**Утилизация и биодеградация отходов**

УДК 628.349 DOI: 10.25514/CHS.2019.2.16015

# Утилизация фенола и его производных с использованием иммобилизованной на природных полимерах пероксидазы хрена

***В. Г. Матвеева[1,2]*, Б. Б. Тихонов[2], П. Ю. Стадольникова[2], А. И. Сидоров[2]***

[1]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Тверской государственный университет, г. Тверь, Россия, *e-mail: valen-matveeva@yandex.ru
[2]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Тверской государственный технический университет, г. Тверь, Россия

Поступила в редакцию 18.10.2019 г.

**Аннотация** – Утилизация высокотоксичных для человека и окружающей среды техногенных загрязнителей – фенола и его производных является важной задачей обеспечения химической безопасности. В работе приведены результаты синтеза и исследования каталитических свойств эффективных биокатализаторов окисления фенола и его производных на основе микросфер альгината натрия и пероксидазы хрена, извлеченной из сердцевины корня *Armoracia rusticana*. Иммобилизация пероксидазы хрена на микросферах альгината натрия проводилась с использованием карбодиимида и N-гидроксисукцинимида для активации карбоксильных групп носителя с последующей сшивкой с ними аминогрупп фермента. Установлено оптимальное соотношение компонентов, при котором биокатализатор проявляет максимальную активность в реакциях окисления фенола и 4-хлорфенола. Иммобилизованный биокатализатор сохранил около 25-30% активности растворимого фермента, при этом он может быть использован многократно практически без потери активности.

*Ключевые слова:* фенол, производные фенола, оксидоредуктазы, пероксидаза, глюкозооксидаза, биополимеры, иммобилизация, утилизация.

---

# Utilization of Phenol and its Derivatives Using Horseradish Peroxidase Immobilized on Natural Biopolymers

***V. G. Matveeva[1,2]*, B. B. Tikhonov[2], P. Yu. Stadol'nikova[2], and A. I. Sidorov[2]***

[1]Tver State University, Tver, Russia, *e-mail: valen-matveeva@yandex.ru
[2]Tver State Technical University, Tver, Russia

Received October 18, 2019

**Abstract** – Utilization of highly toxic for humans and environment anthropogenic pollutants - phenol and its derivatives is recognized as being of great importance in the field of ensuring chemical safety. In this work, synthesis and investigation of catalytic properties of effective biocatalysts for oxidation of phenol and its derivatives have been performed, whereas the catalysts are based on microspheres of sodium alginate and horseradish peroxidase extracted from central parts of *Armoracia rusticana* root. Immobilization of horseradish peroxidase on sodium alginate based microspheres has been carried out using carbodiimide and N-hydroxysuccinimide for the purpose of activation of carboxyl groups of the carrier, followed by their crosslinking with amino groups of the enzyme. The optimal ratio of the components is determined which provides maximum activity of the biocatalyst in the reactions of oxidation of phenol and 4-chlorophenol. The immobilized biocatalyst retains ca. 25-30% of the original activity of the soluble enzyme, and can be recommended for multiple use without sufficient loss of activity.

*Keywords*: phenol, phenol derivatives, oxidoreductases, peroxidase, glucose oxidase, biopolymers, immobilization, utilization.

## ВВЕДЕНИЕ

Фенол и его производные – крайне токсичные для человека загрязнители водных ресурсов, относящиеся ко II классу опасности («высокоопасные вещества») [1]. Их широкое применение в промышленности и сельском хозяйстве значительно увеличивает вероятность их попадания в источники питьевой воды, что может привести к серьезным, с том числе хроническим, заболеваниям населения [2]. Несмотря на широкий диапазон существующих методов утилизации фенола и его производных, большинство из них не обеспечивают полного удаления контаминантов из воды, а также требуют значительных затрат на организацию процессов очистки [3].

В этой связи перспективным направлением в последние годы становится биокаталитическое окисление фенола и его производных иммобилизованными ферментами класса оксидоредуктаз, прежде всего – пероксидазой хрена [4]. Пероксидаза хрена (К.Ф. 1.11.1.7) – фермент, выделяемый из сердцевины корня *Armoracia rusticana*, окисляет с помощью пероксида водорода органические соединения до свободных хиноновых радикалов, которые впоследствии спонтанно олигомеризуются с образованием нерастворимых продуктов, легко отделяемых от реакционной среды фильтрованием [5]. При этом можно существенно повысить безопасность и экологичность данного процесса за счет применения носителей для иммобилизации на основе биодеградируемых природных полимеров [6].

Высокоэффективен в данной роли альгинат натрия – соль альгиновой кислоты, полисахарида бурых морских водорослей рода *Laminaria* и *Macrocystis*, молекулы которого построены из остатков β-D-маннуроновой и α-L-гулуроновой кислот, находящихся в пиранозной форме и связанных в линейные цепи (1,4)-гликозидными связями [7]. Альгинат натрия растворяется только в щелочной среде, ограниченно растворим в воде, при этом обладает достаточно большой сорбционной емкостью и способностью набухать в водных растворах, что позволяет совмещать в биокатализаторе две функции – каталитическую и адсорбционную [8]. Из альгината натрия могут различными методами быть получены удобные формы носителей (пленки, шарики, гель), выполняющие конкретные технологические задачи [9].

