

## УДАЛЕНИЕ ФЕНОЛОВ ИЗ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА ПОЛИМЕРНЫХ НОСИТЕЛЯХ ТИРОЗИНАЗЫ И НЕОРГАНИЧЕСКИХ КОАГУЛЯНТОВ

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

Физико-химический институт им. А.В. Богатского  
НАН Украины, г. Одесса

Поступила 28.10.2011 г.

*Разработаны способы удаления фенольных соединений (0,5 – 10 ммоль/дм<sup>3</sup>) из водных растворов и селективного разделения их смесей, основанные на окислении фенолов с помощью иммобилизованной на полимерных носителях тирозиназы, выделенной из *Agaricus bisporus*, и извлечения продуктов биоконверсии неорганическими коагулянтами.*

**Ключевые слова:** иммобилизация, неорганические коагулянты, окисление фенола, полимерные носители.

**Введение.** Несмотря на множество существующих методов очистки сточных вод от фенольных соединений, данную проблему нельзя считать решенной. Подходы, применяемые для ее решения, сопряжены с большими экономическими затратами, образованием токсических продуктов, утилизацией отходов.

Многообразие химического состава сточных вод требует проведения индивидуальных исследований для каждого конкретного случая. К тому же технология глубокой очистки воды, как правило, предполагает соблюдение особых условий, трудновыполнимых на практике. Таким образом, поиск новых эффективных способов очистки промышленных сточных вод от фенольных соединений в настоящее время является достаточно актуальным.

В связи с этим значительный интерес представляют методы удаления фенолов с помощью окислительно-восстановительных ферментов вследствие высокой степени очистки, образования нетоксических продуктов, возможности применения в широком интервале рН, температур и концентраций поллютантов [1,2].

Перспективным ферментом для дефенолизации сточных вод является тирозиназа (КФ 1.14.18.1), катализирующая окисление фенольных соединений с образованием *o*-хинонов, претерпевающих в дальнейшем олиго-

© Ю.А. ШЕСТЕРЕНКО, О.В. СЕВАСТЬЯНОВ, И.И. РОМАНОВСКАЯ, 2012

меризацию с получением нетоксических растворимых окрашенных продуктов [3] и последующим их удалением с помощью связующих агентов.

Однако использование фермента ограничено высокой стоимостью коммерческих препаратов, однократностью его применения и нестабильностью. Поэтому разработка перспективных способов иммобилизации частично очищенных препаратов тирозиназы является важной практической задачей.

Существующие способы закрепления тирозиназы на различных носителях, несмотря на их эффективность, обладают рядом существенных недостатков: в большинстве случаев отмечена значительная потеря фенолоксидазной активности; при иммобилизации использовали токсические агенты; кратность применения биокатализаторов зачастую была неудовлетворительной [4].

Цель данной работы – разработка способов элиминирования фенольных поллютантов с использованием иммобилизованной на полимерных носителях выделенной тирозиназы грибов *Agaricus bisporus* и неорганических коагулянтов.

**Методика эксперимента.** В работе использовали частично очищенный препарат тирозиназы грибов *Agaricus bisporus*, выделенный согласно модифицированному нами методу [5]. В полученном препарате определяли содержание белка по методу Лоури в модификации Хартри [6], содержание меди [7], фенолоксидазную активность – по тирозину [2].

Масс-спектрометрические исследования были выполнены на приборе Autoflex II ("Bruker", Германия) в центре коллективного пользования прибором MALDI-TOF Института химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины. Применяли методику лазерной десорбции/ионизации (LDI). Образец, растворенный в метаноле, наносили на стандартную стальную мишень и высушивали при комнатной температуре. Полученный масс-спектр является суммой отдельных 100 спектров. Спектры получены в режиме рефлектрона.

Иммобилизацию тирозиназы в альгинат кальция осуществляли, добавляя 4%-ный раствор альгината натрия, содержащий фермент, к 5%-ному раствору хлорида кальция [8].

Модификацию поли-N-винилпирролидона (ПВП) проводили добавлением лимонной кислоты (38 мг) и 0,63 см<sup>3</sup> триэтиленгликоля к 3,5 см<sup>3</sup> 7%-ного раствора ПВП. После перемешивания вводили 0,5 см<sup>3</sup> 25%-ного раствора аммиака и 1,45 см<sup>3</sup> золя поликремниевой кислоты. Включение тирозиназы осуществляли путем прибавления раствора фермента к раствору носителя [9].

