

УДК 665.58.002.39 (088.8)

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

Фізико-хімічний інститут імені О.В. Богатського НАН України,
Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна,
тел.: +38 (048) 765 94 31, e-mail: romairina@gmail.com

ВИДАЛЕННЯ ФЕНОЛУ З МОРСЬКОЇ ВОДИ З ВИКОРИСТАННЯМ ВІЛЬНОЇ І ІММОБІЛІЗОВАНОЇ ТИРОЗИНАЗИ ГРИБІВ *AGARICUS BISPORUS*

*За допомогою виділеної вільної і іммобілізованої тирозинази грибів *Agaricus bisporus* здійснено кількісне видалення фенолу з модельних розчинів, приготованих з використанням морської води. Показано, що отримані біокатализатори ефективно каталізують процес окиснення фенолу (0,5–10 ммоль/дм³) із збереженням 85% активності порівняно з такою для буферних розчинів, що містять фенол. Олігомерні продукти окиснення фенолу видаляли з використанням неорганічних коагулянтів зі зменшеною у 2,5 рази їх концентрацією при застосуванні іммобілізованого препарату тирозинази.*

Ключові слова: тирозиназа, фенол, морська вода, іммобілізація, неорганічні коагулянти.

Тирозиназа (КФ 1.14.18.1) — фермент класу оксидоредуктаз — на цей час використовується для розробки сучасних ферментативних технологій очищення стічних вод від високотоксичних фенольних сполук [9].

У зв'язку з можливістю забруднення фенольними поліюгантами не тільки прісних стоків, а й морського басейну [4], необхідним є вивчення можливості використання тирозинази для елімінування фенолу з морської води.

Тирозиназа грибів *Agaricus bisporus* є широко досліджуваним ферментом порівняно з ензимами різного походження завдяки високій активності і виходу на 1 г тканини грибів, а також відсутності сезонних обмежень для придбання вихідної сировини. Фермент складається з 4 попарно ідентичних субодиниць, містить два активних центри, в яких присутні два іони міді, що координовані з 6 молекулами гістидину; молекулярна маса становить ≈ 130 кДа. Тирозиназа каталізує окиснення широкого спектру фенолів і ароматичних амінів, з утворенням нетоксичних олігомерних продуктів [7].

© І.І. Романовська, Ю.А. Шестеренко, О.В. Севастьянов, 2012



Для забезпечення стабільності та можливості багаторазового використання тирозинази перспективним є її іммобілізація на полімерних носіях [6].

Метою даної роботи було дослідження видалення фенолу з морської води з використанням вільного і іммобілізованого препаратів тирозинази з грибів *Agaricus bisporus*.

Матеріали і методи дослідження

З грибів *Agaricus bisporus* виділяли частково очищений препарат тирозинази, використовуючи наведену методику: 1 кг грибів гомогенізували з 2 дм³ охолодженого екстрагенту (водного розчину, що містить 1% аскорбінової кислоти і 0,2% бензойної кислоти (рН 5,5)), перемішували протягом 1 год, після чого отриманий екстракт центрифугували при 10 000 g (10 хв).

Фермент осаджували шляхом насичення надосадової рідини сульфатом амонію до 80% і центрифугували в аналогічних умовах. Осад розчиняли в 15 см³ дистильованої води і додавали 5 г тонкого порошку полікапроаміду (М.м. 30 000), після чого суміш фільтрували, далі проводили діаліз. Процес виділення ферменту здійснювали при 0 °С. В отриманому препараті визначали вміст білку за методом Лоурі в модифікації Хартрі [8], фенолоксидазну активність за тирозином [9], вміст міді [11].

Спектроскопію препарату в УФ і видимій областях проводили в діапазоні $\lambda = 240\text{--}800$ нм, з використанням приладу Lambda-9(Perkin-Elmer).

Іммобілізацію виділеного препарату тирозинази виконували, додаючи розчин ферменту у 4% альгінаті натрію до 5% розчину хлориду кальцію [2].

Ступінь трансформації фенолу визначали спектрофотометрично 4-аміноантипіриновим методом [1].