В данной работе был синтезирован эффективный биокатализатор на основе пероксидазы хрена, иммобилизованной на микросферах из альгината натрия, и исследовано его применение для окисления фенола и его производных.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В проведенных экспериментальных исследованиях использовались следующие реактивы: альгинат натрия (Sigma-Aldrich, США); $CaCl_2$ (Реахим, Россия); N-(3-диметиламинопропил)-N′-этилкарбодиимид гидрохлорид (карбодиимид, Sigma-Aldrich); N-гидроксисукцинимид (Sigma-Aldrich); корень

хрена обыкновенного (*Armoracia rusticana*); фенол (Sigma-Aldrich); 4-хлорфенол (Sigma-Aldrich); 4-аминоантипирин (Sigma-Aldrich); $H_2O_2$ (пероксид водорода, Купавнареактив, Россия); дистиллированная вода; фосфатный буферный раствор (pH = 7,0; Невареактив, Россия).

Для получения ферментативного экстракта, обладающего пероксидазной активностью, 5 г свежей сердцевины корня *Armoracia rusticana* измельчали, смешивали с 50 мл фосфатного буферного раствора с pH = 7,0, выдерживали при постоянном перемешивании в течение 1 ч. Затем полученную смесь центрифугировали при 5000 об/мин в течение 20 мин, центрифугат фильтровали на микропористом фильтре, после чего оставляли для хранения в холодильнике при температуре 3 ± 1°C.

Для иммобилизации пероксидазы хрена были синтезированы микросферы из альгината натрия. Синтез микросфер проводился следующим образом. 10 мл раствора 1,5 %-ного раствора альгината натрия по капле через шприц вносили в 100 мл 1,5 %-ного раствора хлорида кальция, в результате чего образовывались микросферы диаметром 2-2,5 мм. Они выдерживались в растворе 2 мин, после чего промывались дистиллированной водой. Образование микросфер основано на реакции взаимодействия альгината с ионами кальция, которая показана на рисунке 1.

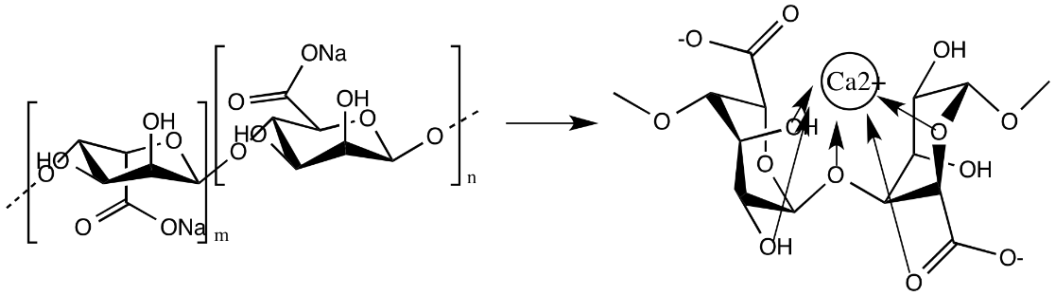
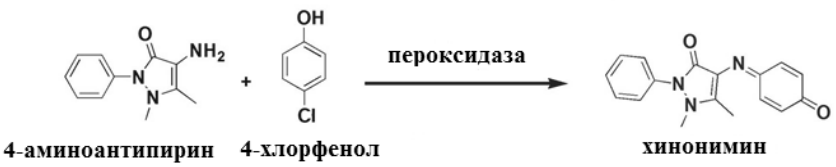



***Рис. 1.*** Взаимодействие альгината натрия с ионами кальция.

Полученные микросферы выдерживались в течение 12 ч в 50 мл раствора, содержащего 0,394 г карбодиимида и 0,144 г N-гидроксисукцинимида. Далее они были промыты дистиллированной водой, выдержаны в течение 6 ч в ферментативном экстракте, полученном ранее, снова промыты дистиллированной водой и хранились до проведения экспериментов в холодильнике при температуре 3 ± 1°C.

Определение активности синтезированного биокатализатора проводилось в термостатируемом стеклянном реакторе в реакциях окисления фенола и 4-хлорфенола в присутствии пероксида водорода и 4-аминоантипирина (ниже приведена реакция на примере 4-хлорфенола) по изменению оптической плотности реакционной смеси при длине волны 506 нм.



## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения микросфер из альгината натрия с оптимальными механическими и физико-химическими свойствами было проведено варьирование соотношения концентраций исходных растворов хлорида кальция и альгината натрия. Выявлено, что при снижении концентрации раствора альгината натрия менее 1,5% масс. существенно растет диаметр микросфер, что отрицательно сказывается на их прочности. При повышении концентрации раствора альгината натрия более 1,5% масс. увеличивается расход реактивов вследствие высокой вязкости раствора. При снижении концентрации раствора хлорида кальция менее 1,5% масс. прочность микросфер также ухудшается, а при увеличении более 1,5% не происходит никаких изменений в физико-химических и механических свойствах микросфер, поэтому дальнейшее повышение концентрации нецелесообразно.

Синтезированные микросферы из альгината натрия обладали следующим распределением по размерам:

- < 2 мм – 10,1%;
- от 2 до 3 мм – 78,3%;
- > 3,0 мм – 11,6%.

Были исследованы каталитические свойства ферментативного экстракта, полученного из сердцевины корня *Armoracia rusticana* по методике, описанной выше, в реакциях окисления фенола и 4-хлорфенола при различных начальных концентрациях субстратов. Ход реакции в виде зависимости оптической плотности реакционной смеси при 506 нм от времени представлен на рисунке 2.

Полученный экстракт был иммобилизован на микросферы из альгината натрия, при этом была проведена оптимизация соотношений компонентов биокатализатора. Содержание карбодиимида и N-гидроксисукцинимида было рассчитано, исходя из содержания карбоксильных групп альгината натрия (0,0394 г карбодиимида и 0,0144 г N-гидроксисукцинимида на 1 г альгината натрия). Активность катализаторов с различным соотношением компонентов в реакциях окисления фенола и 4-хлорфенола приведена в таблице 1.

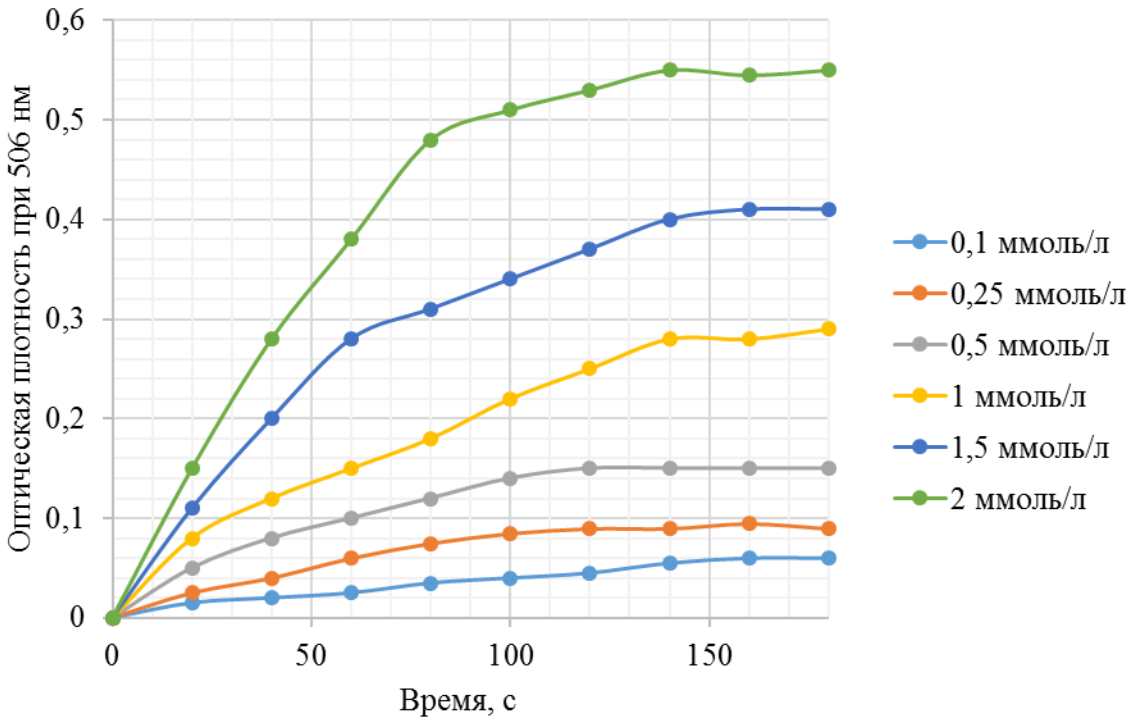
***Таблица 1.*** Активность катализаторов (в ед. ак./мг) при различном соотношении компонентов

| Субстрат | 10 г альгината натрия/ 1 г корня хрена | 10 г альгината натрия/ 2,5 г корня хрена | 10 г альгината натрия/ 5 г корня хрена | 10 г альгината натрия/ 7,5 г корня хрена | 10 г альгината натрия/ 10 г корня хрена |
|---|---|---|---|---|---|
| Фенол | 0,09 | 0,23 | 0,35 | 0,36 | 0,34 |
| 4-хлорфенол | 0,12 | 0,28 | 0,58 | 0,55 | 0,58 |

Как видно из таблицы 1, наиболее целесообразно использовать биокатализатор с соотношением компонентов 10 г альгината натрия; 0,394 г карбодиимида и 0,144 г N-гидроксисукцинимида в 50 мл дистиллированной воды; 50 мл ферментативного экстракта, полученного из 5 г сердцевины корня *Armoracia rusticana*, так как дальнейшее увеличение количества корня хрена не приводит к повышению активности иммобилизованного фермента. Этот факт

связан, прежде всего, с ограниченным количеством свободных карбоксильных групп на поверхности микросфер, с которыми взаимодействуют аминогруппы пероксидазы хрена при иммобилизации.

