

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(Н И У « Б е л Г У »)

ИНСТИТУТ ФАРМАЦИИ, ХИМИИ И БИОЛОГИИ
КАФЕДРА ОБЩЕЙ ХИМИИ

**ДЕСТРУКЦИЯ НЕКОТОРЫХ ЭКОПОЛЛЮТАНТОВ С УЧАСТИЕМ
ФЕРМЕНТОВ**

Выпускная квалификационная работа
обучающегося по направлению подготовки 04.03.01 Химия
очной формы обучения, группы 11001518
Фам Тхи Чинь

Научный руководитель
д.х.н., профессор
Лебедева О.Е.

Консультант
к.х.н., доцент
Соловьева А.А.

БЕЛГОРОД 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	6
1.1 Общая характеристика ферментов	6
1.2 Строение и свойства пероксидазы	8
1.2.1 Классификация пероксидаз	9
1.2.2 Общая характеристика пероксидазы хрена	10
1.3 Ферментативные методы деструкции экополлютантов	11
1.4 Механизм катализа ферментов из класса растительных пероксидаз..	14
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	16
2.1 Исходные вещества	16
2.2 Оборудование.....	17
2.3 Методика эксперимента.....	17
2.3.1 Определение пероксидазной активности ферментов, содержащихся в корнях хрена, без выделения ферментов из растительного сырья.....	17
2.3.2 Окислительная деструкция бромфенолового синего пероксидом водорода в присутствии пероксидазы	19
2.3.3 Влияние концентрации пероксида водорода на обесцвечивание раствора бромфенолового синего в пероксидазной реакции	19
2.3.4 Влияние температуры на обесцвечивание раствора бромфенолового синего в пероксидазной реакции	20
2.3.5 Окислительная деструкция раствора бромфенолового синего в реакции, катализируемой пероксидазным экстрактом из хрена.....	20
2.3.6 Применение ферментного препарата ОРК-5 на основе оксизина в реакции деструкции раствора индигокармина	21
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ	23
3.1 Определение активности пероксидазы, содержащейся в корнях хрена	23
3.2 Окислительная деструкция бромфенолового синего пероксидом водорода в присутствии пероксидазы.....	25
3.2.1 Влияние концентрации пероксида водорода на обесцвечивание раствора бромфенолового синего в пероксидазной реакции	32

3.2.2	Влияние температуры на обесцвечивание раствора бромфенолового синего в пероксидазной реакции	34
3.3	Окислительная деструкция раствора бромфенолового синего в реакции, катализируемой пероксидазным экстрактом из хрена.....	35
3.4	Применение ферментного препарата ОРК-5 на основе оксизина в реакции деструкции раствора индигокармина.....	37
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	42
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	44

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время проблема охраны окружающей среды является первоочередной задачей, поскольку ее загрязнение оказывает существенное негативное влияние на здоровье человека. Сточные воды текстильной промышленности являются одними из наиболее загрязнённых. При попадании в окружающую среду без очистки они могут вызвать серьезные проблемы, снижая прозрачность природной воды и, как следствие, препятствуя проникновению солнечной радиации и уменьшая процесс фотосинтеза. В связи с этим, деструкция красителей сточных вод стала одной из серьезных проблем. Были изучены различные методы удаления красителей, такие как адсорбция, осаждение, окисление, коагуляция-флокуляция, химическое разложение и фотодеградация. Все эти методы, хотя и осуществимые и имеющие различные возможности деструкции, страдают серьезными недостатками, такими как высокая стоимость, неполнота очистки, образование опасных побочных продуктов или низкая эффективность, следовательно, альтернативные методы весьма актуальны.

Многие авторы концентрируют свое внимание на энзиматической обработке синтетических красителей. Растительные пероксидазы, такие как пероксидаза-NRP хрена, также заслуживают внимания для применения в природоохранных технологиях. Этот фермент хорошо известен своей эффективной способностью окислять широкий спектр ароматических соединений, а также некоторых важных промышленных красителей [1, 2]. Данная работа предлагает решение для экологической проблемы – окислительная деструкция некоторых органических красителей с участием пероксида водорода и ферментов, в том числе пероксидазы хрена.

Целью настоящей работы являлось изучение окислительной деструкции органических красителей с использованием пероксида водорода и ферментов.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- Определить пероксидазную активность ферментов, содержащихся в корнях хрена, без выделения ферментов из растительного сырья;
- Провести окислительные реакции деструкции бромфенолового синего пероксидом водорода с участием ферментного препарата пероксидазы хрена и определить кинетические параметры ферментативных реакций;
- Исследовать влияние температуры и концентрации субстрата – окислителя (пероксида водорода) на ферментативные реакции;
- Исследовать возможность использования экстракта из корней хрена для обесцвечивания бромфенолового синего в водных растворах;
- Применить реагент ОРК-5 на основе оксизина для окислительной деструкции некоторых органических красителей (метиленового синего, 2,6-динитрофенола и индигокармина).