Окиснення фенолу, що каталізується вільною і іммобілізованою тирозиназою, вивчали з використанням модельних розчинів фенолу (0,5–10,0 ммоль/дм³), які готували на відібраних пробах води Чорного моря, при температурі 25 °С, протягом 1 год.

Елімінацію продуктів ферментативного окиснення фенолу проводили за допомогою алюмокалієвих, алюмоамонійних і залізоамонійних галунів [2].

Ступінь видалення продуктів окиснення фенолу визначали спектрофотометрично за зниженням оптичної густини розчину при 510 нм [9].

Результати дослідження та їх обговорення

З грибів *Agaricus bisporus* виділений частково очищений препарат тирозинази з виходом білка 0,67 мг/г вологої маси грибів, вмістом міді 0,19% і питомою активністю 500 од/мг білка · хв (за тирозином). Запропоноване нами додавання полікапроаміду у процесі отримання ферменту



сприяло триразовому збільшенню фенолоксидазної активності [3]. Схема виділення ферменту представлена на рис. 1.

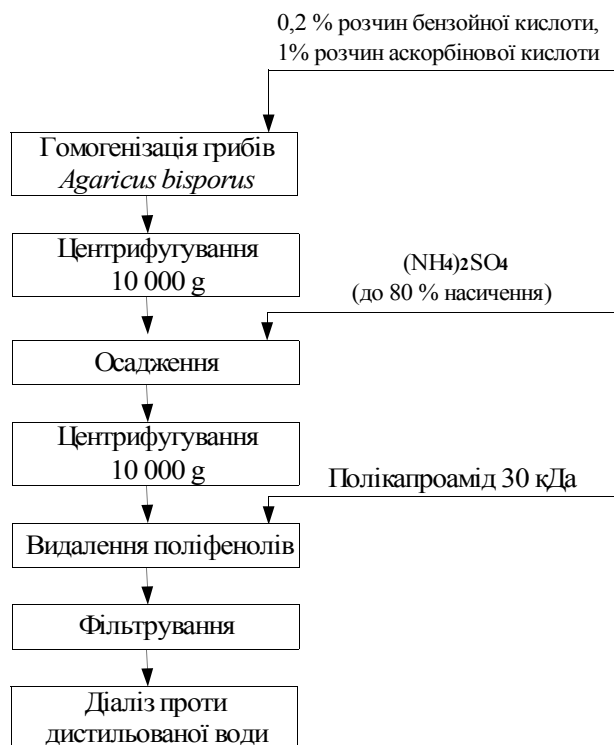


Рис. 1 Схема виділення частково очищеного препарату тирозинази грибів *Agaricus bisporus*

Fig. 1. Scheme of partially purified *Agaricus bisporus* tyrosinase preparation isolation

Оскільки відомо, що препарати тирозинази грибів можуть містити домішки інших оксидоредуктаз (лаккази, пероксидази) [10], методом спектроскопії в УФ і видимій областях було встановлено наявність максимуму поглинання при $\lambda = 280\text{--}281$ нм і широкого плеча при $\lambda = 320\text{--}360$ нм, що характерно для спектру тирозинази, і показано відсутність максимумів поглинання при $\lambda = 403$ і 600 нм, типових для пероксидази і лаккази, відповідно (рис. 2).

Дослідження окиснення розчинів фенолу ($0,5\text{--}10$ ммоль/дм³), приготованих на відібраних пробах морської води, за допомогою виділеного ферменту, показали 85% збереження активності порівняно з такою для буферних розчинів, що містять фенол. Зниження активності ферменту є наслідком підвищеної іонної сили морської води [5].

В результаті тирозиназного окиснення фенолу відмічене утворення розчинних у воді і нерозчинних у більшості органічних розчинників темнозabarвлених продуктів.