а)




б)

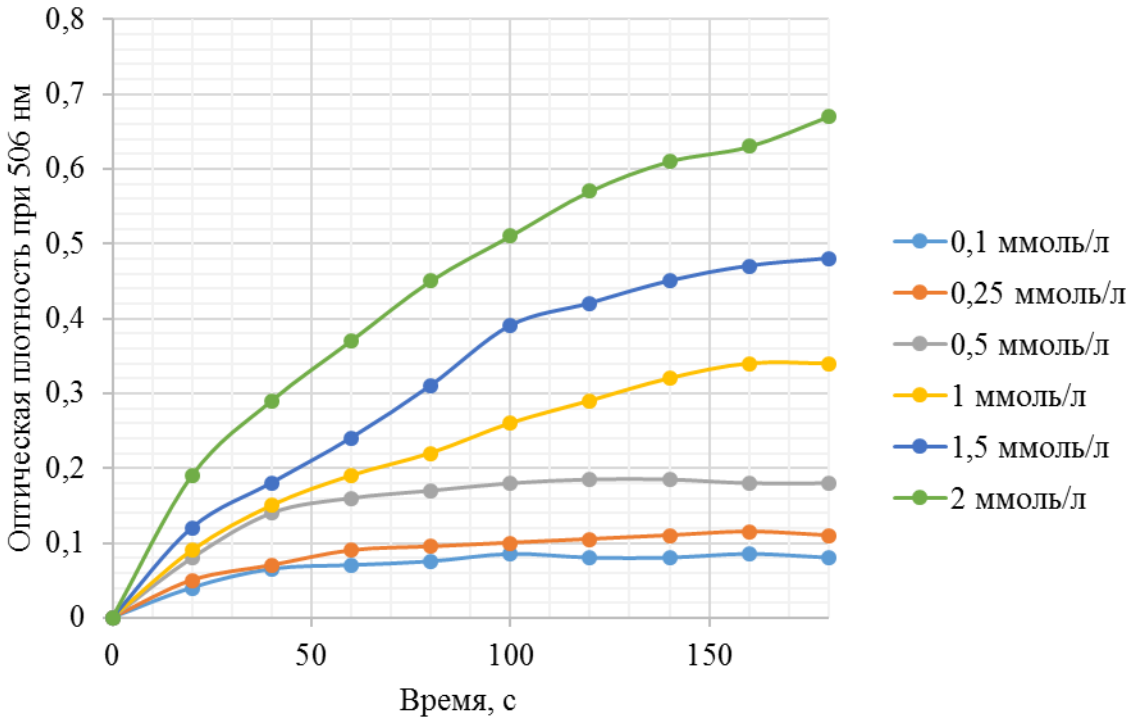
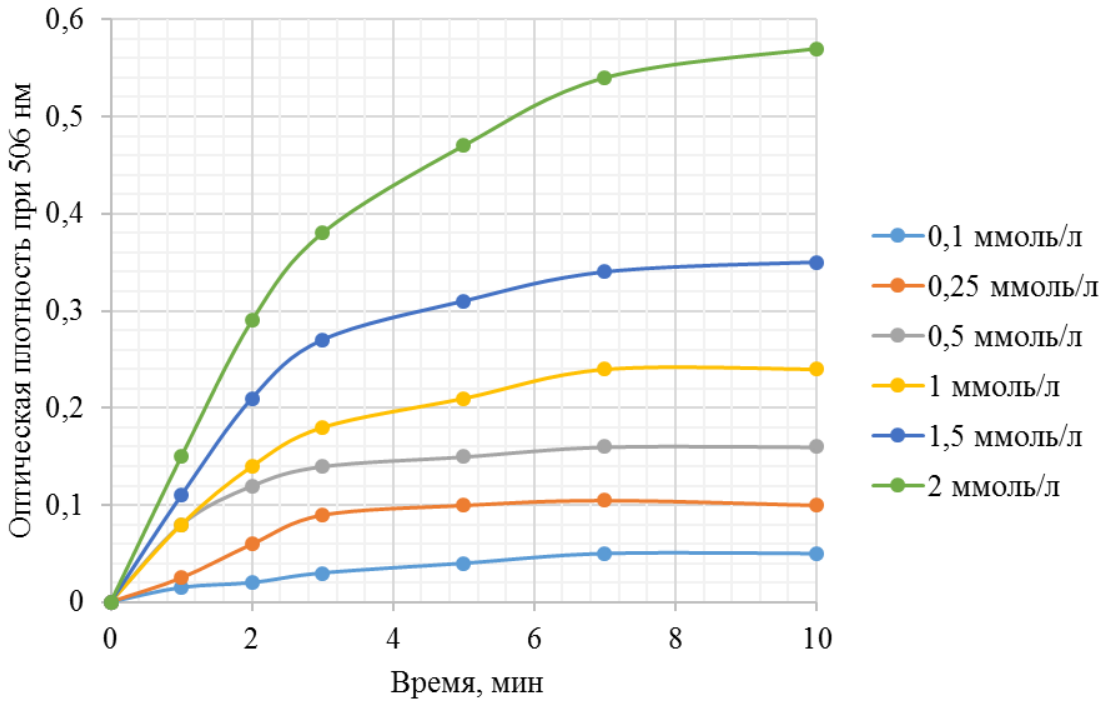



