

УДК 577.15

DOI 10.26456/vtchem2024.4.10

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ДЛЯ ОЧИСТКИ СТОЧНЫХ ВОД ОТ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

А.Е. Филатова^{1,2}, О.В. Гребенникова¹, А.М. Сульман¹

¹ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», г. Тверь

² ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет», г. Тверь

В статье приведен обзор современных разработок в области каталитических систем на основе иммобилизованных ферментов растительного происхождения для очистки сточных вод от фенольных соединений. В настоящее время внимание специалистов привлекает группа стойких органических загрязнителей. К числу наиболее опасных загрязняющих воду веществ, наряду с ионами тяжёлых металлов, нефтепродуктами, поверхностно-активными веществами и полиароматическими соединениями, относятся фенол и его производные. При попадании в водный объект даже небольшого количества фенольных соединений происходит снижение самоочищающей способности водоема. В связи с этим в настоящее время актуальной проблемой является разработка ферментативных каталитических систем, позволяющих очистить сточные воды от фенола и его производных. В настоящее время коллективами ученых различных стран ведется поиск сорбционных материалов способных наиболее эффективно извлекать соединения фенолов из воды.

Ключевые слова: микрокристаллическая целлюлоза, ферменты, тирозиназа, пироксидаза.

Одним из наиболее эффективных путей очистки сточных вод от фенольных загрязнений является применение иммобилизованных ферментов окислительно-восстановительной группы на кристаллической микроцеллюлозе. Данный метод очистки позволяет снизить затраты на очистку сточных вод на предприятиях и сократить вред, наносимый планете. При этом стоит отметить, что продукты получаемые в процессе очистки не будут загрязнять окружающую среду.

В настоящее время наиболее изученными являются процессы с использованием иммобилизованных пероксидаз на различных носителях. Пероксидазы относятся к группе ферментов оксидоредуктаз которые катализируют реакции окисления различных видов органических и неорганических веществ. Пероксидазы получают из корней хрена промышленными методами [1, 2]. Пероксидазы широко

применяются для различных клинических биохимических исследований и используются в большом количестве иммуноферментных анализов в качестве каталитического компонента [3, 4]. Пероксидазы являются предпочтительными для экологических и промышленных применений, таких как удаление фенольных соединений из сточных вод, промышленный синтез некоторых ароматических соединений и извлечение пероксида из пищевых продуктов и промышленных отходов. Для этой цели были синтезированы поли криогели с использованием метода криополимеризации при отрицательных температурах и ковалентно функционализированы ферментом пероксидазой. Было установлено, что максимальная концентрация пероксидазы в поли криогеле составляет 127,30 мг/г криогеля. Наряду с тестами на стабильность были также исследованы кинетические параметры свободных и иммобилизованных пероксидаз. Наконец, была изучена эффективность удаления фенольных соединений из иммобилизованного пероксидазой поли криогеля по сравнению с модельными фенольными соединениями, такими как фенол, бисфенол А, гваякол, пирогаллол и катехол; и была зафиксирована очень высокая эффективность удаления фенольных соединений [5]. Авторами работы [6 (2)] был предложен новый, практичный и недорогой метод иммобилизации грибной тирозиназы, который будет использоваться для ферментативной очистки фенольных сточных вод. Катализируемые ферментом, иммобилизованным в виде шитых ферментных агрегатов, фенольные соединения, такие как фенол, п-крезол происходила в течение 0,5-3 ч, что превосходит другие процессы, катализируемые тем же ферментом, который является либо свободным, либо иммобилизованным с помощью традиционных методов иммобилизации, связанных с носителем. В работе [6] было изучено влияние времени реакции, pH, дозы фермента и начальной концентрации раствора фенола. Последовательность изменения скорости дефенолизации (п-крезол > п-хлорфенол > фенол) соответствовала селективности фермента по отношению к субстрату. Возможность повторного использования была проверена в реакторе периодического действия для каждого фенола.

