

DOI: 10.6060/ivkkt.20216401.6267

УДК: 544.47:542.943:615.322

ДЕСТРУКЦИЯ БРОМФЕНОЛОВОГО СИНЕГО С УЧАСТИЕМ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА**А.А. Соловьева, Т.Ч. Фам, О.Е. Лебедева, М.Н. Устинова**

Анна Алексеевна Соловьева*, Тхи Чинь Фам, Ольга Евгеньевна Лебедева, Мария Николаевна Устинова
Кафедра общей химии, Белгородский государственный национальный исследовательский университет,
ул. Победы, 85, Белгород, Российская Федерация, 308015
E-mail: solovyeva@bsu.edu.ru*

*В данной работе проведена окислительная деструкция красителя бромфенолового синего пероксидом водорода при pH 4,0-4,1 в присутствии коммерческого препарата пероксидазы хрена, а также пероксидазы, выделенной непосредственно из корней хрена (*Arctostaphylos uva-ursi*). Для определения активности пероксидазы использовали модельную реакцию окисления фенола до хинона. При содержании красителя 32,7 мкМ оптимальная концентрация пероксида водорода составила 0,04 мМ при концентрации пероксидазы 1,15 нМ. Определена оптимальная температура ферментативной реакции: при 23 °С в течение 10 мин 90% красителя подвергается деструкции. При повышении температуры до 50 °С скорость реакции уменьшается, и степень обесцвечивания составляет 56% за тот же интервал времени. Показано, что начальная скорость пероксидазного окисления бромфенолового синего подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен. Параметры ферментативной реакции определялись линеаризацией уравнения Михаэлиса-Ментен в координатах Лайнуивера-Берка. Найдено, что для реакции пероксидазного окисления бромфенолового синего константа Михаэлиса и максимальная скорость составляют 42,7 мкМ и 57,5 мкМ·мин⁻¹, соответственно. При использовании пероксидазы, выделенной из корней хрена, также удалось достигнуть высокой степени деструкции красителя. Эксперименты проводили при температуре 30 °С и pH=4,1. С ростом объема вытяжки от 0,1 до 0,2 мл степень деструкции увеличивается от 75% до 90%. Результаты демонстрируют высокую эффективность пероксидазного окисления бромфенолового синего как с участием коммерческого препарата пероксидазы хрена, так и пероксидазы, выделенной из корней хрена. Ферментативная окислительная деструкция может рассматриваться как альтернатива биодegradации.*

Ключевые слова: пероксидаза хрена, ферментативное окисление, краситель бромфеноловый синий

HORSERADISH PEROXIDASE CATALYZED DEGRADATION OF BROMOPHENOL BLUE DYE**A.A. Solovyeva, T.T. Pham, O.E. Lebedeva, M.N. Ustinova**

Anna A. Solovyeva*, Thi Trinh Pham, Olga E. Lebedeva, Maria N. Ustinova
Department of General Chemistry, Belgorod State National Research University, Pobedy st., 85, Belgorod,
308015, Russia
E-mail: solovyeva@bsu.edu.ru*

*In this study, the oxidative destruction of bromophenol blue dye with hydrogen peroxide was carried out at pH 4.0-4.1 in the presence of a commercial horseradish peroxidase, as well as peroxidase isolated directly from horseradish roots (*Armoracia rusticana*). To determine peroxidase activity, a model reaction of the oxidation of phenol to quinone was used. With a dye concentration of 32.7 μM , the optimal concentration of hydrogen peroxide was 0.04 mM at peroxidase concentration of 1.15 nM. The optimal temperature of the enzymatic reaction was determined: at 23 °C for 10 min 90% of the dye was exposed to destruction. When the temperature rises to 50 °C, the reaction rate decreases, and the degree of destruction is 56% for the same time interval. It was shown that the initial rate of peroxidase oxidation of bromophenol blue follows Michaelis-Menten equation. The kinetic parameters of the enzymatic reaction were determined by linearizing Michaelis-Menten equation in Lineweaver-Burk coordinates. It was found that for the peroxidase oxidation reaction of bromophenol blue Michaelis constant and maximum rate were 42.7 μM and 57.5 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$, respectively. In this work, a high percentage of dye degradation was also achieved when using peroxidase isolated from horseradish roots. The experiments were conducted at a temperature of 30°C and pH 4.1. With the increase in the volume of the extract from 0.1 to 0.2 ml, the percentage decolorization increases from 75% to 90%. The results demonstrate the high degradation efficiency of bromophenol blue with the participation of the commercial horseradish peroxidase and peroxidase isolated from horseradish roots. Enzymatic oxidative degradation can be considered as an alternative to biodegradation.*