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Общая характеристика ферментов

Ферменты являются биокатализаторами на основе белков, которые повышают скорость химических реакций, требуемых для жизнедеятельности живых организмов [3]. Ферменты – это глобулярные белки. Они ускоряют химические реакции, но не могут влиять на равновесие ускоряемых ими реакций, при этом процессе они не изменяются и не входят в состав конечных продуктов реакции. Согласно сопоставлению с другими катализаторами большое преимущество ферментов заключается в том, что они имеют очень высокую специфичность, селективность к определенным субстратам и способность тонко регулировать активность под действием активаторов и ингибиторов [4]. Специфика большинства ферментов в настоящее время достаточно глубоко изучена. Фермент отбирает и присоединяет только свой субстрат, т.е. один фермент каталитически ускоряет обычно только одну реакцию. И очень малое количество фермента может вызывать превращение больших количеств субстрата, на который он воздействует [5].

В ферментативных реакциях с ростом температуры может наступить разрушение фермента. Поэтому при кипении ферменты перестают работать и после охлаждения их свойства не восстанавливаются. При температурах ниже нуля они не проявляют никакой активности, но не погибают [5].

Энергия, которой молекула должна обладать чтобы вступить в реакцию, называется энергией активации. Чем выше энергия активации, тем ниже скорость реакции при данной температуре. Ферменты действуют как катализаторы. При взаимодействии с субстратом они образуют промежуточное состояние и тем самым изменяют путь реакции. На новом пути энергия активации, требуемая для того, чтобы реакция произошла,

значительно ниже. Следовательно, увеличивается общая скорость реакции [6].

В настоящее время существует Международная классификация ферментов [6, 7]. В соответствии с этим, все ферменты включены в «Каталог ферментов» с четырехзначным кодовым номером (КФ). Первая цифра КФ определяет, что фермент принадлежит к одному из шести основных классов. В зависимости от типа субстрата в каждом классе ферменты делятся на подклассы (вторая цифра КФ). А третья цифра КФ указывает подподклассы. Четвертая цифра представляет собой номер порядка фермента в данном подподклассе.

В зависимости от типа катализируемой реакции ферменты разделяются на шесть классов как показано в таблице 1.1 [6, 7].

Таблица 1.1.
Классификация ферментов

Класс	Важнейшие подклассы	Тип реакции
оксидоредуктазы	редуктаза, пероксидаза, оксидаза	окислительно- восстановительные
трансферазы	C ₁ -трансфераза, фосфотрансфераза	перенос химических групп с одного субстрата на другой
гидролазы	эстераза, амидаза, пептидаза, фосфатаза	гидролиз химических связей
лиазы	C-O лиаза, C-C лиаза, C-N лиаза	расщепление (образование) соединений по двойным связям
изомеразы	эпимераза, цис- транс-изомераза	перемещение групп в пределах молекулы
лигазы	C-O лигаза, C-N лигаза, C-C лигаза	катализ энергозависимых реакций присоединения

1.2 Структура и свойства пероксидазы

Пероксидаза (КФ 1.11.1.X) относится к классу окислительно-восстановительных ферментов (оксидоредуктаз) и является одним из наиболее популярных ферментов, найденных в растениях, микроорганизмах и тканях животных. Это гемсодержащие ферменты, которые обладают способностью катализировать реакции окисления неорганических и органических соединений при воздействии перекиси водорода. Молекулярные массы пероксидаз, выделяемых из различных источников, варьируются от 17 до 84 кДа, а число аминокислотных остатков в полипептидной цепочке колеблется от 153 до 753. Большинство белковых глобул обычно образованы α -спиралями, а β -складок либо нет, либо слабы. В молекуле между двумя структурными доменами простетическая группа – гем находится в гидрофобном кармане в большинстве случаев [8] (рис. 1.1).