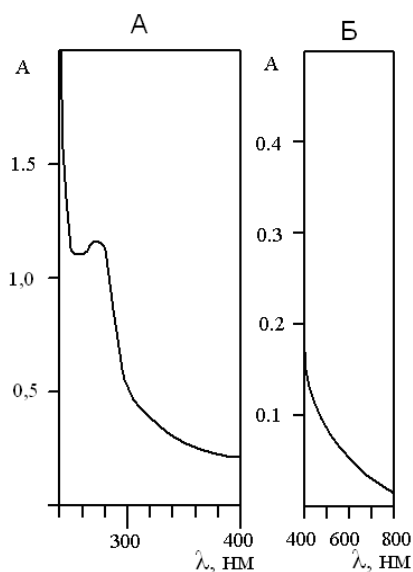


Рис. 2. Спектри поглинання виділеної тирозинази в УФ (А) і видимій областях (Б)

Fig. 2. Absorption spectra of isolated tyrosinase in UV (A) and visible (B) regions

Методом мас-спектрометрії (метод лазерної десорбції/часу іонізації в польоті) отримані дані про продукти окиснення фенолу з використанням тирозинази (рис. 3).

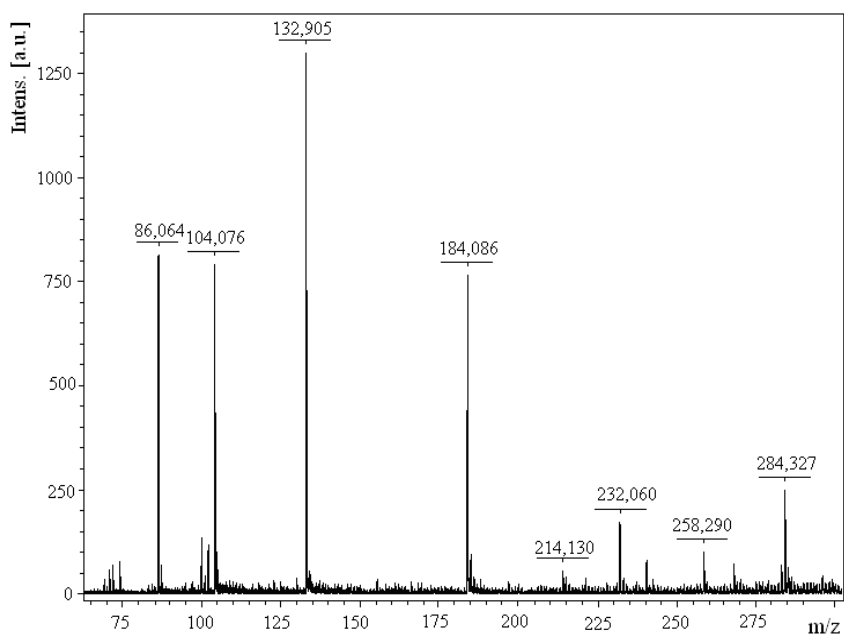


Рис. 3. Мас-спектр продуктів тирозиназного окиснення фенолу

Fig. 3. Mass-spectrum of tyrosinase-dependent phenol oxidation products

Показано, що молекулярна маса олігомерних продуктів, що утворюються, досягає 500 Да; ідентифікований один з продуктів (m/z 214,130) — дифенілендіоксид-2,3-хінон.

У результаті іммобілізації тирозинази в гель альгінату кальцію отримано біокатализатор у формі міцних сферичних гранул діаметром 2 мм, нерозчинних у воді та більшості органічних розчинників, з 50% збереженням вихідної активності ферменту. Іммобілізований препарат мав високу стабільність при підвищеній температурі і несприятливих значеннях рН [2].

Підвищена іонна сила і сольовий склад морської води не впливають на міцність гранул і не призводять до їх розчинення, однак, як і у випадку вільного ферменту, сприяють зниженню фенолоксидазної активності до 85% порівняно з активністю іммобілізованого біокатализатора у розчинах фенолу, приготованих на дистильованій воді. Тому для досягнення повної біоконверсії фенолу необхідно відповідне збільшення кількості іммобілізованого ферменту.

Показано, що отриманий біокатализатор ефективно каталізує процес окиснення фенолу ($0,5\text{--}10$ ммоль/дм³) протягом 12 циклів з кількісним ступенем біоконверсії, та зберігає високу активність ($\geq 50\%$) до 28-кратного використання (рис. 4).