Key words: horseradish peroxidase, enzymatic oxidation, bromophenol blue dye

Для цитирования:

Соловьева А.А., Фам Т.Ч., Лебедева О.Е., Устинова М.Н. Деструкция бромфенолового синего с участием пероксидазы хрена. *Изв. вузов. Химия и хим. технология*. 2021. Т. 64. Вып. 1. С. 93–98

For citation:

Solovyeva A.A., Pham T.T., Lebedeva O.E., Ustinova M.N. Horseradish peroxidase catalyzed degradation of bromophenol blue dye. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.* [ChemChemTech]. 2021. V. 64. N 1. P. 93–98

ВВЕДЕНИЕ

Сточные воды текстильной, пищевой, бумажной, полиграфической, кожевенной и косметической промышленности содержат остатки красителей [1]. При попадании в окружающую среду без очистки они могут вызывать серьезные проблемы, снижая прозрачность природной воды и, как следствие, препятствуют проникновению солнечной радиации и уменьшают процесс фотосинтеза. В связи с этим деструкция красителей в ходе очистки стоков является важной задачей, даже если эти загрязнители малотоксичны.

В последние годы использование ферментативных методов для обработки сточных вод, содержащих красители и нефтепродукты, вызывает большой интерес [2-4]. Растительные ферменты, такие как пероксидаза хрена, хорошо известны своей эффективностью в промотировании окисления широкого спектра ароматических соединений [5-8], а также некоторых важных промышленных красителей [9-19]. Так, в работе [18] подробно изучена деструкция индигокармина пероксидом водорода с участием пероксидазы. Авторы определили кинетические характеристики реакции, оптималь-

ное соотношение реагентов, изучили влияние температуры и pH на скорость реакции, были определены некоторые термодинамические параметры реакции. В работе [19] выполнено сравнительное окисление метиленового синего и азура с различными классами пероксидаз – пероксидазой хрена и лигнин-пероксидазой. Показано, что лигнин-пероксидаза более эффективна в реакциях деметилирования красителей.

Целью настоящей работы являлось изучение окисления красителя бромфенолового синего с использованием пероксида водорода и пероксидазы. Этот краситель является моделью органического загрязнителя сложного состава, содержащего в структуре атомы галогена, серы и устойчивые ароматические структуры.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Окислительная деструкция бромфенолового синего в присутствии пероксидазы.

Бромфеноловый синий (БФС, регистрационный номер CAS 115-39-9) квалификации «ч.д.а.» без дополнительной очистки.

Раствор фермента готовили растворением навесок твердого препарата пероксидазы из корней хрена (HRP) производства «VWR Chemicals» (США)

со спектральным показателем чистоты $RZ = 3,0$ в фосфатном буферном растворе ($pH = 6,86$). Концентрацию пероксидазы хрена определяли спектрофотометрически, принимая $\epsilon_{403} = 9,6 \cdot 10^4$ л/моль·см.

В колбы объемом 25 мл последовательно вводили расчетные количества раствора БФС, концентрация красителя варьировалась от 17,2 до 62,9 мкМ, концентрация пероксидазы во всех экспериментах была постоянной и составляла 1,15 нМ, смесь доводили до метки буферным раствором ($pH = 4,1$). Инициировали реакцию добавлением 0,1 мл раствора пероксида водорода 0,01 М. В момент введения последнего включали секундомер, тщательно перемешивали смесь, переносили в кювету и следили за изменением оптической плотности раствора в максимуме поглощения ($\lambda = 592$ нм, $\epsilon_{592} = 3,4 \cdot 10^4$ л/моль·см, $l = 1$ см) в течение 10 мин., используя спектрофотометр UV/Vis Analytik Jena Specord 200 plus.

Окислительная деструкция БФС в присутствии пероксидазы, выделенной из корней хрена (Armoracia rusticana). Для получения вытяжки из корней хрена навеску 3,0275 г растирали пестиком в ступке с небольшим количеством буферного раствора ($pH = 6,86$). Переносили растертую массу в мерную колбу на 25 мл, разбавляли до метки тем же буфером, хорошо перемешивали и настаивали в течение 15 мин. Затем раствор отфильтровывали, прозрачный фильтрат (вытяжку) использовали для экспериментов.

