

ОЧИСТКА СТОЧНЫХ ВОД ОТ ФЕНОЛОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ОКСИДОРЕДУКТАЗ РАСТЕНИЙ И ГРИБОВ*

**Б.Б. Тихонов, А.И. Сидоров, Н.В.Лакина,
Э.М. Сульман, Е.В. Ожимкова, О.В. Манаенков**

Тверской государственной технической университет, Тверь

Исследована кинетика ферментативного окисления фенола и его производных оксидоредуктазами (пероксидазой хрена и тирозиназой грибов), иммобилизованными на модифицированные биополимерами ионообменные смолы. Синтезированные биокатализаторы могут быть использованы в очистке сточных вод от фенольных соединений.

Ключевые слова: фенолы; сточные воды; окисление; оксидоредуктазы; пероксидаза; тирозиназа; *Armoracia rusticana*; *Agaricus campestris*; иммобилизация; ионообменные смолы; хитозан.

Введение. Фенолы – наиболее опасные экотоксиканты водных ресурсов. Они широко используются в промышленности для таких процессов, как очистка бензина, дубление кожи, производство пластмасс, бумаги, фенолформальдегидных смол, красок, лекарственных препаратов и антиоксидантов. Фенолы содержатся в сточных водах в растворенном состоянии в концентрациях до 10 ммоль/л [16], при этом предельно допустимые концентрации фенолов в природных водах варьируют в широком интервале 0,0005–0,05 мг/л [1; 3]. Практически все фенолы высокотоксичны, некоторые являются канцерогенами. При хлорировании фенолсодержащих вод образуются хлорфенолы, которые при окислении превращаются в диоксины – наиболее опасные контаминанты. Фенолы, сбрасываемые со сточными водами в водоемы, интенсивно поглощают при окислении растворенный в воде кислород, что отрицательно сказывается на жизнедеятельности живых организмов и растений водоемов. В связи с этим важно удалить экотоксиканты фенольного ряда из промышленных стоков перед попаданием в водоемы. Задача очистки сточных вод от органических поллютантов в настоящее время актуальна. Ни один из существующих методов не приводит к полной очистке воды от фенолов [11].

Перспективна оценка возможностей ферментативной обработки сточных вод, содержащих фенолы, оксидоредуктазами (КФ 1),

* Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России»

обладающими высокой субстратной специфичностью. Оксидоредуктазы способны перевести фенолы в менее опасные полимерные продукты, удаляемые из реакционной среды фильтрацией [11; 14]. Оксидоредуктазы представляют наиболее распространенные и стабильные ферменты. Эффективность пероксидазы и тирозиназы показана в реакциях окисления широкого спектра субстратов органической и неорганической природы как в модельных растворах, так и при очистке сточных вод [2; 4; 7; 9; 12; 18–20]. Важной проблемой, препятствующей широкому использованию этих ферментов в промышленности, является необходимость их стабилизации для предотвращения обратимой и необратимой инактивации активных центров. Самый распространенный из методов стабилизации – иммобилизация на твердый носитель. Она позволяет в десятки раз повысить эффективность применения ферментов за счет их многократного использования [15]. Исследователями доказана возможность иммобилизации оксидоредуктаз на носителях различной природы [5; 8].

Цель – создание эффективного биокатализатора для очистки сточных вод от фенолов на основе иммобилизованных оксидоредуктаз, выделенных из доступного и дешевого сырья, широко распространенного в Тверской обл. (корень хрена, шампиньоны).

Материал и методика. Источниками ферментативной активности были экстракты корня хрена (*Armoracia rusticana* Gaertn., Mey. et Scherb.) (E1) и шампиньона обыкновенного (*Agaricus campestris* L.) (E2). В качестве носителей (Н) использовали ионообменные смолы (Fluka): КУ 2-8 (К), Dowex 50WX8 (D1), Dowex 50WX2 (D2), Amberlite 200 (Am1), Amberlite IR-120 (Am2), Amberlite IRC-86 (Am3). Модификатором стал хитозан кислоторастворимый (М). В качестве активирующих агентов использовали глютаровый диальдегид (A1) (DC Panreas) и N-(3-диметил-аминопропил)-N-этилкарбодиимид гидрохлорид (A2) (Merck). Субстрами были фенол, пирокатехин, перекись водорода (50%-й раствор) и аскорбиновая кислота (Fluka). Использованы также сульфат аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Fluka), фосфатный буферный раствор (pH=6,5; Fluka)