***Рис. 2.*** Ход реакции окисления фенола (а) и 4-хлорфенола (б) ферментативным экстрактом при варьировании начальных концентраций субстратов.

С биокатализатором, полученном при оптимальном соотношении исходных компонентов, были проведены эксперименты по варьированию начальных концентраций фенола и 4-хлорфенола. Ход реакции в виде

зависимости оптической плотности реакционной смеси при 506 нм от времени представлен на рисунке 3.

а)




б)

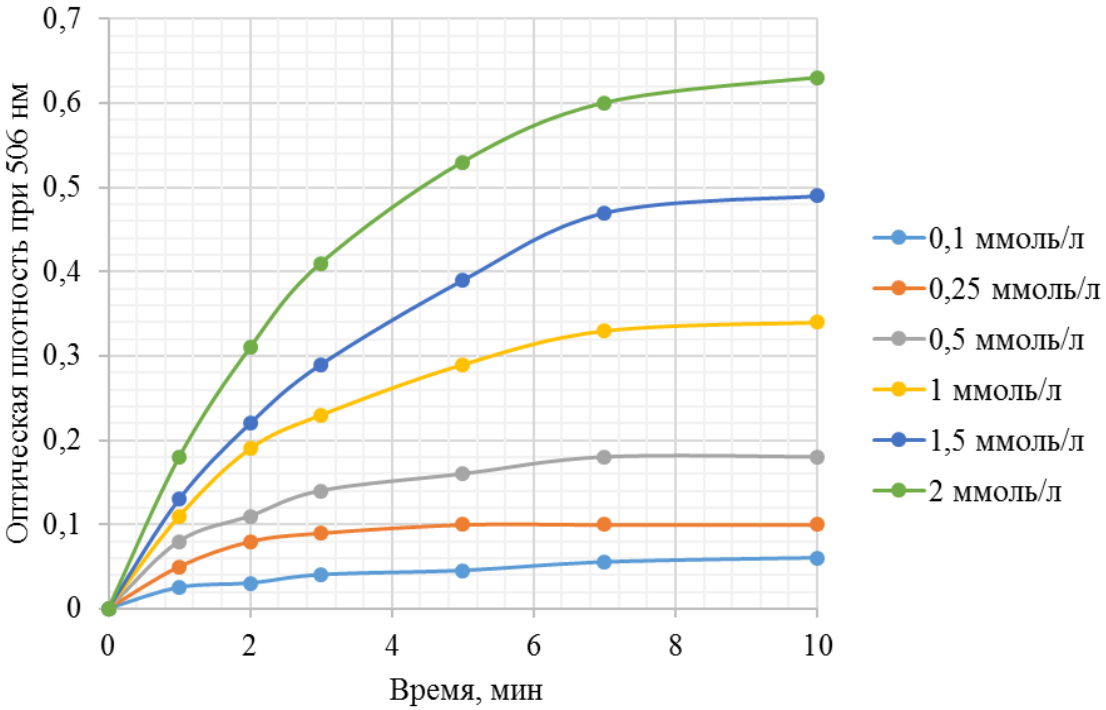


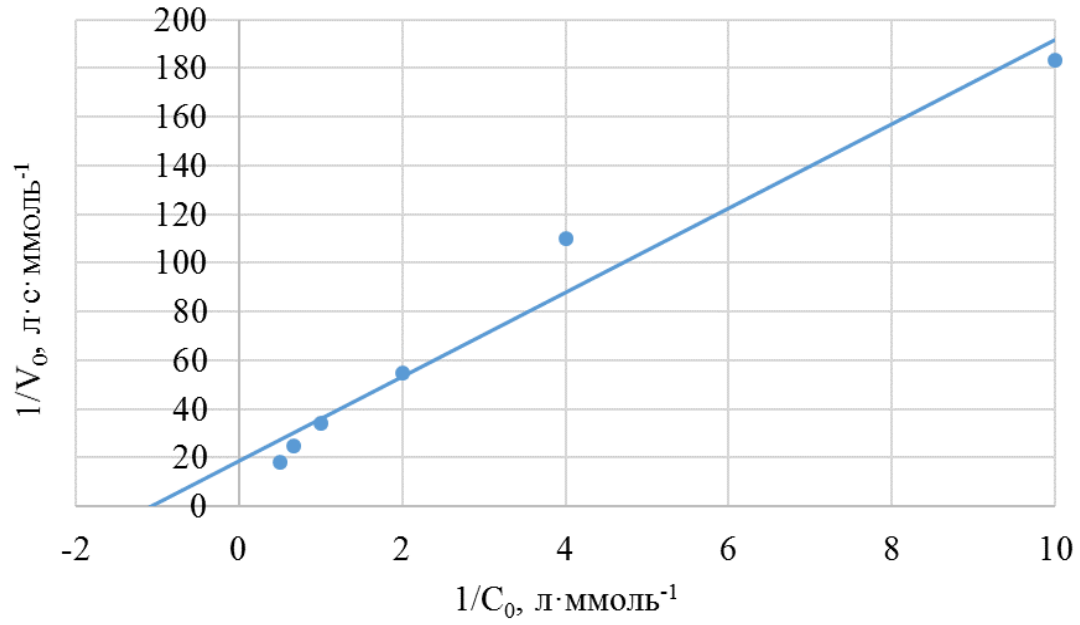