Для определения активности пероксидазы используются модельные реакции окисления различных субстратов [20]: например, пирогаллола [8, 17], АВТС (диаммониевая соль 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоната)) [11, 18, 20], фенола [9]. В настоящей работе активность пероксидазы, содержащейся в корнях хрена, определяли в реакции окисления фенола до хинона. Для этого 0,5 мл фенола 2,1 мМ и аликвоту 0,5 мл вытяжки фермента добавляли к 1,5 мл фосфатного буфера ($pH 6,86$), реакцию инициировали добавлением 0,5 мл раствора H_2O_2 0,1 М. При пероксидазном окислении фенола образуется окрашенный продукт ($\lambda = 440$ нм). Измеряли изменение светопоглощения раствора каждые 30 с в течение 5 мин. Пероксидазная активность составила 0,59 мкМ/мин·мг.

Окислительную деструкцию БФС проводили в колбе объемом 25 мл при следующих соотношениях компонентов реакционной смеси: 0,2 мл вытяжки, концентрация БФС – 32,7 мкМ, концентрация пероксида водорода – 0,04 мМ. Значение pH 4,0-4,1 поддерживали с помощью фталатного буферного раствора.

Для проведения исследований при повышенных температурах использовали лабораторный термостат суховоздушный ТС-1/20 СПУ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате воздействия на раствор БФС пероксида водорода в присутствии пероксидазы происходит значительное уменьшение интенсивности поглощения в области 592 нм (рис. 1). При использовании только пероксида водорода или пероксидазы хрена не наблюдалось заметного снижения поглощения (не более 2%), то есть фермент катализирует окисление красителя пероксидом водорода в растворе.

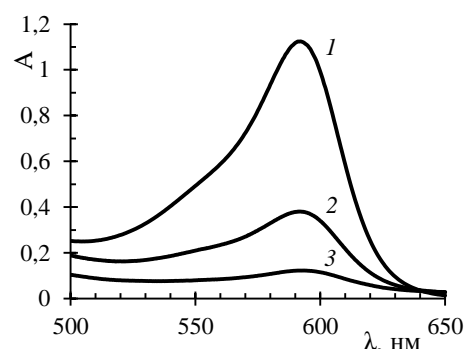


Рис. 1. Спектры поглощения раствора БФС в присутствии пероксидазы и пероксида водорода в процессе окисления, $C(\text{БФС})=32,7$ мкМ, $C(\text{пероксидазы})=1,15$ нМ, $C(H_2O_2)=0,04$ мМ, $t=30$ °С, $pH=4,1$: 1 – исходный; 2 – время окисления 1 мин.; 3 – 10 мин

Fig. 1. UV-vis spectra of aqueous bromophenol blue dye solutions ($C=32.7$ μM) in the presence of peroxidase and hydrogen peroxide during oxidation, $C(\text{HRP})=1.15$ нМ, $C(H_2O_2)=0.04$ мМ, $t=30$ °С, $pH=4.1$: 1 – original; 2 – reaction time 1 min; 3 – 10 min

Для получения кинетических характеристик изучаемой ферментативной реакции использовали схему Михаэлиса-Ментен. Для этого были получены значения начальной скорости реакции при различных концентрациях красителя в растворе (таблица).

Таблица

Кинетические характеристики деструкции БФС в присутствии пероксидазы (1,15 нМ) и H_2O_2 (0,04 мМ), $pH=4,1$, $t=30$ °С

Table. Kinetic characteristics of degradation of bromophenol blue dye in the presence of horseradish peroxidase (1.15 нМ) and H_2O_2 (0.04 мМ), $pH=4.1$, $t=30$ °С

$C(\text{БФС}),$ мкМ	Начальная скорость, мкМ/мин.	Степень деструкции, % (10 мин.)
17,2	16,5	100
32,7	24,8	95
39,1	27,9	88
45,8	31,1	81
58,1	33,3	68

Из данных таблицы видно, что начальная скорость пероксидазного окисления БФС подчиняется схеме Михаэлиса-Ментен, с увеличением количества субстрата начальная скорость возрастает до определенного значения, дальнейшее увеличение концентрации субстрата не приводит к увеличению начальной скорости реакции. Фермент полностью насыщается субстратом, и при данной концентрации это состояние соответствует максимальной скорости реакции. Параметры ферментативной реакции определялись линеаризацией графика зависимости начальной скорости пероксидазного окисления красителя от его концентрации в координатах Лайнуивера-Берка. Найдено, что для окислительной реакции деструкции БФС при температуре 30 °С и pH = 4,1 константа Михаэлиса и максимальная скорость составляют 42,7 мкМ и 57,5 мкМ·мин⁻¹, соответственно.

