рН 7,0,  $t = 37\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 1$  год)

Fig. 2. Correlation between phenol peroxidative oxidation efficiency and hydrogen peroxide concentration (a) {phenol substrate} – 1,0 Mmol/dm<sup>3</sup> activity POX 0,1 u/cm<sup>3</sup>, рН – 7,0,  $t = 37\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 1$  hour and activity POX (b) {phenol substrate} – 1 Mmol/dm<sup>3</sup>,  $[H_2O_2] = 1,0$  Mmol/dm<sup>3</sup>, рН – 7,0,  $t = 37\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\tau = 1$  hour

За допомогою виділеної тирозинази проведено окиснення фенолу в широкому діапазоні концентрацій (0,5 — 10 ммоль/дм<sup>3</sup>), при цьому ступінь окиснення у всіх випадках становив більше 98 %, що відповідає даним Ikehata K. et al. [2], які використовували комерційний препарат ТИР. Слід зазначити, що ступінь біоконверсії фенолу підвищується при збільшенні активності ферменту, досягаючи максимального рівня після 1 год. інкубації з тирозиназою з активністю 50 од/см<sup>3</sup>. При використанні ферменту меншої активності (30 і 10 од/см<sup>3</sup>) час, необхідний для максимального ступеня трансформації, збільшується до 3 і 24 годин, відповідно (рис. 3).

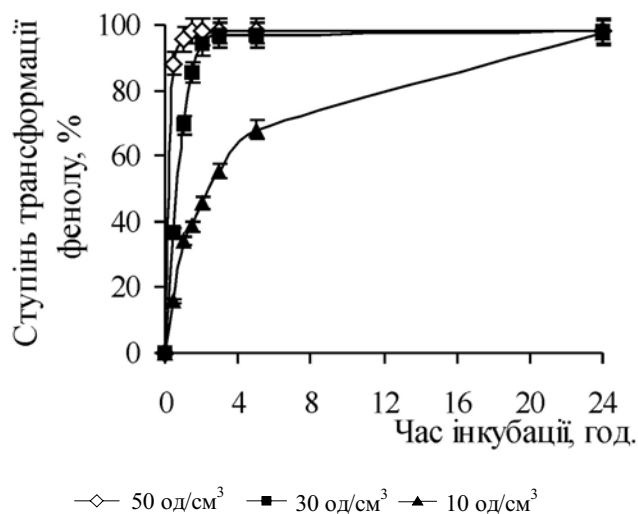


Рис. 3. Залежність ступеня трансформації фенолу від часу (концентрація фенолу 0,5 ммоль/дм<sup>3</sup>, температура 30 °С, рН 6,5)

Fig. 3. Correlatin between phenol transphormation level and time (phenol concentration 0,5 mM/dm<sup>3</sup>, temperature 30 °С, рН 6,5)

У результаті пероксидазного окиснення досліджуваних фенолів спостерігалось утворення полімерних продуктів (розмір часток 15-75 мкм), нерозчинних у воді та органічних розчинниках, що обвуглювалися при температурі 240 — 260 °С, які за даними ІЧ-спектроскопії і мас-спектрометрії є поліоксифеніленами.

Для видалення розчинних забарвлених продуктів окиснення фенолу, що каталізується тирозиназою, використовували коагулянти: алюмокалієві, алюмоамонійні та залізоамонійні галуни, які для цього процесу раніше не застосовувалися. Очищенню коагулянтами піддавалися розчини фенолу (0,5 — 10 ммоль/дм<sup>3</sup>), окиснені в присутності тирозинази більш, ніж на 98 %.

За допомогою обраних коагулянтів була здійснена елімінація продуктів реакції з ступенем видалення у всіх випадках більше 97 %; при цьому концентрації алюмоамонійних і алюмокалієвих галунів становили 1,0 — 17,5 г/дм<sup>3</sup>, залізоамонійних — 1,7 — 20,7 г/дм<sup>3</sup> (рис. 4). Подібний ступінь елімінації продуктів окиснення фенолу спостерігався при використанні хітозану, але даний спосіб має суттєві недоліки — високу вартість хітозану та незручність його застосування через отримання хітозану за допомогою дезацетилювання хітину з панцирів ракоподібних [2].



