

УДК 665.58.002.39 (088.8)

О. В. Севастьянов

Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины,
Люстдорфская дор., 86, Одесса, 65080, Украина

ИССЛЕДОВАНИЕ УДАЛЕНИЯ АНИЛИНА И ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ПУТЕМ СООКИСЛЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ ТИРОЗИНАЗЫ *AGARICUS BISPORUS*

Исследовано совместное окисление анилина и фенольных соединений в водных растворах с использованием выделенной тирозиназы грибов *Agaricus bisporus*. Показано, что количественная биоконверсия анилина достигается путем прибавления к его раствору (0,25 ммоль/дм³) фенола и других быстро окисляемых фенольных соединений (*n*-хлорфенол, *o*-, *m*-крезолы). Продукты соокисления анилина и фенолов – хинонимины и хиноны, удаляли с помощью алюмокалиевых квасцов.

Ключевые слова: тирозиназа *Agaricus bisporus*, анилин, фенолы, соокисление, алюмокалиевые квасцы.

Анилин и фенольные соединения, содержащиеся в сточных водах нефтеперерабатывающей, коксохимической, металлургической, текстильной, фармацевтической промышленности, являются высокотоксичными загрязнителями окружающей среды [1].

К недостаткам используемых методов их удаления относятся высокая энергоёмкость многих из них (например, экстракционных либо испарительных), нерешенность вопросов регенерации сорбентов для сорбционных методов, использование агрессивных соединений (хлор, озон, пероксид водорода) в высоких концентрациях, значительный расход реагентов (экстракционные методы) [2].

Использование ферментативных методов перспективно для более эффективного удаления фенольных поллютантов, благодаря образованию нетоксичных продуктов окисления, возможности проведения процесса в широких интервалах pH, температур и концентраций субстратов [3, 4].

В ряде работ показана возможность использования окислительно-восстановительных ферментов (пероксидазы хрена и тирозиназы грибов) в свободной и иммобилизованной формах для полного удаления широкого ряда фенольных соединений из водных растворов и сточных вод [5-7].

Целью исследования является разработка способа удаления анилина и фенольных соединений путем их соокисления с помощью выделенной тирозиназы грибов *Agaricus bisporus* с последующим элиминированием продуктов биоконверсии алюмокалиевыми квасцами.

Экспериментальная часть.

В работе использовали частично очищенный препарат тирозиназы грибов *Agaricus bisporus*, выделенный согласно модифицированному методу [8]. В полученном препарате определяли содержание белка по методу Лоури-Хартри [9], содержание меди согласно [10], фенолоксидазную активность по тирозину [11].

Степень трансформации фенолов определяли по их убыли 4-аминоантипиринным методом, анилина – методом азосочетания с использованием реактива Браттон-Маршалла [12].

Соокисление субстратов тирозиназы исследовали, прибавляя к водным растворам анилина (0,25 ммоль/дм³) растворы фенолов (0,1-0,25 ммоль/дм³) в разработанных условиях (натрий-фосфатный буферный раствор, 0,05 моль/дм³, рН 6,5, 25°C, 3 ч).

Для удаления продуктов ферментативного окисления фенола (0,5 ммоль/дм³), смеси фенолов (0,25 ммоль/дм³) и анилина (0,25 ммоль/дм³), прибавляли алюмокалиевые квасцы в концентрации 0,1-1,2 г/дм³.

Степень удаления продуктов окисления определяли спектрофотометрически по снижению оптической плотности при 510 нм [13].

Результаты и их обсуждение

Модификация метода выделения тирозиназы из грибов *Agaricus bisporus*, заключающаяся в добавлении поликапроамида (М.м. 30000), связывающего продукты окисления эндогенных полифенолов – ингибиторов тирозиназы – позволила увеличить фенолоксидазную активность препарата в три раза [8]. В результате был получен частично очищенный препарат энзима, свойства которого представлены в таблице.

Таблица

Характеристики тирозиназы, выделенной из грибов *Agaricus bisporus*

Свойства фермента	Показатели
Активность по тирозину, ед/мг · мин	500
Содержание ионов меди, %	0,19
рН-оптимум	6,5
Термооптимум, °С	40
Срок хранения, мес	6

Методами SDS- и нативного электрофореза в 15 % ПААГ установлен белково-фракционный состав выделенного препарата тирозиназы, основными являются фракции с молекулярными массами $12 \pm 1,0$ и $41-48 \pm 4,5$ кДа, показано, что 92,5 % общего белка полученного препарата обладают выраженной фенолоксидазной активностью [13].

