

УДК 544.47:542.943:615.322
DOI: 10.33184/bulletin-bsu-2023.1.9

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР В РЕАКЦИИ ДЕСТРУКЦИИ БРОМФЕНОЛОВОГО СИНЕГО

© А. А. Соловьева*, О. Е. Лебедева, Т. Ч. Фам

Белгородский государственный национальный исследовательский университет
Россия, Белгородская область, 308015 г. Белгород, ул. Победы, 85.

Тел.: (4722) 30 11 68.

*Email: solovyeva@bsu.edu.ru

*В данной работе проведена окислительная деструкция красителя бромфенолового синего при $t=24$ °С, $pH=4.01$ в присутствии пероксида водорода и пероксидазы, содержащейся в корнеплодах редьки черной (*Raphanus sativus* 'Niger') и редьки зеленой (*Raphanus*), без предварительного ее выделения. При начальном содержании красителя 25.1 мкМ и концентрации пероксида водорода 0.4 мМ в присутствии отходов корнеплодов редьки черной или зеленой удается достигнуть степени удаления красителя 88 и 50% соответственно. Рассчитаны параметры ферментативной реакции методом линеаризации в координатах Лайнуивера-Берка уравнения Михаэлиса-Ментен. Показано повышение степени удаления бромфенолового синего с ростом величины ионной силы от 0.05 до 0.45 М.*

Ключевые слова: пероксидаза хрена, бромфеноловый синий, ионная сила раствора, ферментативное окисление.

Введение

Ферментативное окисление красителей, содержащихся в сточных водах различных производств, с использованием растительных пероксидаз привлекает значительное внимание в научном мире из-за явных своих преимуществ: высокая специфичность, эффективность и экологичность [1–5]. В настоящее время корни хрена служат основным источником коммерчески доступной пероксидазы. Так, в работах [6–7] подробно изучена деструкция органических красителей пероксидом водорода с участием коммерческой пероксидазы хрена. Однако стоит учитывать, что стоимость коммерческой пероксидазы относительно высокая, т.к. процессы выделения и очистки требуют дополнительных затрат [8]. Использование для различных биотехнологических, биомедицинских и других различных целей новых объектов растительного происхождения, содержащих пероксидазу с повышенной стабильностью, рассматривается в работах [9–10]. В работе [11] проводилась экстракция растительной пероксидазы из различных овощных культур (репа (*Brassica rapa*), капуста цветная (*Brassica oleracea* var. *Botrytis*), капуста (*Brassica oleracea* var. *Capitata*), кабачки (*Cucurbita pepo*), картофель сладкий (*Ipomea batatas*), редис красный (*Raphanus sativus*), картофель (*Solanum tuberosum*)) для сравнительной оценки активности пероксидазы этих овощей. Авторы показали, что самая высокая активность пероксидазы наблюдается у репы (*Brassica rapa*). Экстракт пероксидазы репы использовали в реакции обесцвечивания азокрасителя Конго Красный. В оптимизированных авторами условиях 90% красителя разлагалось в течение первых 2 мин реакции, а полное разрушение красителя достигалось примерно через 16 мин. Также хорошо изучены пероксидазы из других источников, например, пероксидаза из табака (ТОР) [12],

пероксидазу из сладкого картофеля (SPP) использовали в качестве биосенсора [13], пероксидаза из стеблей брокколи [14], пероксидаза из краснокочанной капусты [15].

В перечисленных работах используется коммерческий препарат пероксидазы либо пероксидаза, выделенная из различных частей растений путем экстрагирования. Не встречаются публикации, в которых для ферментативной деструкции органических веществ применяются непосредственно части растений, без стадии выделения из них пероксидазы.

Целью настоящей работы являлась оценка потенциала отходов корнеплодов редьки черной и редьки зеленой как источников пероксидазы в реакции деструкции органического красителя бромфенолового синего в присутствии пероксида водорода, а также изучение влияния ионной силы раствора на эффективность удаления красителя.

Экспериментальная часть

В работе в качестве источника пероксидазы применяли кожуру корнеплодов редьки черной (*Raphanus sativus* 'Niger'), и редьки зеленой (*Raphanus*). В качестве модельного красителя использовали бромфеноловый синий (БФС, регистрационный номер CAS 115-39-9) квалификации «ч.д.а.». Необходимое значение ионной силы создавали путем добавления нужных количеств хлорида калия КСl квалификации «ч.д.а.».