Выделение пероксидазы. Свежие корни *Armoracia rusticana* очищали от коры, измельчали в шнековом дезинтеграторе. После чего предварительно рассчитанная навеска дезинтегрированного корня хрена экстрагировалась фосфатным буферным раствором (pH=6,5) в течение 1 часа при непрерывном перемешивании. Затем полученную смесь центрифугировали при 5000 об/мин, после чего центрифугат отфильтровали на микропористом фильтре. К полученному экстракту был добавлен 10%-й раствор сульфата аммония до степени насыщения 35–40% при 5°C, после чего экстракт оставили на 2 часа и добавили новую порцию 10% раствора сульфата аммония до степени насыщения

80–90%. Раствор центрифугировали при 5000 об/мин и отфильтровали на микропористом фильтре. Полученный экстракт содержит фермент пероксидазу [17].

Выделение тирозиназы. Измельчали плодовые тела *Agaricus campestris* в фарфоровой ступке с уксусом. Получившаяся однородная масса отфильтровывалась. Полученный после фильтрации осадок замораживался в течение 1 часа при -5°C , далее замороженная масса помещалась в коническую колбу, заливалась фосфатным буферным раствором ($\text{pH}=6,5$) и подвергалась перемешиванию в течение 15 мин. Полученная суспензия снова подвергалась фильтрации, и фильтрат хранился в холодильнике при -5°C . Полученный экстракт содержит фермент тирозиназу [13].

Синтез биокатализаторов. Разработана методика синтеза многослойных гетерогенных биокатализаторов. Активные компоненты (пероксидаза хрена или тирозиназа грибов) присоединяли к поверхности модифицированных нерастворимых органических носителей (ионообменные смолы) методом молекулярной сшивки полифункциональными реагентами. При этом использовали 2 общие схемы синтеза биокатализаторов:

1) с первичной активацией модификатора:



2) с первичной активацией фермента:



Иммобилизация ферментов проводилась в соответствии с выбранными схемами синтеза с промежуточной отмывкой дистиллированной водой от неспецифически связанных компонентов.

Методика кинетических экспериментов. Изучение активности и стабильности нативных и иммобилизованных оксидоредуктаз в реакциях окисления фенола и пирокатехина осуществлялось в термостатируемом реакторе периодического действия с возвратно-поступательным качанием. Для проведения кинетических экспериментов в каталитическом реакторе смешивались исходный растительный экстракт (или катализатор, приготовленный из того же количества экстракта), раствор фенола или пирокатехина необходимой концентрации, фосфатный буферный раствор ($\text{pH}=6,5$) и, в случае с E1, раствор перекиси водорода (10%-й избыток относительно фенола или пирокатехина) в соотношении 1:1:1:1 (об.), а при использовании E2 – экстракт, раствор пирокатехина и фосфатный буферный раствор ($\text{pH}=6,5$) в соотношении 1:1:2 (об.), окислитель – кислород воздуха.

Ход реакции контролировали по увеличению оптической плотности реакционной смеси ($\lambda=440$ нм), обусловленному образованием окрашенных продуктов реакции. Оценка кинетических параметров окисления проводилась 2 способами: по координатам

Лайнуивера-Берка [2] и хронометрическим методом [10].

Результаты и обсуждение

Оптимизация состава биокатализаторов. В результате иммобилизации ферментов по схемам синтеза (1) и (2) были получены биокатализаторы, схемы которых представлены на рисунке.