Иммобилизацию тирозиназы в поли-N-винилкапролактам (ПВК) проводили внесением 7%-ного раствора ПВК, содержащего фермент, в раствор стабилизатора гранулообразования (фенольного соединения) при 40°C [10].

Влияние модификаторов и тирозиназы на вискозиметрические характеристики растворов полимеров исследовали с помощью вискозиметра Оствальда (диаметр капилляра – 0,73 мм) [8 – 10].

Определяли pH-оптимум реакции окисления фенола, используя равные по активности пробы свободного и иммобилизованных препаратов тирозиназы, а также буферные растворы с различными значениями pH [8 – 10].

Термостабильность иммобилизованного фермента изучали при 50°C с последующим определением фенолоксидазной активности [8 – 10].

Концентрации фенольных соединений находили спектрофотометрически [11].

Окисление фенола (0,5 – 10 ммоль/дм<sup>3</sup>), катализируемое иммобилизованной тирозиназой (50 – 1000 ед/см<sup>3</sup>), изучали в реакторе периодического действия при 25°C. Выбранные концентрации фенола соответствовали таковым в сточных водах промышленных предприятий.

Элиминирование продуктов биоконверсии фенола проводили с помощью алюмокалиевых, алюмоаммонийных и железоаммонийных квасцов [8, 12].

**Результаты и их обсуждение.** Из грибов *Agaricus bisporus* выделен частично очищенный препарат тирозиназы с выходом по белку 0,67 мг/г влажной массы грибов, содержанием ионов меди 0,19%, удельной активностью 500 ед./мг белка в одну минуту [5].

В результате окисления фенола, катализируемого свободной тирозиназой, происходит образование растворимых в воде продуктов. При помощи метода масс-спектрометрии получены данные о продуктах конверсии фенола. На рис. 1 показано, что молекулярная масса образующихся олигомеров достигает 505,7 Да.

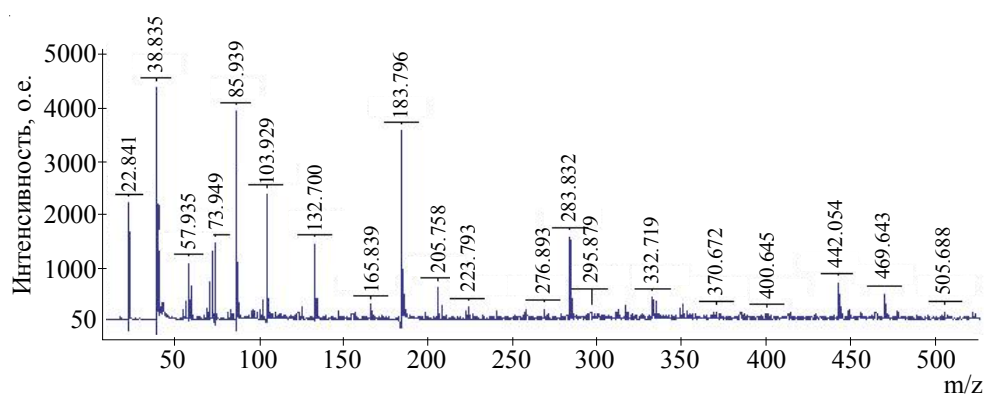


Рис. 1. Масс-спектр продуктов тирозиназного окисления фенола.

Для элиминирования фенолов из водных растворов предложены новые способы, основанные на окислении фенольных соединений с помощью разработанных стабильных иммобилизованных препаратов тирозиназы многократного использования и удалении продуктов биоконверсии с применением доступных неорганических коагулянтов.

Закрепление тирозиназы осуществляли методом иммобилизации в гель, который позволял включить значительное количество фермента и, в наименьшей степени, нарушить лабильную четвертичную структуру белка [13]. В качестве носителей выбраны полимеры природного и синтетического происхождения: альгинат кальция; поли-N-винилпирролидон, модифицированный золем поликремниевой кислоты; поли-N-винилкапролактан.

Взаимодействие фермента с макромолекулами носителей подтверждено изменением значений характеристической вязкости растворов полимеров и полимеров с ферментом (табл. 1). Заметное увеличение вязкости растворов при добавлении фермента к альгинату объясняется наличием ионных взаимодействий [14], тогда как в случае ПВП [15] и ПВК [16] возможно образование водородных связей с носителем. Не исключено физическое включение тирозиназы в структуру модифицированных полимеров.