Деструкцию красителя осуществляли при температуре 24 °С и $pH=4.01$ (фталатный буферный раствор). В водный раствор объемом 25 мл БФС с концентрацией 25.1 мкМ помещали 0.5 г кожуры корнеплодов одного из овощей. Реакцию инициировали добавлением 0.1 мл 0.1 М раствора пероксида водорода. После перемешивания регистрировали спектры поглощения в интервале длин волн 350–700 нм с использованием спектрофотометра Specord Analytik Jena 200 plus.

Эффективность удаления красителя определяли по формуле $\% = \frac{D_0 - D_t}{D_0} \cdot 100\% = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \cdot 100\%$.

Для определения кинетических характеристик ферментативной реакции концентрацию бромфенолового синего в растворе варьировали от 10.2 до 53.2 мкМ при постоянных значениях остальных параметров реакции: концентрация пероксида водорода, масса растительных отходов, pH, температура. В максимуме поглощения $\lambda = 592$ нм определяли оптическую плотность раствора, при этом $\varepsilon_{592} = 3.4 \cdot 10^4$ л/моль·см, $l = 1$ см составляли.

Результаты и их обсуждение

При использовании пероксида водорода без растительных материалов снижение интенсивности поглощения раствора БФС в течение двух часов составило не более 1%. При проведении реакции в присутствии только растительных материалов, при этом кожуру корнеплодов редьки черной или редьки зеленой помещали непосредственно в раствор красителя, через 2 ч процесса степень удаления БФС составила 1%. Что свидетельствует о незначительной величине адсорбции красителя на поверхности кожур овощей.

Как показано на рис. 1 и 2, в присутствии пероксида водорода и фермента, содержащегося в кожуре корнеплодов черной редьки и зеленой редьки, наблюдается значительное снижение интенсивности поглощения при длине волны 592 нм, что свидетельствует о деструктивном разрушении бромфенолового синего в водном растворе.

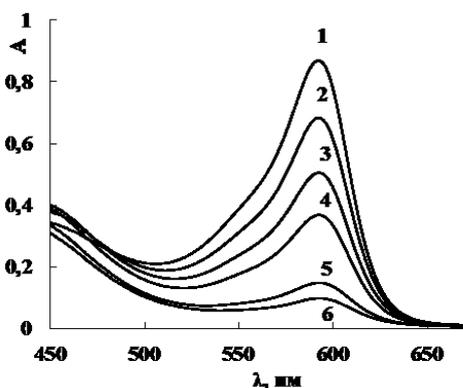


Рис. 1. Спектры поглощения раствора БФС 25.1 мкМ при окислительной деструкции в присутствии отходов редьки черной, $m(\text{отходов}) = 0.5$ г, $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 0.4$ мМ, $t = 24$ °С, $\text{pH} = 4.01$ за различное время реакции: 1 – исходный; 2 – 1 мин; 3 – 5 мин; 4 – 10 мин; 5 – 30 мин; 6 – 60 мин.

Рис. 1–2 показывают, что фермент, содержащийся в кожуре корнеплодов овощей, в сочетании с пероксидом водорода катализирует удаление красителя БФС в водном растворе с различной эффективностью. При использовании кожуры редьки черной в течение часа удается достигнуть удаления 88% красителя из раствора. А с применением отходов зеленой редьки степень деструкции составляла 50% за сутки.

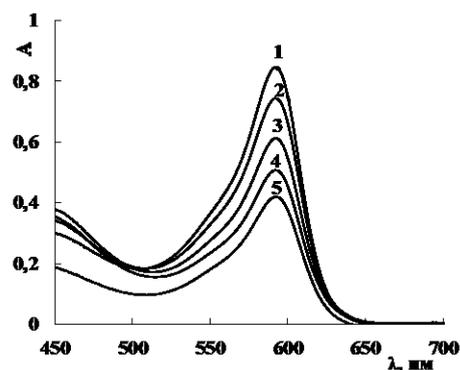


Рис. 2. Спектры поглощения раствора БФС 25.1 мкМ при окислительной деструкции в присутствии отходов редьки зеленой, $m(\text{отходов}) = 0.5$ г, $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 0.4$ мМ, $t = 24$ °С, $\text{pH} = 4.01$ за различное время реакции: 1 – исходный; 2 – 1 мин; 3 – 60 мин; 4 – 1 ч; 5 – 24 ч.

