

УДК 665.58.002.39 (088.8)

**И. И. Романовская, Ю. А. Шестеренко, О. В. Севастьянов**  
Физико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины,  
Люстдорфская дор., 86, Одесса, 65080, Украина

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТИРОЗИНАЗЫ ГРИБОВ *AGARICUS BISPORUS* ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ СМЕСЕЙ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Разработан новый способ разделения смесей фенольных соединений в растворах путем окисления одного из компонентов смеси с использованием иммобилизованной в ПВК частично очищенной тирозиназы и дальнейшим удалением продуктов окисления с помощью алюмокалиевых квасцов. Полученный биокатализатор осуществлял окисление фенола или пирокатехина ( $0,5\text{--}10$  ммоль/дм<sup>3</sup>) с количественной степенью био конверсии в присутствии не окисляющихся резорцина или гидрохинона, либо *n*-нитрофенола с сохранением в растворе их исходных концентраций ( $35\text{--}56$  ммоль/дм<sup>3</sup>) на протяжении 4-х циклов в реакторе периодического действия.

Ключевые слова: тирозиназа, *Agaricus bisporus*, разделение смесей, фенольные соединения, иммобилизация

Тирозиназа грибов *Agaricus bisporus* — фермент класса оксидоредуктаз, катализирующий окисление фенольных субстратов и ароматических аминов в присутствии молекулярного кислорода [1].

Известно, что тирозиназа обладает высокой специфичностью в отношении катализа окисления ряда производных фенола и пирокатехина, тогда как производные резорцина, гидрохинона, а также нитрофенолы не подвергаются окислительной трансформации [2], поэтому использование тирозиназы может стать альтернативой традиционным методам удаления фенолов из водных растворов, содержащих нефенольные соединения [3], а также разделения смесей фенольных соединений.

Однако применение фермента ограничено высокой стоимостью коммерческих препаратов, однократностью применения, а также нестабильностью, поэтому целесообразно получение частично очищенных иммобилизованных препаратов тирозиназы.

В процессе окисления фенолов, катализируемого тирозиназой, образуются растворимые темно-окрашенные олигомерные продукты, для удаления которых используют дорогостоящие полимеры природного и синтетического происхождения, однако их применение в ряде случаев не дает полного удаления продуктов реакции [4, 5].

Поэтому целью данного исследования была разработка нового способа разделения смесей фенольных соединений путем окисления одного из компонентов в присутствии иммобилизованной тирозиназы с последующим удалением продуктов окисления неорганическими коагулянтами, для получения растворов не окисляющихся фенольных соединений.

## Методика эксперимента

В работе использовали частично очищенный препарат тирозиназы из грибов *Agaricus bisporus*, выделенный согласно модифицированному нами методу Коэна [6]. В полученном препарате определяли содержание белка по методу Лоури в модификации Хартри [7], содержание меди [8], активность по тирозину [4].

Иммобилизацию тирозиназы осуществляли, прибавляя 7 %-ный раствор поли-N-винилкапролактама (ПВК), содержащий фермент (500 ед/г носителя), к раствору резорцина, гидрохинона или *n*-нитрофенола (в концентрациях 35–56 ммоль/дм<sup>3</sup>) — стабилизаторов гранулообразования, при *t* 40 °С. Иммобилизованный фермент в форме гранул помещали в раствор, содержащий смесь фенольных соединений, для их разделения.

Влияние фенолов и тирозиназы на вискозиметрические характеристики растворов ПВК определяли, измеряя вязкость водных растворов полимера в диапазоне концентраций 0,05–0,15 %, и вязкость растворов ПВК при добавлении соответствующего количества фенольного соединения и фермента с помощью вискозиметра Оствальда (диаметр капилляра 0,73 мм).

Характеристическую вязкость определяли, используя график зависимости приведенной вязкости раствора полимера от его концентрации по отрезку, отсекаемому экстраполированной прямой на оси ординат [9].

pH-Оптimum реакции окисления фенола определяли, используя равные по активности пробы свободной и иммобилизованной тирозиназы, и буферные растворы с различными значениями pH (4–10).

Температурный optimum изучали в интервале 2–70 °С при pH 6,5 и концентрации субстрата 0,5 ммоль/дм<sup>3</sup>.