Таблица 1. Влияние компонентов системы на характеристическую вязкость ( $\nu$ ) растворов полимера

Компоненты системы	$\nu \cdot 10^2, \text{ см}^3/\text{г}$
Альгинат	$34,7 \pm 1,4$
Альгинат и тирозиназа	$8,3 \pm 0,3$
ПВК	$0,88 \pm 0,03$
ПВК и тирозиназа	$0,80 \pm 0,02$
ПВП	$2,31 \pm 0,08$
ПВП и тирозиназа	$2,53 \pm 0,08$

На основе выделенной тирозиназы, иммобилизованной в альгинат кальция, разработан биокатализатор окисления фенола с 50%-ным сохранением исходной активности. Заметное снижение фенолоксидазной активности, вероятно, обусловлено высокой ионной силой носителя [17].

Преимуществом данного метода является высокая кратность использования биокатализатора. Иммобилизованный фермент катализировал окисление фенола в реакторе периодического действия с количествен-

ной степенью биоконверсии в течение 12 циклов и высоким сохранением уровня трансформации субстрата (более 50%) в последующие 16 циклов, что обусловлено многоточечным ионным связыванием фермента с матрицей и прочностью гранул альгината, препятствующих вымыванию фермента из матрицы. Кроме того, концентрации коагулянтов, необходимые для удаления продуктов конверсии фенола, снижаются в 2,5 раза по сравнению с таковыми для свободного фермента, что связано с частичным накоплением продуктов окисления фенола в гранулах биокатализатора [8].

Путем иммобилизации тирозиназы в поли-N-винилпирролидон, модифицированный золев поликремниевой кислоты, получен биокатализатор окисления фенола, обладающий более высоким сохранением фенолоксидазной активности (80%) по сравнению с таковой тирозиназы, иммобилизованной в альгинате кальция, что дает возможность использовать меньшее количество фермента для окисления фенола.

Достоинством данного метода также является наибольшая среди разработанных способов термостабильность иммобилизованной тирозиназы, что позволяет осуществлять удаление фенола в более широком диапазоне температур. Константа термоинактивации фермента ( $K_i$ ), иммобилизованного в модифицированный ПВП, в 3,8 раз ниже для свободной тирозиназы и в 1,7 раза – иммобилизованной в альгинате (табл. 2). Это свидетельствует о стабилизации тирозиназы в условиях высоких температур вследствие снижения конформационной подвижности глобулы белка носителем.

Таблица 2. Константы термоинактивации ( $K_i$ ) свободного и иммобилизованных препаратов тирозиназы

Фермент	$K_i \cdot 10^{-2}, \text{мин}^{-1}$
Свободная тирозиназа	1,87±0,06
Иммобилизованная в альгинате	0,84±0,03
Иммобилизованная в модифицированном ПВП	0,49±0,02
Иммобилизованная в ПВК	0,58±0,02

Установлено, что полная конверсия фенола в присутствии иммобилизованной тирозиназы наблюдается в течение 8 циклов использования в периодическом режиме, высокая – в течение последующих 7 циклов. Продукты биоконверсии фенола не адсорбируются в матрице, следовательно, для их удаления необходимы концентрации коагулянтов, равные таковым для свободного фермента [9].

Тирозиназа обладает высокой специфичностью в отношении окисления ряда производных фенола и пирокатехина, тогда как производные резорцина, гидрохинона, нитрофенолы не окисляются в ее присутствии. На основании данного свойства нами разработан способ разделения смесей фенолов в водных растворах путем ферментативного окисления одного из них и удаления продуктов окисления с помощью неорганических коагулянтов при сохранении в растворе неокисляющихся фенольных соединений. Так, при разделении смеси пирокатехин – резорцин с помощью фермента осуществляется окисление пирокатехина и удаление продуктов его конверсии алюмокалиевыми квасцами; в растворе остается резорцин в исходной концентрации [10].

В результате иммобилизации тирозиназы в поли-N-винилкапролактамах получен эффективный биокатализатор окисления фенола. Особенностью иммобилизованного фермента явилось наибольшее для разработанных препаратов расширение рН-профиля активности фермента в область кислых и щелочных значений в результате более благоприятного микроокружения фермента в матрице (рис. 2), что позволило эффективно осуществлять элиминирование фенола в более широком диапазоне значений рН.