Для расчетов количественных характеристик ферментативной реакции использовали зависимость начальной скорости реакции от концентрации БФС, полученную при фиксированных значениях концентрации пероксида водорода, массы отходов растительного сырья, значения pH и комнатной температуре. Что позволило определить максимальную скорость и константы Михаэлиса методом линеаризации уравнения Михаэлиса-Ментен в координатах Лайнуивера-Берка. При использовании отходов редьки черной для удаления красителя БФС из водного раствора константа Михаэлиса и максимальная скорость составляют 0.380 мМ и 0.068 мМ·мин⁻¹ соответственно. В случае применения отходов редьки зеленой эти величины уменьшаются до 0.040 мМ и 0.001 мМ·мин⁻¹, что свидетельствует о наибольшей активности пероксидазы, содержащейся в кожуре корнеплода редьки черной в сравнении с редькой зеленой. Однако наблюдаемое различие может быть следствием различного содержания пероксидазы в данных овощах.

Так как от присутствия посторонних ионов в растворе может зависеть ионизация функциональных групп в молекуле белка фермента, соответственно ионная сила раствора может оказывать влияние на активность фермента в процессах деструктивного удаления красителя, идущих с его участием. В работе было изучено влияние ионной силы на кинетику реакции удаления органического красителя из водного раствора, протекающую с участием растительной пероксидазы, источником которой являлись отходы корнеплодов зеленой редьки или черной редьки. Рис. 3–5 показывают влияние ионной силы раствора на скорость деструктивного превращения БФС.

Эффективность удаления красителя бромфенолового синего из раствора в присутствии кожуры корнеплодов зеленой редьки возрастает с увеличением ионной силы от 0.05 до 0.45 М. Дальнейшее увеличение ионной силы незначительно влияет на эффективность удаления красителя. Такая же закономерность характерна и для реакции, катализируемой пероксидазой, содержащейся в кожуре корнеплодов черной редьки (рис. 5).

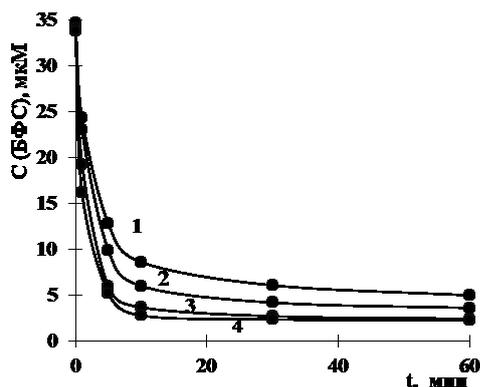


Рис. 3. Кинетические кривые деструкции БФС 35.2 мкМ в присутствии редьки зеленой, $C(H_2O_2) = 0.4$ мМ, $m(\text{отходов}) = 0.5$ г, $pH = 4.01$, $t = 24^\circ C$ при различных значениях ионной силы: 1 – 0.05; 2 – 0.15; 3 – 0.25; 4 – 0.65 М.

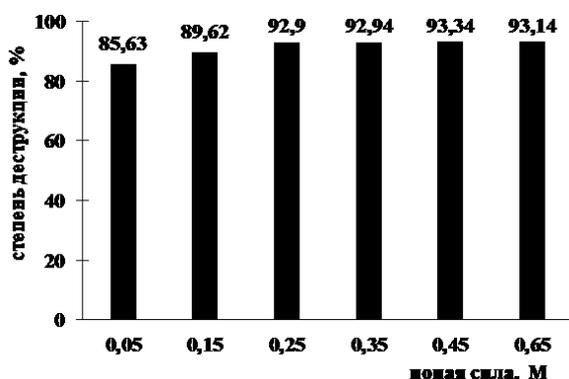


Рис. 4. Влияние ионной силы на степень удаления БФС 35.2 мкМ в присутствии зеленой редьки в течение 60 мин: $m(\text{отходов}) = 0.5$ г, $C(H_2O_2) = 0.4$ мМ, $pH = 4.01$, $t = 24^\circ C$.

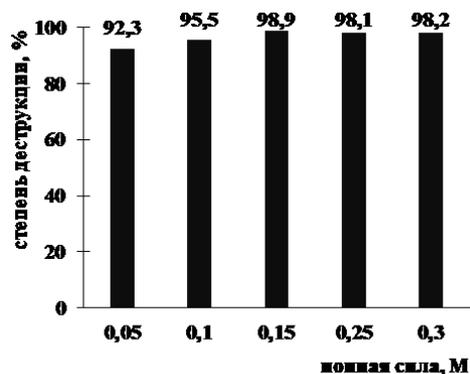


Рис. 5. Влияние ионной силы на степень удаления БФС 35.2 мкМ в присутствии черной редьки в течение 60 мин: $m(\text{отходов}) = 0.5$ г, $C(H_2O_2) = 0.4$ мМ, $pH = 4.01$, $t = 24^\circ C$.