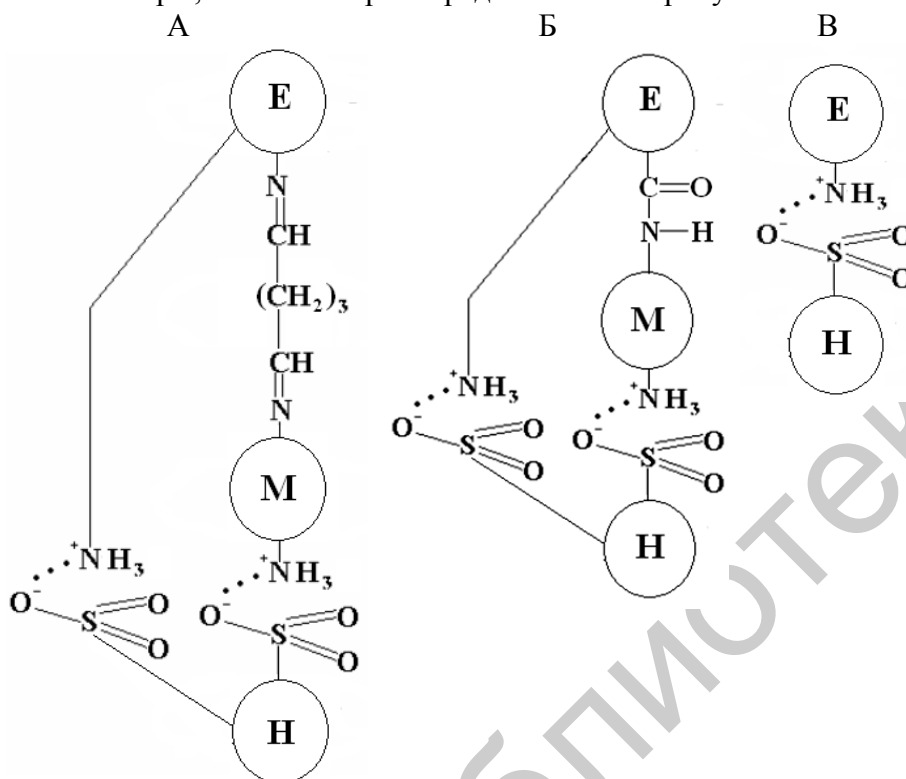


Рисунок. Схемы биокатализаторов:
А – Н-М-А1-Е; Б – Н-М-А2-Е; В – Н-Е

Для оптимизации состава биокатализаторы на основе ионообменных смол были испытаны в реакции окисления пирокатехина при постоянных исходных концентрациях пирокатехина, H_2O_2 , биокатализатора, определенной pH и температуре. Установлено, что биокатализаторы без использования модификаторов и активаторов нестабильны. Фермент диффундирует в раствор, поэтому для дальнейшего изучения биокатализаторы не использовались.

Наибольшую активность в реакции окисления фенолов имеют биокатализаторы, приготовленные с использованием 0,1%-го раствора и 25%-го раствора глутарового диальдегида и содержания фермента относительно носителя – 8 %мас. Биокатализаторы на основе карбодиимида проявили значительно меньшую активность по сравнению с биокатализаторами с глутаровым альдегидом.

Сравнение эффективности биокатализаторов. Использовались 8 различных видов ионообменных смол в качестве носителя, 2 сшивающих агента (глутаровый альдегид и N-(3-диметил-аминопропил)-N-этилкарбодиимид гидрохлорид) и 2 фермента (пероксидаза хрена и тирозиназа грибов). Активность биокатализаторов (A_6) исследовалась в реакции окисления пирокатехина ($C_0 = 10,64$ ммоль/л).

Таблица 1

Сравнение биокатализаторов различного состава

Носитель	Модификатор	Активатор	Фермент	A_6 , ед. ак
D1	M	A1	E1	0,19
			E2	0,24
		A2	E1	0,18
D2	M	A1	E1	0,37
			E2	0,26
		A2	E1	0,33
Am1	M	A1	E1	0,48
			E2	0,51
		A2	E1	0,46
Am2	M	A1	E1	0,18
			E2	0,23
		A2	E1	0,21
Am3	M	A1	E1	0,31
			E2	0,36
		A2	E1	0,25
K	M	A1	E1	0,66
			E2	0,56
		A2	E1	0,38

Результаты экспериментов приведены в табл. 1. Наиболее эффективными биокатализаторами являются K-M-A1-E1 и K-M-A1-E2 на основе катионита КУ 2-8.

Кинетические эксперименты. По результатам варьирования условий реакции окисления фенола и пирокатехина при начальной концентрации субстрата (C_0) 10,64 ммоль/л были определены оптимальные условия: температура -25°C , интенсивность перемешивания -300 мин^{-1} , и $\text{pH}=6,5$. При оптимальных условиях реакции были получены значения активности (A_6), константы Михаэлиса (K_M) и предельной скорости реакции (V_m) для наиболее эффективных биокатализаторов (на основе катионита КУ 2-8). Данные представлены в табл. 2.

Активность иммобилизованных биокатализаторов K-M-A1-E1 и K-M-A1-E2 ниже активности нативных E1 и E2 (она составляет для E1:

20,5% от активности E1 (по фенолу) и 11,3% (по пирокатехину); для E2 – 12% по пирокатехину).