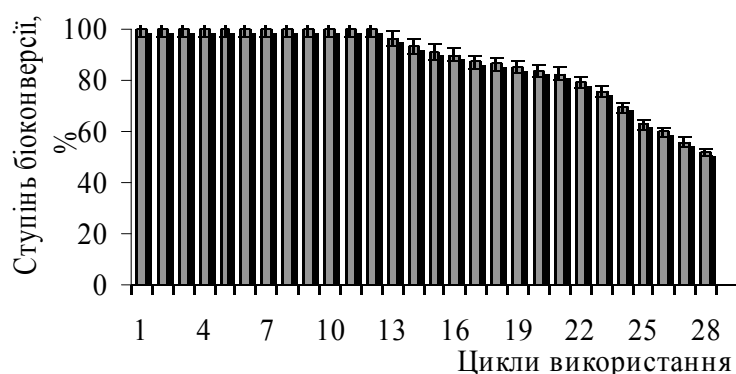


Рис. 4. Залежність ступеня трансформації фенолу в морській воді від кратності використання біокатализатора

Fig. 4. Dependence of phenol transformation degree in the sea water on biocatalyst usage multiplicity

Для видалення продуктів біоконверсії фенолу використовували неорганічні коагулянти (алюмокалієві, алюмоамонійні і залізоамонійні галуни).

Встановлено, що концентрації коагулянтів, які необхідні для видалення продуктів конверсії фенолу з використанням іммобілізованого ферменту, зменшуються у 2,5 рази порівняно з такими для вільного

біокаталізатору (рис. 5), що пов'язано з частковим накопиченням продуктів окиснення фенолу в гранулах іммобілізованого препарату, що підтверджено зниженням оптичної густини розчинів при $\lambda = 510$ нм [9] та забарвленню гранул.

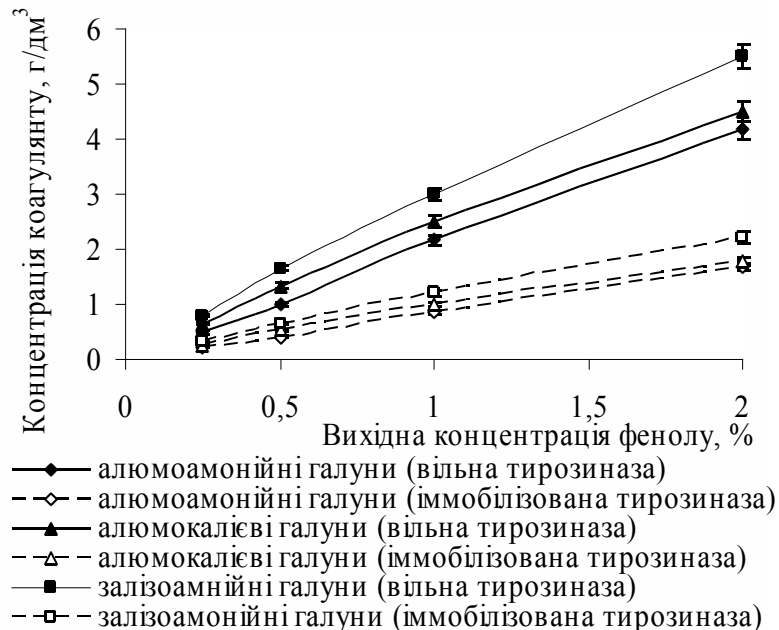


Рис. 5 Залежність концентрації коагулянту, що необхідна для кількісного видалення продуктів окиснення фенолу, отриманих з використанням вільної та іммобілізованої тирозинази, від вихідної концентрації фенолу

Fig. 5. Dependence of the coagulant concentration, necessary for quantitative removal of phenol oxidation products obtained by using free and immobilized tyrosinase, on the phenol initial concentration.