Определение термостабильности ферментного препарата проводили, инкубируя равные по активности пробы свободной и иммобилизованной тирозиназы в соответствующем буферном растворе при температуре 50 °С в течение 90 мин, с последующим определением фенолоксидазной активности. Константы термоинактивации находили по тангенсу угла наклона прямой графика зависимости натурального логарифма величин остаточной активности препаратов тирозиназы от времени методом линейной регрессии.

Разделение смесей фенола, пирокатехина (0,5–10 ммоль/дм<sup>3</sup>) и резорцина, гидрохинона или *n*-нитрофенола (35–56 ммоль/дм<sup>3</sup>), осуществляли с использованием иммобилизованной тирозиназы в реакторе периодического действия при pH 6,5, температуре 25 °С в течение 30 мин.

Концентрации фенольных соединений определяли спектрофотометрически [10].

Удаление продуктов ферментативного окисления фенола и пирокатехина проводили с помощью алюмокалиевых квасцов (2,2–29,5 ммоль/дм<sup>3</sup>). Степень удаления продуктов окисления определяли спектрофотометрически по снижению оптической плотности растворов при 510 нм [4].

## Результаты и их обсуждение

С помощью модифицированного нами метода Е. Коэна из грибов *Agaricus bisporus* выделен частично очищенный препарат тирозиназы, с выходом по

белку 0,67 мг/г грибов, содержанием ионов меди 0,19 %, удельной активностью 500 ед/мг·мин.

Основанием для изучения иммобилизации тирозиназы в поли-N-винилкапролактаме послужили работы о связывании ПВК в ходе термоосаждения различных БАВ (белки, ферменты, аллергены) с помощью фенолов как стабилизаторов гранулообразования [11].

Взаимодействие тирозиназы и ПВК подтверждено изменениями характеристической вязкости растворов (табл. 1) и может быть обусловлено как механическим включением фермента в сетку полимера, так и возможным образованием водородной связи между карбонильной группой капролактама и гидроксильными группами белка [12].

Таблица 1

Влияние тирозиназы и *n*-нитрофенола на характеристическую вязкость полимера

Образец	Характеристическая вязкость, см <sup>3</sup> /г
ПВК	0,884
ПВК + тирозиназа	0,808
ПВК + тирозиназа + <i>n</i> -нитрофенол	0,422

Для оптимизации условий применения иммобилизованных препаратов тирозиназы были изучены их физико-химические свойства. Выявлено, что рН-оптимум иммобилизованного фермента не отличается от такового для свободного биокатализатора и составляет 6,5, однако показано расширение рН-профиля активности тирозиназы в область кислых и щелочных значений, что свидетельствует о создании более благоприятного рН-микроокружения фермента в процессе иммобилизации.

При изучении зависимости активности тирозиназы от температуры выявлено, что термооптимум свободной и иммобилизованных форм тирозиназы составляет 40 °С (рис. 1).

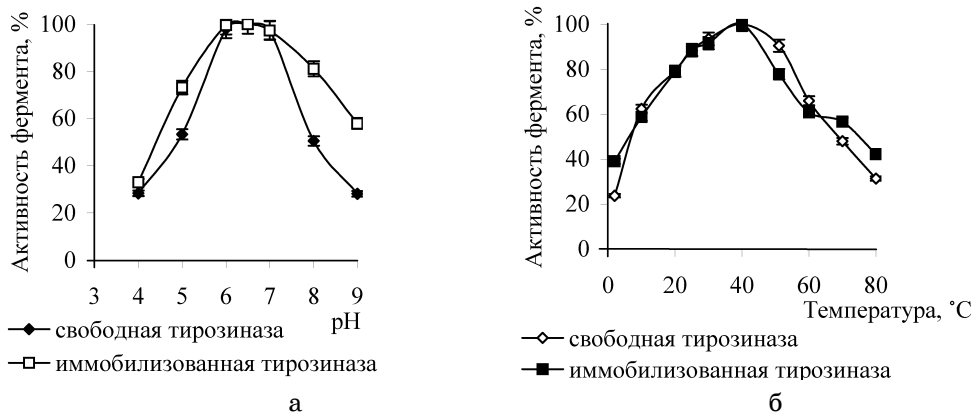


Рис. 1 Зависимость активности свободной и иммобилизованной тирозиназы от рН (а) и температуры (б) инкубационной среды (С фенола 0,5 ммоль/дм<sup>3</sup>, *t* 40 °С,  $\tau$  инкубации 30 мин)

Изучение термостабильности иммобилизованной тирозиназы свидетельствует о стабилизации фермента в условиях высокой температуры, на что указывает уменьшение константы термоинактивации для иммобилизованной формы ( $k_{ин}$  составили  $1,87 \cdot 10^{-2}$  и  $0,58 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$ , соответственно).