Известно, что на скорость ферментативных реакций оказывает значительное влияние температурный фактор. Результаты оценки влияния температуры на протекание пероксидазного окисления БФС представлены на рис. 2. Из полученных экспериментальных данных видно, что максимум каталитической активности пероксидазы в реакции окисления БФС пероксидом водорода наблюдается при температуре 23 °С, степень деструкции достигает 90%. При повышении температуры скорость ферментативной реакции уменьшается и при 50 °С степень обесцвечивания составляет всего 56%. В работе [17] авторами была обнаружена противоположная тенденция, при повышении температуры от 25 °С до 60 °С степень деструкции красителя индигокармина увеличивалась до 92%.

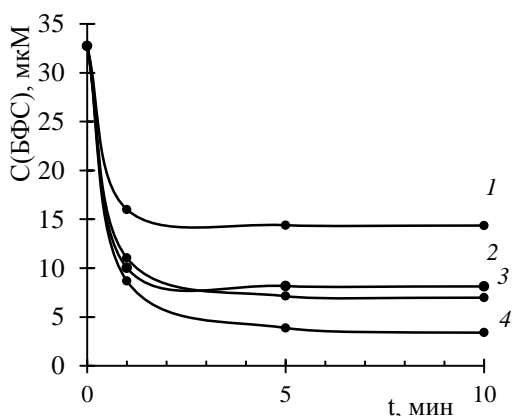


Рис. 2. Кинетические кривые обесцвечивания растворов БФС C(БФС)=32,7 мкМ, C(пероксидазы)=1,15 нМ, C(H₂O₂)=0,04 мМ при различных температурах: 1 – 50 °С; 2 – 40 °С; 3 – 30 °С; 4 – 23 °С

Fig. 2. Kinetic curves of decolorization of aqueous bromophenol blue dye solutions (C=32.7 μM) at different temperatures, C(HRP)=1.15 nM, C(H₂O₂)=0.04 mM): 1 – 50 °C; 2 – 40 °C; 3 – 30 °C; 4 – 23 °C

Для изучения влияния содержания пероксида водорода на степень обесцвечивания растворов БФС варьировали концентрацию пероксида водорода от 0,04 до 40 мМ при 23 °С. На рис. 3 показаны кинетические кривые деструкции БФС при различном содержании пероксида водорода.

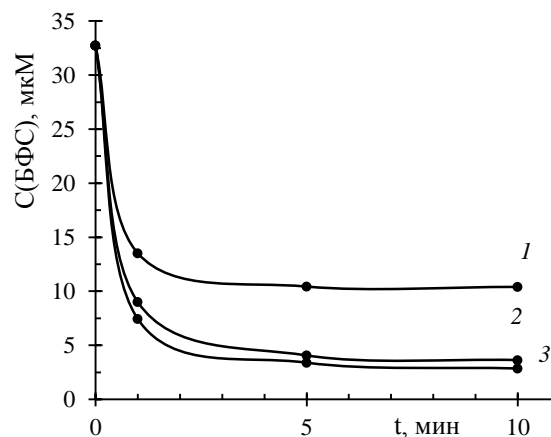


Рис. 3. Кинетические кривые окисления БФС в присутствии пероксидазы (C(БФС) = 32,7 мкМ, C(пероксидазы) = 1,15 нМ) при различном содержании H₂O₂, t=23 °С: 1 – 40; 2 – 0,04; 3 – 0,4-4 мМ
Fig. 3. Kinetic curves of decolorization of aqueous bromophenol blue dye solutions (C=32.7 μM) at different H₂O₂ content, C(HRP)=1.15 nM, t=23 °C: 1 – 40; 2 – 0.04; 3 – 0.4-4 mM

Видно, что при содержании пероксида водорода от 0,04, до 4 мМ удается достигнуть обесцвечивания раствора красителя на 89-91% в течение 10 мин (рис. 3). С повышением концентрации H₂O₂ степень деструкции уменьшается и составляет 68%. Можно сделать вывод, что H₂O₂ может оказывать токсическое действие на пероксидазу в высоких концентрациях, вызывая частичную инактивацию.