Известно, что фенолы, не являющиеся субстратами тирозиназы, оказывают на фермент ингибирующее действие [18]. Установлено, что включение фермента в ПВК частично защищает тирозиназу от ингибирования производными гидрохинона, резорцина и нитрофенолами. Это приводит к значительному уменьшению количества энзима (в 2 – 3 раза по сравнению со свободным ферментом), необходимого для окисления субстратов тирозиназы (рис. 3.).

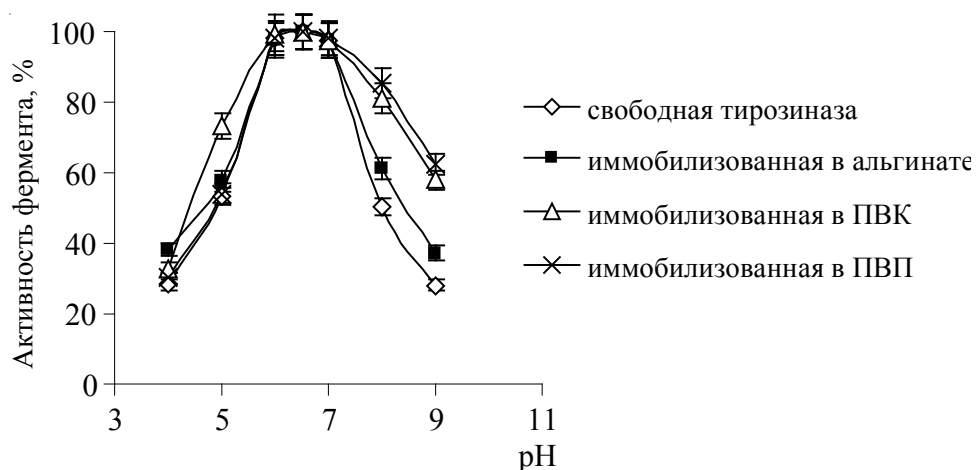


Рис. 2. Зависимость активности свободного и иммобилизованных препаратов тирозиназы от рН инкубационной среды.

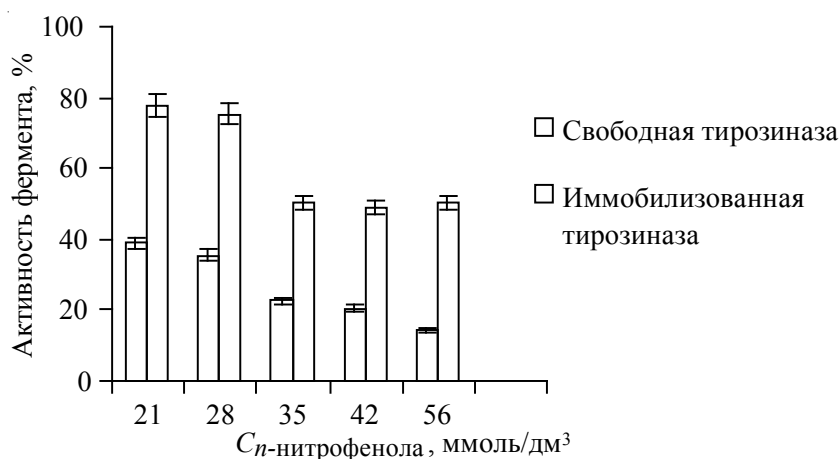


Рис. 3. Влияние концентрации *p*-нитрофенола на сохранение активности свободной и иммобилизованной тирозиназы.

Иммобилизованный препарат катализировал окисление фенола и пирокатехина ( $0,5 - 10$  ммоль/дм<sup>3</sup>) с количественной степенью биоконверсии в присутствии резорцина, гидрохинона или *p*-нитрофенола ( $35 - 56$  ммоль/дм<sup>3</sup>) в течение четырех циклов в реакторе периодического действия. Продукты окисления удаляли с помощью алюмокалиевых квасцов в концентрациях, равных таковым для свободного фермента [10].