Известно, что анилин является субстратом тирозиназы и трансформируется путем *o*-гидроксилирования и дальнейшего окисления образовавшегося аминифенола до хинонимина [14]. Однако при окислении анилина (0,25 ммоль/дм³) с использованием полученного фермента в концентрациях 50-200 ед/см³ за 3 ч, полного окисления субстрата достичь не удалось (рис. 1).

Данные, представленные в литературе, свидетельствуют о том, что добавление к раствору ароматических аминов более быстро окисляемого фенола способствует значительному увеличению степени их трансформации.

Известно, что окисление анилина, катализируемое тирозиназой, характеризуется наличием длительного лаг-периода, обусловленного тем, что в условиях *in*

in vivo большая часть энзима существует в мет-форме (85 %), неспособной связывать молекулярный кислород. Эта форма не катализирует окисление ароматических аминов, однако обладает высоким сродством, связывая их без протекания реакции. Присутствие в растворе более быстро окисляемого фенола способствует быстрому переходу мет-тирозины в окси-форму, катализирующую окисление анилина, приводя к уменьшению лаг-периода и биоконверсии амина. Достижение полной трансформации анилина может быть также обусловлено связыванием ароматического амина с реакционноспособными продуктами окисления фенола – *o*-хинонами [5].

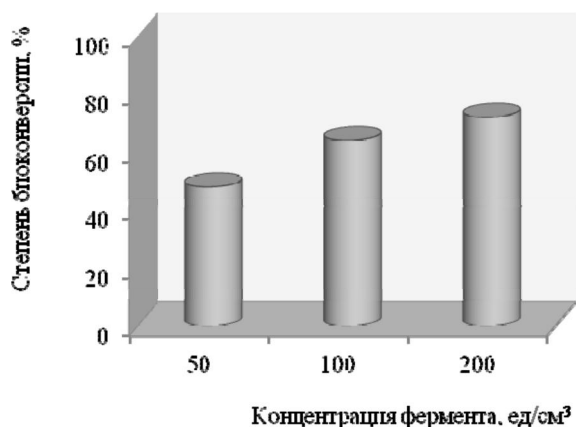


Рис. 1. Зависимость степени трансформации анилина от концентрации фермента

Нами показано, что количественной биоконверсии анилина возможно достичь путем прибавления к его раствору (0,25 ммоль/дм³) не только фенола, но и других быстроокисляемых фенольных соединений (*n*-хлорфенол, *o*-, *m*-крезолы). В диапазоне исследуемых концентраций фенольных субстратов тирозиназы степень биоконверсии анилина достигала 39,7 – 99,7 %, при этом полное окисление анилина наблюдалось при использовании фенольных соединений в концентрации 0,25 ммоль/дм³ (рис. 2) с количественным окислением последних.

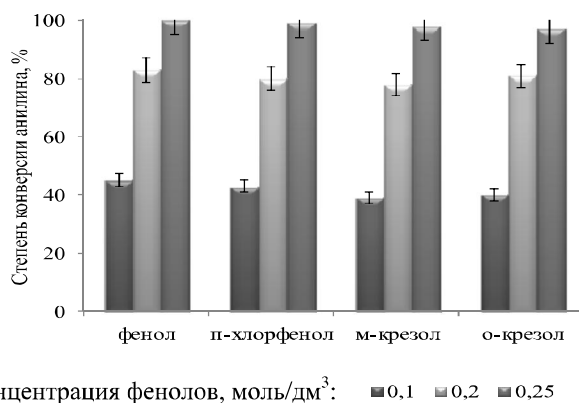


Рис. 2. Зависимость степени конверсии анилина от концентрации фенольных соединений

Ранее нами было установлено, что для удаления растворимых окрашенных продуктов окисления фенола, катализируемого тирозиназой, перспективно использование алюмоаммонийных, алюмокалиевых и железоаммонийных квасцов, доступных коагулянтов, широко применяемых для очистки сточных вод [16].

Для элиминирования продуктов соокисления анилина и фенольных соединений, катализируемого выделенным препаратом тирозиназы, были использованы алюмокалиевые квасцы. При исследуемом значении pH раствора (6,5) железоаммонийные квасцы гидролизуются с образованием гидроксида железа $\text{Fe}(\text{OH})_3$, тогда как полный гидролиз алюмокалиевых и алюмоаммонийных квасцов наблюдается при более высоких значениях pH (7,2-7,6), а в изучаемых нами растворах они частично находятся в состоянии аквагидроксикомплексов – $[\text{Al}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_4]^+$ [13]. Продукты биоконверсии анилина и фенолов – хинонимины и хиноны, имеющие в своей структуре карбонильные группы, несущие частично отрицательный заряд, хемосорбируются на поверхности положительно заряженных полиядерных аквагидроксикомплексов алюминия, что объясняет предпочтительное использование алюминиевых коагулянтов. Также нельзя исключить их сорбцию на поверхности частиц гидроксидов металлов.