Высокая специфичность биокатализа позволяет разделять смеси окисляющихся и не окисляющихся в присутствии тирозиназы фенольных соединений (рис. 2).

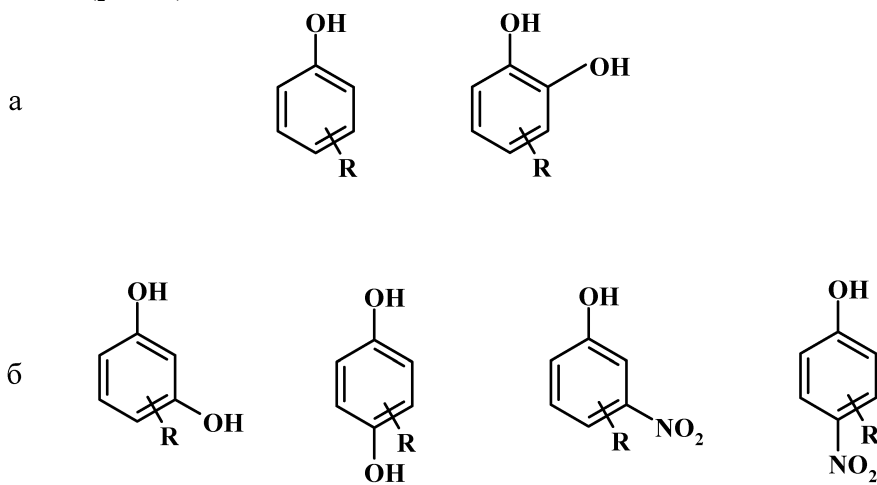


Рис. 2 Фенольные соединения, окисляющиеся (а) и не окисляющиеся (б) в присутствии тирозиназы, где R: H, Cl, Br, NH<sub>2</sub>, C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>, COOH, OC<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>, CN, SCN [1]

Так, нами осуществлено разделение смесей фенола, пирокатехина (субстраты фермента) и резорцина, гидрохинона и *п*-нитрофенола (не окисляющиеся фенольные соединения).

В табл. 2 представлена активность фермента, необходимая для разделения смесей фенолов в различных концентрациях. Следует отметить, что для окисления пирокатехина, в отличие от фенола, необходима значительно меньшая активность фермента, поскольку лимитирующей стадией в процессе тирозиназного окисления является введение OH-группы в *о*-положение молекулы фенола, тогда как пирокатехин минует эту стадию [1].

Поскольку фенолы, не являющиеся субстратами тирозиназы, оказывают на фермент ингибирующее действие [2], для окисления субстратов тирозиназы необходимо значительное увеличение активности фермента.

Установлено, что иммобилизация в ПВК частично защищает фермент от ингибирующего действия *п*-нитрофенола (рис. 3), гидрохинона, резорцина, что способствует увеличению активности иммобилизованной ТИР в 2–3 раза по сравнению со свободной.

Таблица 2

**Активность тирозиназы, необходимая для разделения смесей  
фенольных соединений**

№	Субстрат тирозиназы		Не окисляющееся фенольное соединение	Активность фермента, ед/см <sup>3</sup>	Степень конверсии, %
	Соединение	C, ммоль/дм <sup>3</sup>			
1	фенол	0,5	<i>n</i> -нитрофенол	45	99,5
2				23	51,2
3		2,0		180	99,2
4				90	50,3
5	1,0	гидрохинон	90	98,9	
6			23	26,4	
7	0,5		10	99,7	
8			3	33,6	
9	пирокатехин	2,0	резорцин	40	99,4
10				30	75,2
11		1,0		20	98,8
12				7	34,7
13	10,0	резорцин	200	98,6	
14			100	49,7	

\* рН 6,5, *t* 40 °С,  $\tau$  30 мин, концентрация резорцина, гидрохинона, *n*-нитрофенола 35 ммоль/дм<sup>3</sup>.