**Выводы.** Таким образом, разработаны способы удаления фенольных соединений ( $0,5 - 10$  ммоль/дм<sup>3</sup>) из водных растворов и селективного разделения их смесей, основанные на окислении фенолов с помощью иммобилизованной на полимерных носителях тирозиназы, выделенной из *Agaricus bisporus*, и элиминирования продуктов биоконверсии неорганическими коагулянтами.

**Резюме.** Розроблено способи видалення фенольних сполук ( $0,5 - 10$  ммоль/дм<sup>3</sup>) з водних розчинів і селективного розділення їх сумішей, основані на окисненні фенолів за допомогою іммобілізованої на полімерних носіях тирозинази, виділеної з *Agaricus bisporus*, і елімінування продуктів біоконверсії неорганічними коагулянтами

*Yu. A. Shesterenko, O.V. Sevastyanov, I.I. Romanovskaya*

### PHENOLS REMOVAL FROM AQUEOUS SOLUTIONS USING TYROSINASE, IMMOBILIZED ON POLYMERIC SUPPORTS AND INORGANIC COAGULANTS

#### Summary

Methods of phenolic compounds removal ( $0,5 - 10$  mmol/dm<sup>3</sup>) from aqueous solutions and selective separation of their mixtures, based on phenol oxidation

with a help of isolated and immobilized on polymeric supports *Agaricus bisporus* tyrosinase and elimination of bioconversion products by inorganic coagulants were developed.

#### Список литературы

- [1] *Bevilaqua J., Cammarota M., Freire D. et al.* // Brazil. J. Chem. Eng. – 2002. – **19**, N 2. – P. 151 – 158.
- [2] *Ikehata K., Nicell J.* // Biotechnol. Prog. – 2000. – **16**, N 4. – P. 533 – 540.
- [3] *Halaouli S., Aster M., Sigoillot I.-C. et al.* // J. Appl. Microbiol. – 2006. – **100**. – P. 219 – 232.
- [4] *Duran N., Rosa M.A., D'Annibale A. et al.* // Enzyme Microbial. Technol. – 2002. – **31**. – P. 907 – 931.
- [5] *Романовська І.І., Шестеренко Ю.А., Севастьянов О.В. та ін.* // Мед. хімія. – 2008. – **10**, № 2. – С. 79 – 82.
- [6] *Hartree E.F.* // Anal. Biochem. – 1972. – **48**, N 1. – P. 422 – 427.
- [7] *Stark G.R., Dawson C.R.* // Anal. Chem. – 1958. – **30**, N 2. – P. 191 – 194.
- [8] *Романовская И.И., Шестеренко Ю.А., Севастьянов О.В. и др.* // Химия и технология воды. – 2010. – **32**, № 1. – С.107 – 115.
- [9] *Романовська І.І., Шестеренко Ю.А., Севастьянов О.В.* // Досягнення біології і медицини. – 2010. – **16**, №2. – С. 19 – 22.
- [10] *Романовська І.І., Шестеренко Ю.А., Севастьянов О.В.* // Вісн. Одес. нац. ун-ту ім. І.І. Мечникова, Сер. Хімія. – 2009. – **14**, №4. – С. 95 – 101.
- [11] *Коренман И.М.* Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. – М.: Химия, 1975. – 368 с.
- [12] *Романовская И.И., Шестеренко Ю.А., Севастьянов О.В.* // Химия и технология воды. – 2009. – **31**, №2. – С.235 – 240.
- [13] *Березин И.В., Клячко Н.Л., Левашев А.В. и др.* Биотехнология. Имобилизованные ферменты: В 8-т. – М.: Высш. шк., 1987. – Т.7. – 162 с.
- [14] *Усов А.И.* // Успехи химии. – 1999. – **68**, N 11. – С. 1051 – 1052.
- [15] *Кириш Ю.Э.* Поли-*N*-винилпирролидон и другие поли-*N*-виниламиды: Синтез и физико-химические свойства. – М.: Наука, 1998. – 252 с.
- [16] *Романовская И.И., Давиденко Т.И., Декина С.С. и др.* // Журн. орган. фармацевт. химии – 2009. – **7**, №3. – С. 69 – 78.
- [17] *Duckworth H.W., Coleman J.E.* // J. Biol. Chem. – 1970. – **245**, N 7. – P. 1613 – 1625.
- [18] *Xue C.B., Luo W.C., Ding Q. et al.* // J. Computer-aided Molecular Design. – 2008. – **22**, N 5. – P. 299 – 309.