Полное удаление продуктов соокисления анилина (0,25 ммоль/дм³) и фенола (0,25 ммоль/дм³) наблюдалось при добавлении 0,45 г/дм³ коагулянта, тогда как для удаления продуктов окисления фенола (0,5 ммоль/дм³) необходимо 1,0 г/дм³ коагулянта (рис. 3).

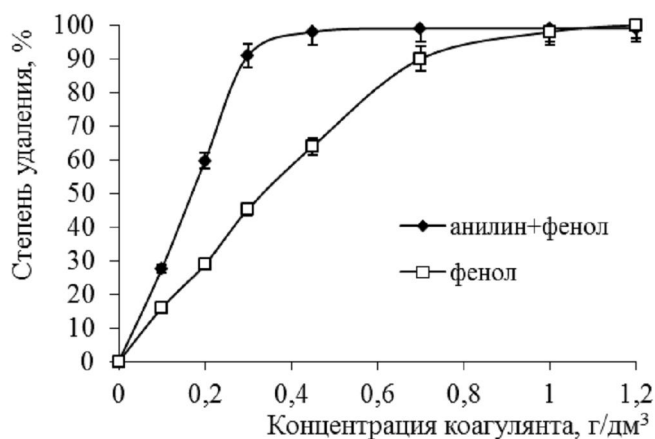


Рис. 3. Зависимость степени удаления продуктов окисления фенола и смеси фенола и анилина от концентрации коагулянта

Уменьшение концентрации коагулянта может быть связано с меньшей растворимостью продуктов биоконверсии анилина, которые частично осаждаются.

Для удаления продуктов соокисления анилина с другими фенольными соединениями необходимо использовать близкие значения концентраций коагулянта (рис. 4).

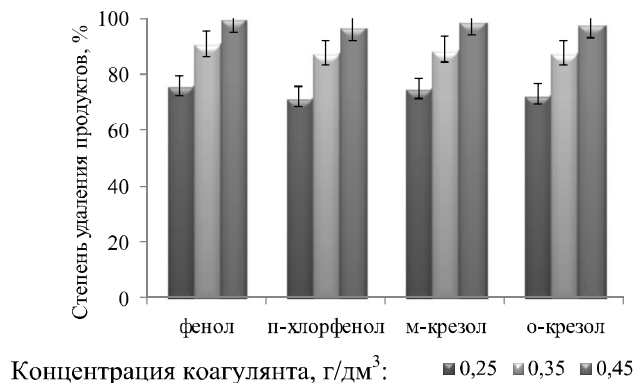


Рис. 4. Зависимость степени удаления продуктов соокисления анилина и фенольных соединений от концентрации коагулянта