В результаті проведених досліджень розроблений метод елімінування фенолу з морської води шляхом його окиснення з використанням виділеного частково очищеного препарату тирозинази *Agaricus bisporus*. У результаті іммобілізації ферменту в альгінат кальцію отримано біокаталізатор, що ефективно каталізує процес окиснення фенолу (0,5–10 ммоль/дм³) протягом 12 циклів з кількісним ступенем біоконверсії, та зберігає високу активність ($\geq 50\%$) до 28-кратного використання. Видалення продуктів біоконверсії фенолу здійснювали з використанням неорганічних коагулянтів зі зменшеною у 2,5 рази їх концентрацією при застосуванні іммобілізованого препарату тирозинази.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Коренман И.М.* Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. — М.: Химия, 1975. — 368 с.
2. *Романовская И.И., Шестеренко Ю.А., Севастьянов О.В. и др.* Способ элиминации фенола с использованием тирозиназы *Agaricus bisporus*, иммобилизованной в альгинат // Химия и технология воды. — 2010. — Т. 32, № 1. — С. 107–115.
3. *Романовська І.І., Осійчук О.В., Шестеренко Ю.А., Севастьянов О.В.* Ферментативні методи елімінації фенольних поллютантів // Мікробіологія і біотехнологія. — 2008. — № 1(2). — С. 72–78.
4. *Сафранов Т.А., Савусин В.П., Чугай А.В.* Особенности загрязнения органическими экотоксикантами северо-западной части Черного моря // Научно-технический сборник: Коммунальное хозяйство городов. — 2003. — № 45. — С. 110–113.
5. *Duckworth H.W., Coleman J.E.* Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase // J. Biol. Chem. — 1970. — V. 245, № 7. — P. 1613–1625.
6. *Duran N., Rosa M.A., D'Annibale A. et al.* Application of laccase and tyrosinase (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review // Enzyme Microbial. Technol. — 2002. — V. 31. — P. 907–931.
7. *Halaoui S., Asther M., Sigoillot I.-C. et al.* Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological application // J. Appl. Microbiol. — 2006. — V. 100. — P. 219–232.
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. *Ikehata K., Nicell J.* Color and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols // Biotechnol. Prog. — 2000. — Vol. 16, № 4. — P. 533–540.
10. *Solomon E.I., Sundaram U.M., Machonkin T.E.* Multicopper oxidases and oxygenases // Chem. Rev. — 1996. — Vol. 96, № 6. — P. 2563–2605.
11. *Stark G.R., Dawson C.R.* Spectrophotometric microdetermination of copper in copper oxidases using oxalyldihydrazide // Anal. Chem. — 1958. — V. 30, № 2. — P. 191–194.

УДК 665.58.002.39 (088.8)

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

Физико-химический институт имени А.В. Богатского НАН Украины,
Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080, Украина,
тел.: +38 (048) 765 94 31, e-mail: romairina@gmail.com

УДАЛЕНИЕ ФЕНОЛА ИЗ МОРСКОЙ ВОДЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СВОБОДНОЙ И ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ТИРОЗИНАЗЫ ГРИБОВ *AGARICUS BISPORUS*

Реферат

С помощью выделенной свободной и иммобилизованной тирозиназы грибов *Agaricus bisporus* осуществлено количественное удаление фенола из модельных растворов, приготовленных с использованием морской воды. Показано, что полученные биокатализаторы эффективно катализируют процесс окисления фенола (0,5–10 ммоль/дм³) с сохранением 85% активности по сравнению с таковой для буферных растворов, содержащих фенол. Олигомерные продукты окисления фенола удаляли с использованием неорганических коагулянтов с уменьшенной в 2,5 раза их концентрацией при применении иммобилизованного препарата тирозиназы.

Ключевые слова: тирозиназа, фенол, морская вода, иммобилизация, неорганические коагулянты.

UDC 665.58.002.39 (088.8)

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

A.V. Bogatsky Physico-chemical Institute, NASU,
86, Lyustdorfska doroga, Odesa, 65080, Ukraine,
tel.: +38 (048) 765 94 31, e-mail: romairina@gmail.com

PHENOL REMOVAL FROM THE SEA WATER WITH USAGE OF FREE AND IMMOBILIZED *AGARICUS BISPORUS* MUSHROOMS TYROSINASE

Summary

With the help of isolated free and immobilized *Agaricus bisporus* mushrooms tyrosinase, the quantitative phenol removal from the model solutions, prepared using the sea water, was conducted. It was shown that obtained biocatalyst effectively catalyze the phenol oxidation process (0.5–10 mmol/dm³) with retaining of 85% activity, comparing with that for phenol-containing buffer solutions. The oligomeric products of phenol oxidation were removed using inorganic coagulants with 2.5-fold decreased their concentration in the case of immobilized tyrosinase application.

Key words: tyrosinase, phenol, the sea water, immobilization, inorganic coagulants.

Одержано 12.02.2011.