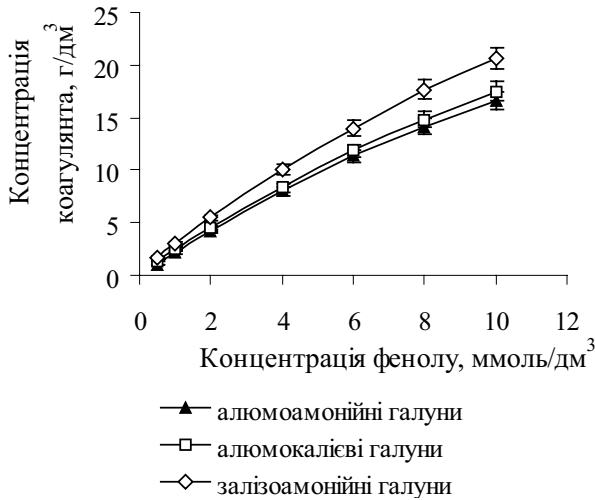


Рис. 4. Концентрації коагулянтів, необхідні для 97 %-ної елімінації продуктів біоконверсії ( $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH } 6,5$ ,  $\tau = 3$  год)

Fig. 4. Coagulants concentration values needed for 97 % bioconversion products elimination ( $t=25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH } 6,5$   $\tau=3$  hours)

Таким чином, з використанням частково очищених препаратів окиснювано-відновлених ферментів: пероксидази хрому і тирозинази грибів досліджені методи кількісної елімінації фенолу при оптимальних значеннях рН, температури, часу, концентрацій ферментів, субстратів, та вперше застосованих неорганічних коагулянтів. Показано вплив природи фенольного субстрату та розташування замісників у його молекулі (*o*-, *m*-, *p*-хлорфеноли) на процес пероксидазного окиснення.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Wagner M., Nicell J.A. Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide // *Water Res.* — 2002. — V. 36. — P. 4041 — 4052.
2. Ikehata K., Nicell J. Color and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols // *Biotechnol. Prog.* — 2000. — V.16, N 4. — P. 533 — 540.
3. Halaouli S., Asther M., Sigoillot J.-C. et al. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and applications // *J. Appl. Microbiol.* — 2006. — V.100. — P. 219 — 232.
4. Guopsing Z., Nicell J.A. Treatment of aqueous pentachlorophenol by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide // *Water Res.* — 2000. — V. 34. — P. 1629-1637.
5. Singh A., Billinsley K.A., Ward O.P. Transformation of polychlorinated biphenyls with oxidative enzymes // *Bioprocess Engineering.* — 2000. — V. 23, № 3. — P. 421-425.
6. Михлин Д.М. Биологическое окисление. — М.: Изд-во Академии наук СССР, 1956. — 442 с.
7. Гребешова Р.Н. Способы стабилизации ферментных препаратов // *Прикладная биохимия и микробиология.* — 1994. — № 2. — С. 196-203.
8. Hartree E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // *Anal. Biochem.* — 1972. — V. 48, № 1. — P. 422-427.
9. Коренман И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. М.: Химия, 1975. — 360 с.
10. Ярошевская Н.В., Сергиенко А.Н., Муравьев В.Р. и др. Оценка особенностей процесса коагуляционной очистки воды на основании кривых коагуляции // *Химия и технология воды.* — 2005. — Т. 27, N 2. — С. 173 — 183.

**И.И. Романовская, О.В. Осейчук, Ю.А. Шестеренко,  
О.В. Севастьянов**

Физико-химический институт имени А.В. Богатского НАН Украины, Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080, Украина, тел.: 8 (048) 765 43 31, e-mail: irinaroma@gmail.com; osey4uk@gmail.com

**ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ МЕТОДЫ ЭЛИМИНАЦИИ ФЕНОЛЬНЫХ ПОЛЛЮТАНТОВ**

**Реферат**

С использованием частично очищенных препаратов окислительно-восстановительных ферментов: пероксидазы хрена и тирозиназы грибов *Agaricus bisporus* разработаны методы количественной элиминации фенола при оптимальных значениях рН, температуры, времени, концентраций ферментов, субстратов и неорганических коагулянтов. Показано влияние природы фенольного субстрата и расположения заместителей в его молекуле (*o*-, *m*-, *p*-хлорфенолы) на процесс пероксидазного окисления.

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** пероксидаза, тирозиназа, элиминация, фенольные соединения

**I.I. Romanovska, O.V. Oseychuk, Yu.A. Shesterenko,  
O.V. Sevastyanov**

A.V. Bogatsky's Physico-Chemical Institute, UNAS, Lyusdorfska road, 86, Odesa, 65080, Ukraine, tel.: 8 (048) 765 94 31, e-mail: irinaroma@gmail.com; osey4uk@gmail.com

**ENZYMATIC METHODS OF PHENOLIC POLLUTANTS  
ELIMINATION**

**Summary**

With usage of partially purified oxidative-reductive enzymes: horseradish peroxidase and mushroom *Agaricus bisporus* tyrosinase, the methods of quantitative phenol elimination were developed at optimal pH-, temperature, time, enzyme, substrates and inorganic coagulants concentration values; the influence of phenolic substrate nature and the substituents position in its molecule (*o*-, *m*-, *p*-chlorophenols) on the peroxidative oxidation process was shown.

**К e y w o r d s:** peroxidase, tyrosinase, elimination, phenolic compounds.