Таблица 2

Кинетические параметры биокатализаторов

Кинетический параметр	Субстрат	Метод расчета*	Биокатализатор			
			E1	E2	K-M-A1-E1	K-M-A1-E2
V _m , ммоль/л·с	фенол	1	0,10	-	0,03	-
	фенол	2	0,05	-	0,04	-
	пирокатехин	1	0,25	0,10	0,04	0,04
	пирокатехин	2	0,07	-	0,02	-
K _M , ммоль/л	фенол	1	5,64	-	24,01	-
	фенол	2	2,12	-	8,84	-
	пирокатехин	1	10,21	15,47	40,12	105,47
	пирокатехин	2	4,20	-	16,39	-
A ₀ , ед. ак. (C ₀ =10,64 ммоль/л)	фенол	1	3,23	-	0,66	-
	фенол	2	2,95	-	0,60	-
	пирокатехин	1	4,95	3,15	0,56	0,38
	пирокатехин	2	3,34	-	0,38	-

Примечание. *1 – Лайнуивера-Берка, 2 – хронометрический

Снижение активности пероксидазы и тирозиназы после иммобилизации связано с гетерогенизацией реакции, а также с влиянием имеющихся свободных SO₃⁻ и NH₃⁺ групп модифицированного носителя на сродство фермента к субстрату. Однако результаты исследований показали, что операционная стабильность обеих систем высока. За 10 последовательных циклов теряется лишь около 15% активности (зарубежные аналоги теряют до 20% активности с каждым циклом [4; 5; 7]). Более высокую эффективность в наших экспериментах связана с тем, что использованный метод иммобилизации позволяет жестко стабилизировать полипептидные цепи пероксидазы и тирозиназы на поверхности носителя. В результате этого опасность необратимого инактивирования активных центров ферментов снижается до минимума. Высокая стабильность биокатализаторов и возможность их удаления из реакционной смеси простой фильтрацией значительно увеличивает каталитическую эффективность пероксидазы и тирозиназы по сравнению со свободными ферментами. Необходимо отметить, что синтезированные биокатализаторы эффективно работают в диапазоне концентраций фенолов до 10 ммоль/л, которая чаще всего встречается в водных объектах (в том числе и в сточных водах).

Заключение. В процессе работы были синтезированы многослойные гетерогенные биокатализаторы на основе пероксидазы хрена и тирозиназы грибов, иммобилизованных на модифицированные ионообменные смолы. Был оптимизирован компонентный состав данных биокатализаторов. Экспериментально установлено, что остаточная активность синтезированных биокатализаторов ниже нативных пероксидазы и тирозиназы. Для пероксидазы она составляет 20,5% (по фенолу) и 11,3% (по пирокатехину), а для тирозиназы – 12% (по пирокатехину). Однако биокатализаторы обладают высокой стабильностью в последовательных экспериментах, а гетерогенизация делает данную систему более эффективной. Полученные биокатализаторы могут быть использованы в процессе очистки сточных вод от фенольных экотоксикантов.

Список литературы

1. *Беспмятников Г.П., Кротов Ю.А.* Предельно допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде. Л.: Химия, 1985. 528 с.
2. *Варфоломеев С.Д.* Химическая энзимология. М.: Academia, 2005. 472 с.
3. *Вредные вещества в промышленности. Справочник для химиков, инженеров и врачей. Т. I: Органические вещества.* Л.: Химия, 1976. 592 с.
4. *Atlow S.T., Bonadonna-Aparo L., Klibanov A.M.* Dephenolization of industrial wastewater catalyzed by polyphenol oxidase // *Biotech. and Bioeng.* 1984. Vol. 26. P. 599–603.
5. *Bindhu L.V., Abraham T. E.* Immobilization of horseradish peroxidase on chitosan for use in nonaqueous media // *J. Appl. Polym. Sci.* 2003. Vol. 88. P. 1456–1464.
6. *Caza N., Bewtra J.K., Biswas N., Taylor K.E.* Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase // *Wat. Res.* 1999. Vol. 33. P. 3012–3018.
7. *Cooper V.A., Nicell J.A.* Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase // *Wat. Res.* 1996. Vol. 30, № 4. P. 954–964.
8. *Ensuncho L., Alvarez-Cuenca M., Legge R.L.* Removal of aqueous phenol using immobilized enzymes in a bench scale and pilot scale three-phase fluidized bed reactor // *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2005. Vol. 27. P. 185–191.
9. *Flock C., Bassi A., Gijzen M.* Removal of aqueous phenol and 2-chlorophenol with purified soybean peroxidase and raw soybean hulls // *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 1999. Vol. 74. P. 303–309.
10. *Goodwin D.C., Yamazaki I., Aust S.D., Grover T.A.* Determination of Rate Constants for Rapid Peroxidase // *Anal. Bioch. Reactions.* 1995. Vol. 231. P. 333–338.
11. *Karam J., Nicell A.* Potential applications of enzymes in waste treatment // *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 1997. Vol. 69. P. 141–153.
12. *Krastanov A.* Removal of phenols from mixtures by co-immobilized laccase/tyrosinase and Polyclar adsorption // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2000. Vol. 24. P. 383–388.