***Рис. 3.*** Ход реакции окисления фенола (а) и 4-хлорфенола (б) иммобилизованным биокатализатором при варьировании начальных концентраций субстратов.

Значения оптических плотностей из рисунков 2 и 3 пересчитаны в значения концентраций продуктов реакции по заранее известным молярным

коэффициентам поглощения продуктов реакции (для фенола – 0,275 и для 4-хлорфенола – 0,335 л·ммоль$^{-1}$·см$^{-1}$).

Результаты экспериментов с ферментативным экстрактом и биокатализатором, полученном при оптимальном соотношении исходных компонентов, в координатах Лайнуивера-Берка ($1/V_0$ – $1/C_0$), приведены на рисунках 4 и 5.

а)




б)

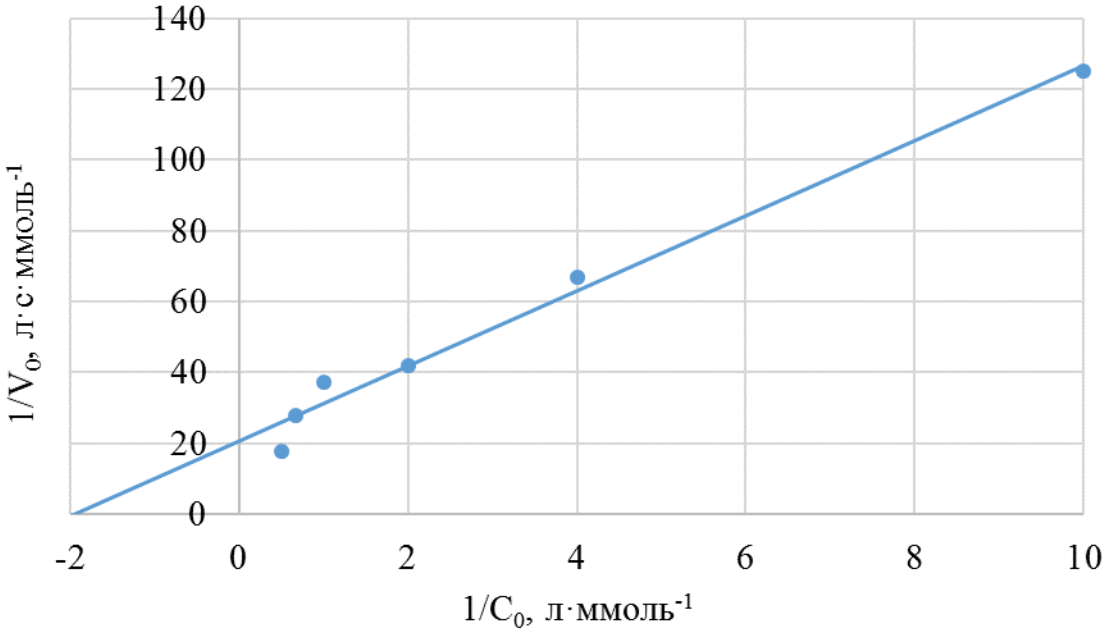
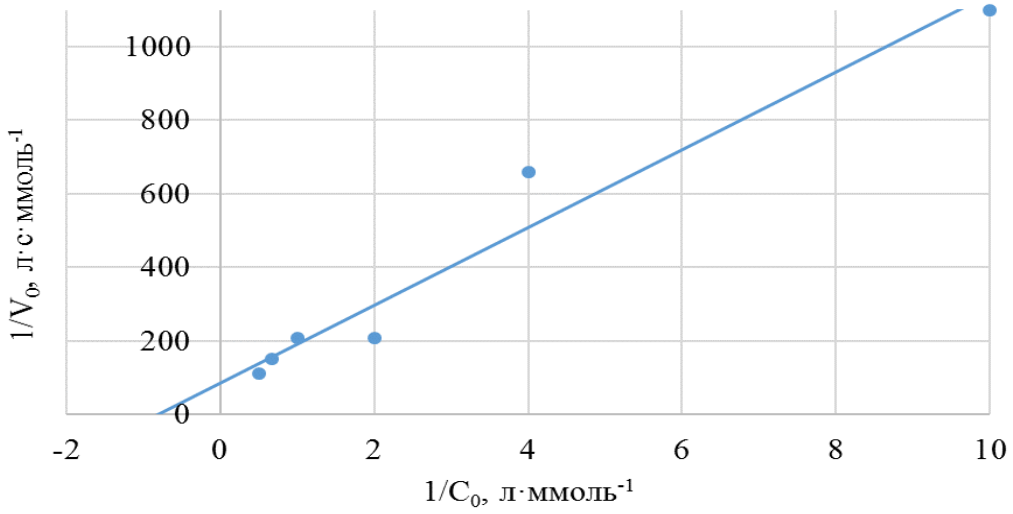