Дальнейшая работа была направлена на изучение возможности использования пероксидазы, выделенной из корней хрена, в реакции обесцвечивания БФС. Эксперименты проводили при температуре 30 °С и pH = 4,1 рис. 4.

С ростом объема вытяжки от 0,1 до 0,2 мл степень деструкции увеличивается от 75% до 90%.

Таким образом, бромфеноловый синий может быть подвергнут окислительной деструкции пероксидом водорода с участием чистой пероксидазы хрена и пероксидазы, выделенной из корней хрена, причем окисление протекает с высокой эффективностью и может стать альтернативой биодegradации.

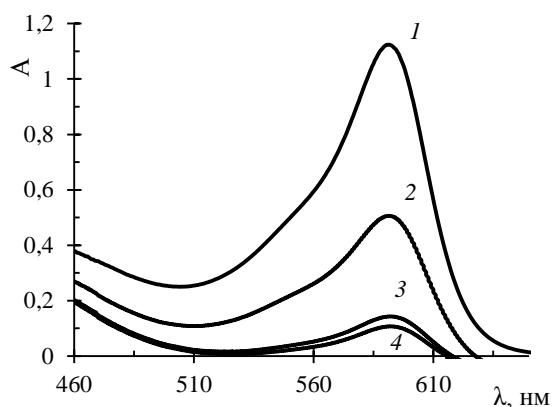


Рис. 4. Спектры поглощения раствора БФС в ходе окислительной деструкции пероксидом водорода в присутствии экстракта из хрена при температуре 30 °С, С(БФС) = 32,7 мкМ, С(H₂O₂) = 0,4 мМ, рН = 4,1: 1 – исходный; 2 – время реакции 1 мин.; 3 – 5 мин.; 4 – 10 мин.

Fig. 4. UV-vis spectra of aqueous Bromophenol blue dye solutions (C = 32.7 μM) oxidative destruction with hydrogen peroxide in the presence of peroxidase isolated from horseradish roots, C(HRP) = 1.15 nM, C(H₂O₂) = 0.04 mM, t = 30 °C, pH = 4.1: 1 – original; 2 – reaction time 1 min; 3 – 5 min; 4 – 10 min.

ВЫВОДЫ

Проведена окислительная деструкция бромфенолового синего пероксидом водорода при участии ферментного препарата пероксидазы, а также пероксидазы, выделенной из корней хрена. При 30 °С и рН = 4,1 в течение 10 мин обесцвечивается более 89% раствора красителя. Были найдены кинетические параметры уравнения Михаэлиса-Ментен при температуре 30 °С и рН = 4,1. Константа Михаэлиса и максимальная скорость составляют 42,7 мкМ и 57,5 мкМ·мин⁻¹, соответственно. Максимум каталитической активности пероксидазы в реакции окисления бромфенолового синего пероксидом водорода наблюдается при температуре 23 °С, степень деструкции достигает 90%.

Была изучена возможность использования ферментного комплекса, выделенного из корней хрена, в реакции обесцвечивания бромфенолового синего. Полученные данные показали, что при температуре 30 °С и рН = 4,1 в течение 10 мин более 91% красителя обесцвечивалось. Избыток H₂O₂ может вызвать торможение (дезактивацию) каталитического процесса.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