В данной работе показано, что отходы корнеплодов некоторых овощных культур содержат пероксидазу в достаточном количестве для процесса удаления из водных растворов органических красителей с высокой эффективностью и могут быть использованы для очистки воды. При этом ферментный комплекс не выделяется, остается в составе рас-

тительных объектов, а процессы окислительной деструкции красителя подчиняются закономерностям ферментативных реакций.

Выводы

Была изучена возможность использования пероксидаз, содержащихся в растительных отходах, в ферментативной реакции удаления бромфенолового синего. Причем окислительная деструкция протекает с достаточно высокой эффективностью, при использовании кожуры редьки черной степень деструкции составляет более 88%, что может стать альтернативой биодegradации.

Были определены кинетические параметры изучаемой ферментативной реакции. Показано, что ионная сила раствора оказывает влияние на ферментативные реакции удаления БФС из сточных вод. С ростом значения ионной силы (от 0.05 до 0.45 М) эффективность удаления бромфенолового синего увеличивается от 85.6 до 93.3% с использованием пероксидазы из кожуры зеленой редьки.

ЛИТЕРАТУРА

- 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. Vol. 54. No. 2. Pp. 647–664.
- Singh R. L., Singh P. K., Singh R. P. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes – A review // *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 2015. Vol. 104. Pp. 21–31.
- Imran M., Crowley D. E., Khalid A. Microbial biotechnology for decolorization of textile wastewaters // *Environ. Sci. Biotechnol.* 2015. Vol. 14. Pp. 73–92.
- Baumer J. D., Valerio A., Guelli Ulson de Souza S. M., Erzinger G. S., Furigo Jr A., Ulsonde Souza A. A. Toxicity of enzymatically decolored textile dyes solution by horseradish peroxidase // *J. Hazard. Mater.* 2018. Vol. 360. Pp. 82–88.
- 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. Vol. 44. Pp. 1–10.
- Terres J., Battisti R., Andreus J., Cesar de Jesus P. Decolorization and degradation of Indigo Carmine dye from aqueous solution catalyzed by horseradish peroxidase // *Biocatal. Biotransform.* 2014. Vol. 32. No. 1. Pp. 64–73.
- 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. Vol. 34. No. 3. Pp. 701–707.
- Вяткина О. В. Проблемы выделения и очистки растительных пероксидаз // *Ученые записки Крымского фед. ун-та им. В. И. Вернадского. Биология. Химия.* 2012. Т. 25(64). №3. С. 271–276.
- Bania I., Mahanta R. Evaluation of peroxidases from various plant sources // *International Journal of Scientific and Research Publications.* 2012. Vol. 2. No. 5. Pp. 1–5.
- Khaled E. El-Gayar, Mahmoud A. Ibrahim, Zainab Z. Ali, Shima H. Mohamed. Peroxidase enzyme extraction from turnip (*Brassica napus*) roots and application in Glucose diagnostic kit // *Conference: A new vision of the role of basic sciences in development: April 16–18, 2012.* URL: <https://www.researchgate.net/publication/323585495>

11. Ahmedi A. et al. Enzymatic degradation of Congo Red by turnip (*Brassica rapa*) peroxidase // *Zeitschrift für Naturforschung*. 2012. Vol. 67. No. 7–8. Pp. 429–436.
12. Poloznikov A. A., Zakharova G. S., Chubar T. A., Tishkov V. I., Gazaryan I. G. Site-directed mutagenesis of tobacco anionic peroxidase: effect of additional aromatic acids on stability and activity // *Biochimie*. 2015. Vol. 115. No. 1. Pp. 71–77.
13. Gaspar S. et al. Biosensors based on novel plant peroxidases: a comparative study // *Electrochimica acta*. 2000. Vol. 46. No. 2–3. Pp. 255–264.
14. Thongsook T., Barrett D. M. Purification and partial characterization of broccoli (*Brassica oleracea* Var. *Italica*) peroxidases // *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005. Vol. 53. No. 8. Pp. 3206–3214.
15. Somtürk B., Kalın R., Özdemir N. Purification of Peroxidase from Red Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*) by Affinity Chromatography // *Applied biochemistry and biotechnology*. 2014. Vol. 173. No. 7. Pp. 1815–1828.

Поступила в редакцию 22.03.2022 г.