Авторами работы [7] был иммобилизован фермент тирозиназа в гранулированном активированном угле (GAC) и гранулах активированного хитозана (ACBs), и двух недорогих подложках. Оказалось, возможным иммобилизовать до 70% ферментов в GAC при концентрации носителя 20 г/л, скорости перемешивания 15,7 рад/с, времени контакта 120 мин и до 100% ферментов в ACBs при тех же условиях. В тестах на ферментативное окисление тирозиназа, иммобилизованная в GAC (T-GAC), смогла достичь конечной концентрации фенола ниже предела 0,5 мг/л для растворов с начальной концентрацией 10 мг/л, в то время как фермент, иммобилизованный в

ACBs (Т-ACBs), смог снизить начальную концентрацию фенола 40 мг/л ниже предельного значения. Т-GAC показал одинаковую эффективность удаления фенол при использовании в двух повторных циклах, в то время как Т-ACBs сохранял эффективность до 98% после пяти циклов ферментативного окисления растворов с концентрацией фенола 10 мг/л. Такой же эффективности удаления фенола удалось достичь при хранении иммобилизованных ферментов в течение 2 недель. Такие результаты свидетельствуют о том, что оба материала эффективны для удаления фенола из проб воды, особенно Т-ACBS, что представляет собой многообещающую альтернативу для смягчения воздействия этого соединения на промышленные сточные воды. [7]

В работе [8] ферментативное удаление различных фенольных соединений из искусственных сточных вод осуществлялось путем комбинированного использования грибной тирозиназы и гранулами хитозана в зависимости от значения рН, температуры, дозы тирозиназы и соотношения перекиси водорода к субстрату. Полученные результаты указывают на то, что удаление фенольных соединений вызвано их окислением, катализируемым тирозиназой, до соответствующих производных хинона и последующей химической адсорбцией на пленке хитозана. Было определено, что оптимальными условиями для адсорбции хинона являются рН 7 и 45 °С для п-крезола. Некоторые алкилзамещенные фенольные соединения были удалены адсорбцией производных хинона, ферментативно полученных на гранулах хитозана, и процент удаления п-крезола, 4-этилфенола, 4-н-пропилфенола, 4-н-бутилфенола и п-хлорфенола вырос до 93%. Кроме того, 4-трет-бутилфенол подвергся окислению, катализируемому тирозиназой, в присутствии перекиси водорода. Эта процедура была применима для удаления хлорфенолов и алкилзамещенных фенолов. В работе [9] 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. В работе [10] была исследована тирозиназа была успешно иммобилизованная на гранулах на основе полиакрилотриила (ПАН) глутаровым альдегидом и в дальнейшем использовалась для значительного разложения фенола.

Было обнаружено, что оптимальные условия разложения, включая влияние pH и температуры, составляют 7,0 и 40 °C соответственно. Было доказано, что по сравнению со свободным ферментом тирозиназа-ПАН повышает стабильность при хранении и может сохранять активность более чем на 50% от исходного состояния после хранения в течение 40 дней. Кроме того, эксперименты по возможности повторного использования показали, что иммобилизованные гранулы можно использовать до шести циклов без серьезного снижения их относительной активности, что может обеспечить экономическое преимущество для крупномасштабных биотехнологических применений. Результаты анализа ССК-8 и анализа апоптоза подтвердили, что фенол токсичен для клеток и что продукт разложения фенола при обработке ферментами обладает низкой токсичностью. Согласно этим анализам, концентрацию обрабатываемого фенола следует поддерживать на уровне менее 0,5 мм, чтобы убедиться, что он не подавляет пролиферацию клеток. В заключение, это исследование вносит вклад в объяснение цитотоксичности фенола, а также предлагает потенциальные решения для эффективной, непрерывной и безопасной очистки фенольных сточных вод. Коллективом ученых [11] было проведено исследование извлечения фенола из сточных вод сорбентами на основе древесных отходов. На основании полученных результатов в исследовании авторы установили, что древесные отходы являются хорошим сырьем для композита, позволяющего эффективно извлекать фенол из «надсмольной воды». Таким образом, исследования, проведенные ранее позволяют сделать вывод, что иммобилизация таких ферментов как пероксидаза и тирозиназа в кристаллической микроцеллюлозе позволит эффективно извлекать фенолы и фенольные производные из сточных вод.