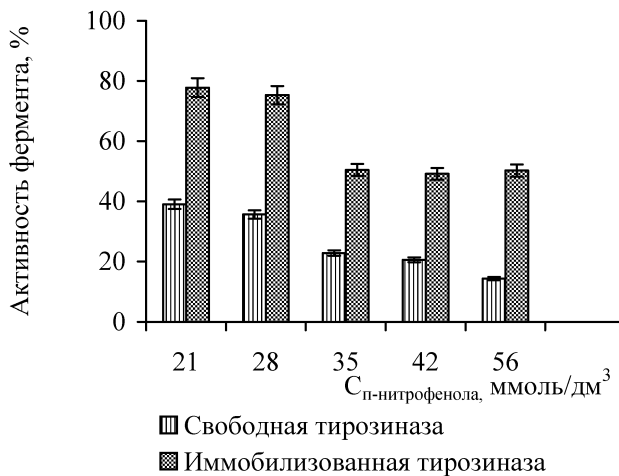


Рис. 3. Влияние концентрации *n*-нитрофенола на сохранение активности свободной и иммобилизованной тирозиназы ( $\tau$  1 ч, рН 6,5, *t* 37 °С)

Показано, что полученный биокатализатор осуществлял окисление фенола или пирокатехина ( $0,5\text{--}10$  ммоль/дм<sup>3</sup>) с количественной степенью биоконверсии в присутствии не окисляющихся резорцина или гидрохинона, либо *n*-нитрофенола с сохранением в растворе их исходных концентраций ( $35\text{--}56$  ммоль/дм<sup>3</sup>). Препарат иммобилизованной тирозиназы эффективно функционировал на протяжении 4-х циклов в реакторе периодического действия (рис. 4).

Продукты окисления фенола и пирокатехина удаляли с помощью алюмокалиевых квасцов по предложенной нами методике [13].

Таким образом, разработан способ разделения смесей фенольных соединений с помощью выделенной тирозиназы *Agaricus bisporus*, иммобилизованной в поли-N-винилкапролактам, с последовательным 4-кратным использованием препарата.

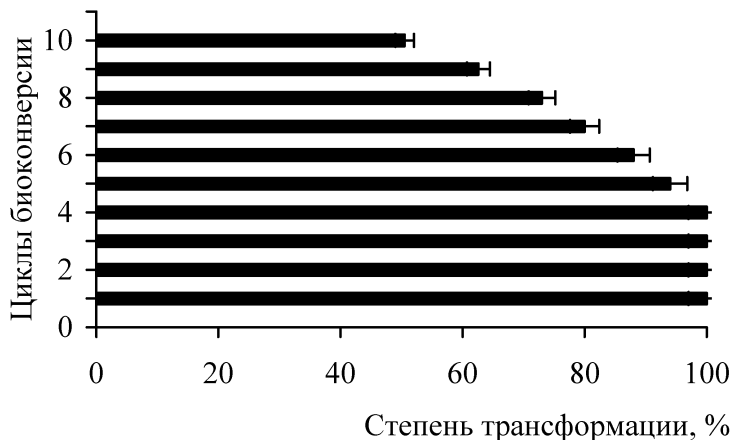


Рис. 4. Кратность конверсии фенола с помощью иммобилизованной тирозиназы ( $C_{\text{фенола}} 0,5$  ммоль/дм<sup>3</sup>,  $C_{\text{n-нитрофенола}} 35\text{--}56$  ммоль/дм<sup>3</sup>;  $\tau$  30 мин; pH 6,5;  $t$  37 °C)

## Литература

1. Solomon E., Sundaram U., Machonkin T. Multicopper oxidases and oxygenases // Chem. Rev. — 1996. — Vol. 96, N 7. — P. 2563–2605.
2. Halaouli S., Asther M., Sigoillot J.-C. et al. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications // J. Appl. Microbiol. — 2006. — Vol. 100, № 2. — P. 219–232.
3. Gregory F. P., Sun W.-Q., Afshin S. Chitosan adsorption for selectively removing phenols from aqueous mixtures // Biotechnol. and Bioeng. — 1992. — Vol. 40, № 9. — P. 1011–1018.
4. Ikehata K., Nicell J. Color and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols // Biotechnol. Prog. — 2000. — Vol. 16, N 4. — P. 533–540.
5. Wada, S., Ichikawa H., Tatsumi K. Removal of phenols and aromatic amines from wastewater by a combination treatment with tyrosinase and a coagulant // Biotechnol. and Bioeng. — 1993. — Vol. 45. — P. 304–309.
6. Пат. 2 956929 США, МКИ 195-68 / E. M. Cohen, L. L. Lerner. Tyrosinase concentrate and extractant and method for making same — Заявл. 24.04.1958. Оpubл. 18.10.1960.
7. Hartree E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // Anal. Biochem. — 1972. — Vol. 48, № 1. — P. 422–427.