13. *Mayer A.M.* Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places. A review // *Phytochemistry*. 2006. Vol. 67, № 21. P. 2318–2331.
14. *Schmid A., Hauer B., Kiender A., Wubbolts M., Witholt B.* Industrial biocatalysis today and tomorrow // *Nature*. 2001. Vol. 409. P. 258–268.
15. *Tischer W., Wedekind F.* Immobilized enzymes: methods and applications // *Top. Curr. Chem*. 1999. Vol. 200. P. 95–126.
16. *Treatability Manual: U.S. EPA Treatability data. Vol. I. / U.S. Environmental Protection Agency. Washington DC, 1980. 990 p.*
17. *Veitch N.C.* Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme // *Phytochem*. 2004. Vol. 65, № 3. P. 249–259.
18. *Wada S., Ichikawa H., Tatsumi K.* Removal of phenols and aromatic amines from wastewater by a combination treatment with tyrosinase and a coagulant // *Biotechnol. Bioeng*. 1995. Vol. 45. P. 304–309.
19. *Wilberg K.Q., Nunes D.G., Rubio J.* Removal of phenol by enzymatic oxidation and flotation // *Braz. J. of Chem. Eng*. 2000. Vol. 17. P. 4–7.
20. *Wu J., Taylor K.E., Bewtra J.K., Biswas N.* Optimization of the reaction conditions for enzymatic removal of phenol from wastewater in the presence of polyethylene glycol // *Water Res*. 1993. Vol. 27, № 12. P. 1701–1706.

WASTE WATERS TREATMENT FROM PHENOLS WITH USE OF IMMOBILIZED OXIDOREDUCTASES OF PLANTS AND FUNGI

**B.B. Tikhonov, A.I. Sidorov, N.V. Lakina, E.M. Sulman,
E.V. Ozhimkova, O.V. Manaenkov**

Tver State Technical University, Tver

Present article is devoted to research into kinetics of enzymatic oxidation of phenol and its derivatives by oxidoreductases (horseradish peroxidase and mushroom tyrosinase) immobilized on modified by biopolymers ion-exchangers. The synthesized biocatalysts can be used for waste water treatment from phenolic pollution.

Keywords: *phenols; waste water; oxidation; oxidoreductases; peroxidase; tyrosinase; *Armoracia rusticana*; *Agaricus campestris*; immobilization; ion-exchangers; chitosan.*

Об авторах:

ТИХОНОВ Борис Борисович – кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии и химии, ГОУ ВПО «Тверской государственный технический университет, e-mail: tiboris@yandex.ru

СИДОРОВ Александр Иванович – кандидат химических наук, профессор (доцент) кафедры биотехнологии и химии, ГОУ ВПО

«Тверской государственный технический университет», e-mail: sulman@online.tver.ru

ЛАКИНА Наталья Валерьевна – кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии и химии, ГОУ ВПО «Тверской государственный технический университет», e-mail: sulman@online.tver.ru

СУЛЬМАН Эсфирь Михайловна – доктор химических наук, заведующая кафедрой биотехнологии и химии, профессор, ГОУ ВПО «Тверской государственный технический университет», e-mail: sulman@online.tver.ru

ОЖИМКОВА Елена Владимировна – кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии и химии, ГОУ ВПО «Тверской государственный технический университет», e-mail: sulman@online.tver.ru

МАНАЕНКОВ Олег Викторович – кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии и химии, ГОУ ВПО «Тверской государственный технический университет», e-mail: sulman@online.tver.ru