Список литературы

1. Kim Y. H., Yoo J. Y. Peroxidase production from carrot hairy root cell culture// *Enzyme and Microbial Technology* 1996. 18. P. 531–535.
2. Yamada Y., Kobayashi S., Watanabe K., Hayashi U., Yajima Y., Inoue H. Production of horse radish peroxidase by plant cell culture// *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 1987. 38. P. 31–39.
3. Vámos-Vigyazo, L. Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables// *CRC Critical Review of Food Science and Nutrition*. Boca Raton: CRC press 1981. p. 84–127.
4. Lin Z. F., Chen L. H., Zhang W. Q. Peroxidase from *Ipomoea cairica* (L) SW. Isolation, purification and some properties// *Process Biochemistry* 1996. 31. P. 443–448.
5. Akpınar, F., Evli, S., Güven, G., Bayraktaroğlu, M., Kilimci, U., Uygun, M., & Aktaş Uygun, D. Peroxidase Immobilized Cryogels for Phenolic Compounds Removal// *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2020. 190. P.138-147

6. Xu, D.-Y., Yang, Z. Cross-linked tyrosinase aggregates for elimination of phenolic compounds from wastewater// *Chemosphere* 2013. V.92. p. 391-398.
7. Ana Carina Cruz de Mello, Felipe Pereira da Silva, Everton Gripa, Andrea Medeiros Salgado, Fabiana Valéria da Fonseca Phenol Removal from Wastewater Using Tyrosinase Enzyme Immobilized in Granular Activated Carbon and Activated Chitosan Beads// *Water* 2023. 15(21). 3778.
8. Yamada K., Akiba Y., Shibuya T., Kashiwada A., Matsuda K., Hirata M. Water Purification through Bioconversion of Phenol Compounds by Tyrosinase and Chemical Adsorption by Chitosan Beads// *Biotechnology Progress* 2008. 21(3). P. 823–829.
9. Сидоров А.И., Лакина Н.В., Сульман Э.М., Ожимкова Е.В., Манаенков О.В., Тихонов Б.Б. Очистка сточных вод от фенолов с использованием иммобилизованных оксидоредуктаз растений и грибов // Тверь: ТвГУ, 2011. Вып. 21(№2).
10. Wu Q., Xu Z., Duan Y., Zhu Y., Ou M., Xu X. Immobilization of tyrosinase on polyacrylonitrile beads: biodegradation of phenol from aqueous solution and the relevant cytotoxicity assessment// *RSC Advances* 2017. 7(45). P. 28114– 28123.
11. И.Н. Липунов, А.Ф. Никифоров, И.Г. Первова, Н.О. Толмачева Извлечение фенола из сточных вод сорбентами на основе древесных отходов// *Водное хозяйство России* 2018. №6. с. 101-110.

Об авторах:

ФИЛАТОВА Анастасия Евгеньевна – кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, г. Тверь, наб. А. Никитина, 22); доцент кафедры биохимии и биотехнологии, ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет» (170100, г. Тверь, ул. Желябова, 33); e-mail: afilatowa@mail.ru

ГРЕБЕННИКОВА Ольга Валентиновна – кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, г. Тверь, наб. Афанасия Никитина, 22); e-mail: olechkamatveeva@mail.ru

СУЛЬМАН Александрина Михайловна – кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, г. Тверь, наб. Афанасия Никитина, 22); e-mail: alexsulman@mail.ru

**IMMOBILIZED ENZYMES OF PLANT ORIGIN FOR PURIFICATION
OF WASTEWATER FROM PHENOLIC COMPOUNDS**

A.E. Filatova^{1,2}, O.V. Grebennikova¹, A.M. Sulman¹

¹*Tver State Technical University, Tver*

²*Tver State University, Tver*

The article provides an overview of modern developments in the field of catalytic systems based on immobilized enzymes of plant origin for wastewater treatment from phenolic compounds. Currently, the attention of specialists is attracted by a group of persistent organic pollutants. The most dangerous water pollutants, along with heavy metal ions, oil products, surfactants and polyaromatic compounds, include phenol and its derivatives. When even a small amount of phenolic compounds enters a water body, the self-purification capacity of the reservoir decreases. In this regard, the development of enzymatic catalytic systems that can purify wastewater from phenol and its derivatives is currently a pressing issue. Currently, teams of scientists from different countries are searching for sorption materials that can most effectively extract phenol compounds from water.

Keywords: *microcrystalline cellulose, enzymes, tyrosinase, pyroxidase*

Дата поступления в редакцию: 04.11.2024.

Дата принятия в печать: 08.11.2024.