***Рис. 4.*** Результаты экспериментов с ферментативным экстрактом в координатах Лайнуивера-Берка: а) с фенолом, б) с 4-хлорфенолом.

а)




б)

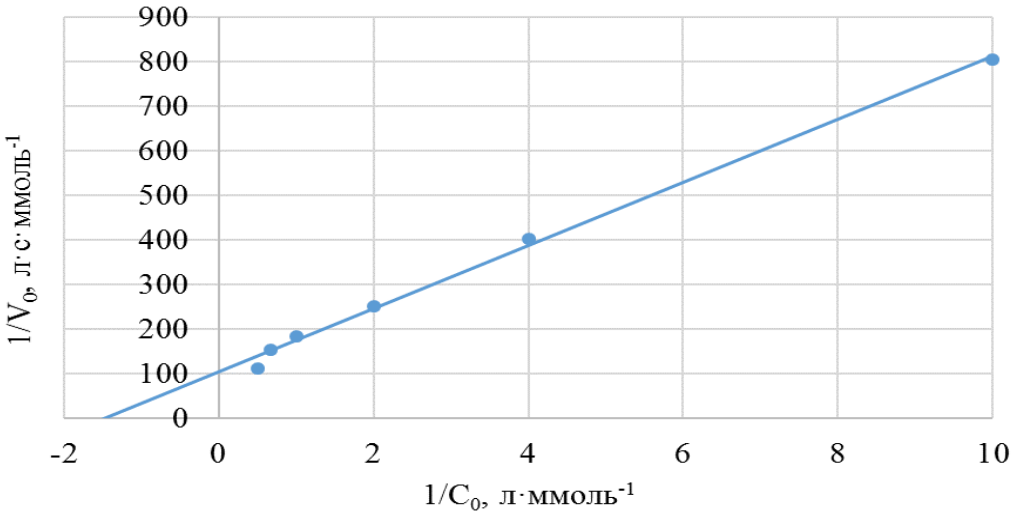



***Рис. 5.*** Результаты экспериментов с иммобилизованным биокатализатором в координатах Лайнуивера-Берка: а) с фенолом, б) с 4-хлорфенолом.

В таблице 2 приведены кинетические параметры ферментативного экстракта и синтезированного биокатализатора (предельная скорость реакции $V_m$, константа Михаэлиса $K_M$, активность катализатора), рассчитанные на основании приведенных на рисунке 4 кривых в координатах Лайнуивера-Берка.

***Таблица 2.*** Кинетические параметры ферментативного экстракта и синтезированного биокатализатора

| Биокатализатор | $V_m$, ммоль/л·с | | $K_M$, ммоль/л | | Активность, ед. ак./мг | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | фенол | 4-ХФ* | фенол | 4-ХФ | фенол | 4-ХФ |
| Экстракт | 0,054 | 0,048 | 0,93 | 0,51 | 1,07 | 1,25 |
| Иммобилизованный на микросферах фермент | 0,012 | 0,009 | 1,24 | 0,68 | 0,35 | 0,58 |

*4-ХФ – 4-хлорфенол

Полученные данные свидетельствуют о том, что синтезированный биокатализатор эффективно окисляет фенол и 4-хлорфенол в концентрациях до 2 ммоль/л. При этом иммобилизованный фермент сохранил около 25-30% активности исходного экстракта (исходя из значений активности, приведенных в таблице 2), несмотря на значительное снижение активности иммобилизованного фермента, что связано с его гетерогенизацией и возникновением диффузионных ограничений для доступа молекул субстратов к активным центрам пероксидазы. Использование данного биокатализатора эффективно за счет его высокой стабильности в повторных экспериментах, (таблица 3), в которых биокатализатор сохранил около 75% исходной активности после 10 циклов использования.