- Routoula E., Patwardhan S.V. Degradation of Anthraquinone Dyes from Effluents: A Review Focusing on Enzymatic Dye Degradation with Industrial Potential. *Environ. Sci. Technol.* 2020. V. 54. N 2. P. 647-664. DOI: org/10.1021/acs.est.9b03737.
- Husain Q. Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2010. V. 9. P. 117-140. DOI: 10.1007/s11157-009-9184-9.
- Singh R.L., Singh P.K., Singh R.P. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes – A review. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 2015. V. 104. P. 21-31. DOI: 10.1016/j.ibiod.2015.04.027.
- Imran M., Crowley D.E., Khalid A. Microbial biotechnology for decolorization of textile wastewaters. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 2015. V. 14. P. 73-92. DOI: 10.1007/s11157-014-9344-4.
- Duran N., Esposito E. Potential application of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl. Catal. B.* 2000. V. 28. N 2. P. 83-99. DOI: 10.1016/S0926-3373(00)00168-5.
- Aitken M.D., Massey I.J., Chen T., Heck P.E. Characterization of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants. *Water Res.* 1994. V. 28. N 9. P. 1879-1889. DOI: 10.1016/0043-1354(94)90163-5.
- Bayramoglu G., Arica M.Y. Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: Horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads. *J. Hazard. Mater.* 2008. V. 156. N 1-3. P. 148-155. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2007.12.008.
- Tong Z., Qingxiang Z., Hui H., Qin L., Yi Z. Removal of toxic phenol and 4-chlorophenol from wastewater by horseradish peroxidase. *Chemosphere.* 1997. V. 34. N 4. P. 893-903. DOI: 10.1016/S0045-6535(97)00015-5.
- Bhunja A., Durani S., Wangikar P.P. Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. *Biotechnol. Bioeng.* 2001. V. 72. N 5. P. 562-567. DOI: 10.1002/1097-0290(20010305)72:5%3C562::AID-BIT1020%3E3.0.CO;2-S.
- Kim G.Y., Lee K.B., Cho S.H., Shim J., Moon S.H. Electroenzymatic degradation of azo dye using an immobilized peroxidase enzyme. *J. Hazard. Mater.* 2005. V. 126. N 1-3. P. 183-188. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2005.06.023.
- Farias S., de Oliveira D., Ulson de Souza A.A., Guelli U. de Souza S.M., Morgado F. Removal of reactive blue 21 and reactive red 195 dyes using horseradish peroxidase as catalyst. *Brazil. J. Chem. Eng.* 2017. V. 34. N 3. P. 701-707. DOI: 10.1590/0104-6632.20170343s20160091.
- Baumer J.D., Valerio A., Guelli Ulson de Souza S.M., Erzinger G.S., Furigo Jr A., Ulson de Souza A.A. Toxicity of enzymatically decolorized textile dyes solution by horseradish peroxidase. *J. Hazard. Mater.* 2018. V. 360. P. 82-88. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2018.07.102.
- Bilal M., Iqbal H., Shah S. Z.H., Hu H., Wang W., Zhang X. Horseradish peroxidase-assisted approach to decolorize and detoxify dye pollutants in a packed bed bioreactor. *J. Environ. Manag.* 2016. V. 183. P. 836-842. DOI: 10.1016/j.jenvman.2016.09.040.
- Ulson de Souza S., Forgiarini E., Ulson de Souza A. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *J. Hazard. Mater.* 2007. V. 147. N 3. P. 1073-1078. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2007.06.003.

15. **Preethi S., Anumary A., Ashokkumar M.** Probing horseradish peroxidase catalyzed degradation of azo dye from tannery wastewater. *SpringerPlus*. 2013. 2. P. 341. DOI: 10.1186/2193-1801-2-341.
16. **Gholami-Borujeni F., Mahvi A.H., Nasser S.** Enzymatic Treatment and Detoxification of Acid Orange 7 from Textile Wastewater. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2011. V. 165. P. 1274-1284. DOI: 10.1007/s12010-011-9345-5.
17. **Sekuljica N.Z., Prlainovic N.Z., Jakovetic S.M., Grbavcic S.Z., Ognjanovic N.D., Knezevic-Jugovic Z.D., Mijin D.Z.** Removal of Anthraquinone Dye by Cross-Linked Enzyme Aggregates From Fresh Horseradish Extract. *Clean: Soil, Air, Water*. 2016. V. 44. P. 1-10. DOI: 10.1002/clen.201500766.
18. **Terres J., Battisti R., Andreus J., Cesar de Jesus P.** Decolorization and degradation of Indigo Carmine dye from aqueous solution catalyzed by horseradish peroxidase. *Bio-catal. Biotransform.* 2014. V. 32. N 1. P. 64-73. DOI: 10.3109/10242422.2013.873416.
19. **Ferreira-Leitao V.S, da Silva J.G., Bon E.P.** Methylene blue and azure B oxidation by horseradish peroxidase: a comparative evaluation of class II and class III peroxidases. *Appl. Catal. B*. 2003. V. 42. P. 213-221. DOI: 10.1016/S0926-3373(02)00238-2.
20. **Yamaguchi M., Sato S.** Spectrometric assay for horseradish peroxidase activity based on the linkage of conjugated system formed by oxidative decarboxylation. *Spectrochim. Acta. Part A*. 2017. 174. P. 189-194. DOI: 10.1016/j.saa.2016.11.012.

*Поступила в редакцию 25.05.2020
Принята к опубликованию 28.10.2020*

*Received 25.05.2020
Accepted 28.10.2020*