Таким образом, показано количественное удаление анилина путем его соокисления с фенольными соединениями (фенол, *n*-хлорфенол, *m*-крезол, *o*-крезол) с помощью выделенного частично очищенного препарата тирозиназы грибов *Agaricus bisporus* с последующим элиминированием продуктов биоконверсии алломокалевыми квасцами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Juang R.S., Kao H.S., Tseng K.J. Kinetics of phenol removal from saline solutions by solvent extraction coupled with degradation in a two-phase partitioning bioreactor // Separation and purification technology . – 2010. – Vol.71, № 3. – P. 285-292.
2. Давиденко Т.И., Романовская И.И., Осейчук О.В. и др. Структура и образование комплексов включения фенолов в поли-N-винилкапролактан // Доповіді НАН України, 2005.-№ 9.-С.145-150.
3. Kameda E., Langone M.A., Coelho M.A. Tyrosinase extract from *Agaricus bisporus* mushroom and its in natura tissue for specific phenol removal // Environmental Technol. – 2006. – Vol.27, № 11. – P. 1209-1215.
4. El-Shora H.M., Metwally M. Use of tyrosinase enzyme from *Bacillus thuringiensis* for the decontamination of water polluted with phenols // Biotechnology. – 2008. – Vol.7, № 2. – P. 305-310.
5. Wada S., Ichikawa H., Tastsumi K. Removal of phenols and aromatic amines from wastewater by a combination treatment with tyrosinase and a coagulant// Biotechnol. Bioeng. – 1995. – Vol.45, № 4. – P. 304 – 309.
6. Романовська І.І., Осейчук О.В., Шестеренко Ю.А., Севастьянов О.В. Ферментативні методи елімінації фенольних полютантів // Мікробіологія і біотехнологія. – 2008. – № 1(2). – С. 72-78.
7. Bevilacqua J., Cammarota M., Freire D. et al. Phenol removal through combined biological and enzymatic treatments // Brazil. J. Chem. Eng. – 2002. – Vol.19, № 2. – P. 151 – 158.
8. Романовська І.І., Шестеренко Ю.А., Севастьянов О.В. та ін. Дослідження складу частково очищеного препарату тирозинази з грибів *Agaricus bisporus* // Медична хімія. – 2008. – Vol.10, № 2. – С. 79-82.
9. Hartree E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // Anal. Biochem. – 1972. – Vol.48, № 2. – P. 422 – 427.
10. Stark G.R., Dawson C.R Spectrophotometric microdetermination of copper in copper oxidases using oxalyldihydrazide // Analytical Chemistry. – 1958. – Vol.30, № 2. – P. 191-194.
11. Ikehata K., Nicell J. Toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols // Biotechnol. Prog. – 2000. – Vol.16, № 4. – P. 533 – 540.
12. Коренман И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. – М.: Химия, 1975. – 368 с.
13. Romanovska I.I., Shesterenko Yu.A., Sevastyanov O.V. et al. Phenol removal by tyrosinase, immobilized in modified poly-N-vinylpyrrolidone, with inorganic coagulants application // Int. Rev. Biophys. Chem. – 2011. – Vol.2, № 2. – P. 54 – 60.

14. *Ismaya W.T., Rozeboom J., Weijn A. et al.* Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone // *Biochemistry*. – 2011. – Vol. 50, № 24. – P. 5477-5486.
15. *Muñoz-Muñoz J.L., Garcia-Molina F., Garcia-Ruiz P.A. et al.* Phenolic substrates and suicide inactivation of tyrosinase: kinetics and mechanism // *Biochem. J.* – 2008. – Vol. 416, №3. – P. 431-440.
16. *Романовская И. И., Шестеренко Ю.А., Севастьянов О.В.* Элиминация фенола с использованием тирозиназы грибов // *Химия и технология воды*. – 2009. – Vol. 31, № 2. – С.235 – 240.

Стаття надійшла до редакції 10.09.12

О. В. Севастьянов

Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України,
Люстдорфська дор., 86, Одеса, 65080, Україна.

ДОСЛІДЖЕННЯ ВИДАЛЕННЯ АНІЛІНУ І ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК ШЛЯХОМ СООКИСНЕННЯ ЗА ДОПОМОГОЮ ТИРОЗИНАЗИ *AGARICUS BISPORUS*

Резюме

Досліджено сумісне окиснення аніліну і фенольних сполук у водних розчинах з використанням виділеної тирозинази грибів *Agaricus bisporus*. Показано, що кількісна біоконверсія аніліну досягається шляхом додавання до його розчину (0,25 ммоль/дм³) фенолу та інших швидкоокиснюваних фенольних сполук (*n*-хлорфенол, *o*-, *m*-крезоли). Продукти соокиснення аніліну і фенолів – хіноніміни і хінони, видаляли за допомогою алюмокалієвих галунів.

Ключові слова: тирозиназа *Agaricus bisporus*, анілін, фенольні сполуки, соокиснення, алюмокалієві галуни.

O. V. Sevastyanov

A.V. Bogatsky's Physico-Chemical Institute, NAS of Ukraine,
Lyustdorfskaya dor. 86, Odessa, 65080, Ukraine.

INVESTIGATION OF ANILINE AND PHENOLIC COMPOUNDS REMOVAL BY COOXIDATION USING *AGARICUS BISPORUS* TYROSINASE

Summary

An investigation of joint oxidation of aniline and phenolic compounds in aqueous solutions using the isolated tyrosinase from *Agaricus bisporus* mushrooms was conducted. It is shown, that quantitative bioconversion of aniline is achieved by addition of phenol and other rapidly oxidized phenolic compounds (*p*-chlorophenol, *o*-, *m*-cresols) to its solution (0,25 mmol/dm³). Products of aniline and phenols oxidation – quinoneimines and quinones, were removed with a help of aluminium-potassium alums.

Keywords: tyrosinase *Agaricus bisporus*, aniline, phenolic compounds, cooxidation, aluminium-potassium alums.