***Таблица 3.*** Активность биокатализатора (в ед. ак./мг) в 10 последовательных циклах использования

| Субстрат | Номер цикла | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| Фенол | 0,35 | 0,33 | 0,31 | 0,3 | 0,28 | 0,28 | 0,27 | 0,27 | 0,27 | 0,26 |
| 4-ХФ* | 0,58 | 0,54 | 0,51 | 0,49 | 0,47 | 0,45 | 0,44 | 0,43 | 0,42 | 0,43 |

*4-ХФ – 4-хлорфенол

Кроме того, часть продуктов реакции адсорбируется на микросферах из альгината натрия и выводится из реакционной среды, что подтверждается небольшим потемнением микросфер после каждого цикла использования. Все эти факты делают синтезированный биокатализатор перспективной альтернативой традиционным методам утилизации фенола и его производных.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезирован эффективный гетерогенный биокатализатор на основе иммобилизованной на микросферах альгината натрия пероксидазы хрена, пригодный для многократного использования в процессах утилизации фенола и его производных. Биокатализатор сохраняет около 25-30% активности исходного экстракта, при этом он может быть использован многократно с минимальной потерей активности (сохранение до 75% исходной активности после 10 циклов использования).

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-08-00424) и Российского научного фонда (проект №17-19-01408).*

*ACKNOWLEDGEMENT*

*The work was supported by the grants of Russian Foundation for Basic Research (Project No. 16-03-20280) and Russian Science Foundation (Project No. 17-19-01408).*

Список литературы:

1. *Грушко Я.М.* Вредные органические соединения в промышленных сточных водах. Л.: Химия, 1982. 214 с.

2. *Майстренко В.Н., Клюев Н.А.* Эколого-аналитический мониторинг стойких органических загрязнителей. М.: Бином, 2011. 323 с.
3. *Фатихова Н.И., Ягафарова Г.Г., Коржова Л.Ф., Леонтьева С.В., Ягафарова Д.И.* // Вестник технологического университета. 2016. Т. 19. № 10. С. 152.
4. *Bayramoglu G., Arica M. Y.* // Journal of Hazardous Materials. 2008. V. 156. No. 1-3. P. 148. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2007.12.008.
5. *Veitch N.C.* Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme // Phytochemistry. 2004. V. 65. No. 3. P. 249. DOI: 10.1016/j.phytochem.2003.10.022.
6. *Bilal M., Iqbal H.M.N.* // International Journal of Biological Macromolecules. 2019. V. 130. P. 462. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.152.
7. *Malik D.J., Sokolov I.J., Vinner G.K. et al.* // Advances in Colloid and Interface Science. 2017. V. 249. P. 100. DOI: 10.1016/j.cis.2017.05.014.
8. *Zhao L., Wang J., Zhang P., Gu Q., Gao Ch.* Absorption of Heavy Metal Ions by Alginate. In: Bioactive Seaweeds for Food Applications. Ed. Yimin Qin. Academic Press, 2018. P. 255. DOI: https://doi.org/10.1016/C2016-0-04566-7.
9. *Asadi S., Eris S., Azizian S.* // ACS Omega. 2018. V. 3(11). P. 15140. DOI: 10.1021/acsomega.8b02498.

References:

1. *Grushko Ya.M.* Hazardous organic compounds in industrial wastewater. L.: Khimiya, 1982. 214 p. [in Russian].
2. *Maystrenko V.N., Klyuev N.A.* Ecological-analytical monitoring of persistent organic pollutants. M.: Binom, 2011. 323 p. [in Russian].
3. *Fatikhova N. I., Yagafarova G.G., Korzhova L.F., Leontjeva S.V., Yagafarova D.I.* // Vestnik tekhnologicheskogo universiteta [Bulletin of Technological University]. 2016. V. 19, No. 10. P. 152 [in Russian].
4. *Bayramoglu G., Arica M. Y.* // Journal of Hazardous Materials. 2008. V. 156. No. 1-3. P. 148. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2007.12.008.
5. *Veitch N.C.* Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme // Phytochemistry. 2004. V. 65. No. 3. P. 249. DOI: 10.1016/j.phytochem.2003.10.022.
6. *Bilal M., Iqbal H.M.N.* // International Journal of Biological Macromolecules. 2019. V. 130. P. 462. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.152.
7. *Malik D.J., Sokolov I.J., Vinner G.K. et al.* // Advances in Colloid and Interface Science. 2017. V. 249. P. 100. DOI: 10.1016/j.cis.2017.05.014.
8. *Zhao L., Wang J., Zhang P., Gu Q., Gao Ch.* Absorption of Heavy Metal Ions by Alginate. In: Bioactive Seaweeds for Food Applications. Ed. Yimin Qin. Academic Press, 2018. P. 255. DOI: https://doi.org/10.1016/C2016-0-04566-7.
9. *Asadi S., Eris S., Azizian S.* // ACS Omega. 2018. V. 3(11). P. 15140. DOI: 10.1021/acsomega.8b02498.