8. Stark G. R., Dawson C. R. Spectrophotometric microdetermination of copper in copper oxidas-es using oxalyldihydrazide // Analytical Chemistry. — 1958. — Vol. 30, № 2, P. 191–194.
9. Бартењев Г. М., Френкель С. Я. Физика полимеров. — Ленинград.: Химия, 1990. — 332 с.
10. Коренман И. М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соедине-ний. — М.: Химия, 1975. — 368 с.
11. Романовская И. И., Давиденко Т. И., Арбид И., Пухлик Б. М., Пухлик С. М. Включение ал-лергенов пыльцы ржи и белка куриного яйца в поли-N-винилкапролактама // Фізіологічно — активні речовини. — 2002. — Т. 34, № 2. — С. 87–90.
12. Давиденко Т. И., Романовская И. И., Осейчук О. В., Декина С. С. Структура и образование комплексов включения фенолов в поли-N-винилкапролактама // Доповіди НАН України, 2005. — № 9. — С. 145–150.
13. Романовська І. І., Осейчук О. В., Шестеренко Ю. А., Севастьянов О. В. Ферментативні методи елімінації фенольних поліютантів // Мікробіологія та біотехнологія. — 2008. — Т. 2, № 1. — С. 72–78.

**І. І. Романовська, Ю. А. Шестеренко, О. В. Севастьянов**  
Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України,  
Люстдорфська дор., 86, Одеса, 65080, Україна

## **ВИКОРИСТАННЯ ТИРОЗИНАЗИ ГРИБІВ *AGARICUS BISPORUS* ДЛЯ РОЗДІЛЕННЯ СУМІШЕЙ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК**

### **Резюме**

Розроблений новий спосіб розділення сумішей фенольних сполук в розчинах шляхом окиснення одного з компонентів суміші з використанням іммобілізованої в ПВК частково очищеної тирозинази і подальшим видаленням продуктів окиснення за допомогою алюмокалієвих галунів. Отриманий біокатализатор здійснював окиснення фенолу або пірокатехіну ( $0,5\text{--}10\text{ ммоль/дм}^3$ ) з кількісним ступенем біоконверсії в присутності резорцину или гідрохінону, чи *p*-нітрофенолу, що не окиснюються, із збереженням в розчині їх у вихідних концентраціях ( $35\text{--}56\text{ ммоль/дм}^3$ ) протягом 4-х циклів в реакторі періодичної дії.

**Ключові слова:** тирозиназа, *Agaricus bisporus*, розділення сумішей, фенольні сполуки, іммобілізація.

**I. I. Romanovskaya, Yu. A. Shesterenko, O. V. Sevastyanov**  
A. V. Bogatsky's Physico-Chemical Institute, NAS of Ukraine,  
Luystdorfskaya St., 86, Odessa, Ukraine, 65080

## **USAGE OF MUSHROOM *AGARICUS BISPORUS* TYROSINASE FOR SEPARATION OF PHENOLIC COMPOUNDS MIXTURES**

### **Summary**

The new method of phenolic compounds mixtures separation in solutions was developed, based on the oxidation of one of the mixture component using immobilized in PVC partially purified tyrosinase and the next removal of the oxidation products with a help of potassium alum. The biocatalyst obtained had carried out oxidation of phenol or pyrocatechol ( $0,5\text{--}10\text{ mmol/dm}^3$ ) with quantitative degree of bioconversion in the presence of resorcinol, hydroquinone or *p*-nitrophenol, which are not oxidized, with reservation of their initial concentrations ( $35\text{--}65\text{ mmol/dm}^3$ ) in solution, during 4 cycles in batch reactor.

**Key words:** tyrosinase, *Agaricus bisporus*, separation of mixtures, phenolic compounds, immobilization.