STUDY OF THE ACTIVITY OF VEGETABLE PEROXIDASE IN REACTION OF DESTRUCTION OF BROMOPHENOL BLUE

© A. A. Solovyeva*, O. E. Lebedeva, T. T. Pham

*Belgorod State National Research Institute
85 Pobedy Street, 308015 Belgorod, Russia.*

Phone: +7 (4722) 30 11 68.

**Email: solovyeva@bsu.edu.ru*

In this study, oxidative degradation of bromophenol blue dye was carried out at $t = 24\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $\text{pH} = 4.01$ in the presence of hydrogen peroxide and peroxidase contained in roots of black radish (*Raphanus sativus* “Niger”) and green radish (*Raphanus*) without its extraction. With an initial dye content of $25.1\text{ }\mu\text{M}$ and a hydrogen peroxide concentration of 0.4 mM in the presence of black or green radish root crop waste, it is possible to achieve the degree of dye removal by 88% and 50%, respectively. The kinetic parameters of the enzymatic reaction were determined by linearizing Michaelis-Menten equation in Lineweaver-Burk coordinates. It was found that for the oxidative reaction of destruction of bromophenol blue when using black radish waste, the Michaelis constant and maximum rate are 0.380 mM and $0.068\text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$, respectively. When using green radish waste, these values decrease to 0.040 mM and $0.001\text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$. This indicates that peroxidase in the peel of black radish root crop has the greatest activity in comparison with green radish. The effect of the ionic strength of the solution created by the addition of potassium chloride on the dye removal reaction in the presence of peroxidase is shown. The removal efficiency of bromophenol blue increases to 93.3% with an increase in the ionic strength from 0.05 to 0.45 M. Enzymatic oxidative degradation can be considered as an alternative to biodegradation.

Keywords: horseradish peroxidase, enzymatic oxidation, bromophenol blue, ionic strength of the solution.

Published in Russian. Do not hesitate to contact us at bulletin_bsu@mail.ru if you need translation of the article.

1. Routoula E., Patwardhan S. V. *Environ. Sci. Technol.* 2020. Vol. 54. No. 2. Pp. 647–664.
2. Singh R. L., Singh P. K., Singh R. P. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 2015. Vol. 104. Pp. 21–31.
3. Imran M., Crowley D. E., Khalid A. *Environ. Sci. Biotechnol.* 2015. Vol. 14. Pp. 73–92.
4. Baumer J. D., Valerio A. J. *Hazard. Mater.* 2018. Vol. 360. Pp. 82–88.
5. Sekuljica N. Z., Prlainovic N. Z., Jakovetic S. M., Grbavcic S. Z., Ognjanovic N. D. *Clean: Soil, Air, Water.* 2016. Vol. 44. Pp. 1–10.
6. Terres J., Battisti R., Andreass J. *Biocatal. Biotransform.* 2014. Vol. 32. No. 1. Pp. 64–73.
7. Farias S., de Oliveira D. *Brazil. J. Chem. Eng.* 2017. Vol. 34. No. 3. Pp. 701–707.
8. Vyatkina O. V. *Uchenye zapiski Krymskogo fed. un-ta im. V. I Vernadskogo. Biologiya. Khimiya.* 2012. Vol. 25(64). No. 3. Pp. 271–276.
9. Bania I., Mahanta R. *International Journal of Scientific and Research Publications.* 2012. Vol. 2. No. 5. Pp. 1–5.
10. Khaled E. *Conference: A new vision of the role of basic sciences in development: April 16–18, 2012.* URL: <https://www.researchgate.net/publication/323585495>
11. Ahmedi A. et al. *Enzymatic degradation of Congo Red by turnip (Brassica rapa) peroxidase. Zeitschrift für Naturforschung.* 2012. Vol. 67. No. 7–8. Pp. 429–436.
12. Poloznikov A. A., Zakharova G. S., Chubar T. A., Tishkov V. I., Gazaryan I. G. *Biochimie.* 2015. Vol. 115. No. 1. Pp. 71–77.
13. Gaspar S. *Biosensors based on novel plant peroxidases: a comparative study. Electrochimica acta.* 2000. Vol. 46. No. 2–3. Pp. 255–264.
14. Thongsook T., Barrett D. M. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2005. Vol. 53. No. 8. Pp. 3206–3214.
15. Somtürk B., Kalın R., Özdemir N. *Applied biochemistry and biotechnology.* 2014. Vol. 173. No. 7. Pp. 1815–1828.

Received 22.03.2022.