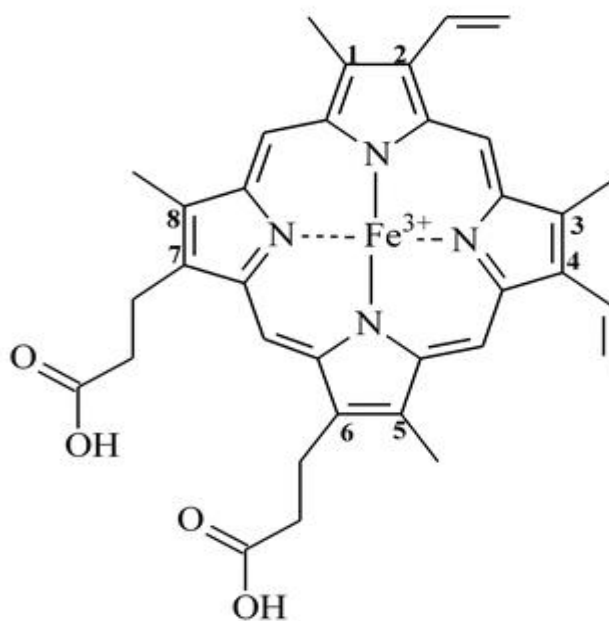


Рис. 1.1. Структура активного центра пероксидаз

1.2.1 Классификация пероксидаз

Исходя из гомологии аминокислотных последовательностей и биологического происхождения, пероксидазы (К.Ф.1.11.1.Х, где Х определен природой биологического восстановителя) делятся на три класса [9].

К первому классу относят микробные пероксидазы, каталазы – пероксидазы (КФ 1.11.1.6), аскорбатпероксидазы (КФ 1.11.1.11) и цитохром С пероксидазы (КФ 1.11.1.5).

Класс II содержит грибные пероксидазы. Лигнинпероксидаза (LiP) и марганец-пероксидаза (MnP) – это два изученных представителя этого класса.

Класс III – это пероксидазы растений, которые выделяются из высших растений (например, пероксидаза хрена (HRP), редьки, табака и сои и др.). Два последних класса пероксидазы представляют собой мономерные гликопротеиды. Они гликозилированы и содержат 2 кальций-связывающих центра и 4 дисульфидные связи на молекулу фермента, однако их расположение несколько отличаются друг от друга [10].

Из вышеуказанных растительных пероксидаз – пероксидаза из хрена (HRP – horseradish peroxidase) является наиболее изученной. Этот фермент широко используется в практике. Он относительно дешев, доступен и обладает довольно высокой стабильностью. Его стабильность обсуждалась многими авторами и варьируется в зависимости от температуры и pH. HRP имеет относительно небольшой размер молекулы, что является важным параметром при получении иммуноконъюгатов для иммуногистохимического и иммуноцитохимического окрашивания [11]. Одним из основных применений пероксидаз является использование при создании различных биосенсоров, маркеров для гистологических исследований, в генной терапии, органическом и полимерном синтезе. В частности, HRP хорошо известен своей эффективной способностью окислять

органические соединения, а также для очистки сточных вод от некоторых важных промышленных красителей [12, 13].

1.2.2 Общая характеристика пероксидазы хрена

Пероксидаза хрена – это фермент, который содержится в корнях хрена. Он проявляет максимальную активность при $\text{pH} = 4-6$. HRP имеет молекулярную массу примерно 44 кДа [10].

Рентгеноструктурный анализ пероксидазы хрена показал, что в полипептидной цепи содержится 308 аминокислотных остатков [14]. В структуре пероксидазы преобладают α -спирали (13 α -спиралей и 3 β -складки) и содержатся центры связывания кальция в дистальном и проксимальном доменах. Важная роль Ca^{2+} подтверждена многими экспериментальными данными [15]. Ионы кальция играют решающую роль в каталитической активности и стабильности. Удаление ионов Ca^{2+} приводит к значительному изменению природы фермента. Следовательно, снижает каталитическую активность и термостабильность фермента. Данные показали, что активность пероксидазы хрена снижалась на 50-60 % при извлечении иона кальция Ca^{2+} [16, 17]. При полной потере иона Ca^{2+} происходит инактивация фермента во время хранения или при экстремальных значениях pH вследствие серьезных конформационных изменений в активном центре.

В активном центре фермента находится гем – комплекс железа и протопорфирина. Ион Fe^{3+} находится в пятикоординационном состоянии (4 координационные связи внутри гема, пятое координационное положение занимает атом азота имидазольного кольца проксимального остатка). В процессе катализа перекись водорода связывается атомом железа, и комплекс становится шестикоординационным.

1.3 Ферментативные методы деструкции экополлютантов

Экополлютанты (загрязнители) – это химические вещества, содержащиеся в объектах окружающей среды в ненормальных количествах, которые превышают нормативные значения и вызывают химическое загрязнение.

Сточные воды текстильной, пищевой, бумажной, полиграфической, кожевенной и косметической промышленности богаты остатками красителей. Они вызывают загрязнение воды, а также создают серьезную экологическую опасность. Ароматические соединения тоже являются одним из наиболее токсичных загрязнителей. Фенолы и его производные входят в состав продуктов крекинга нефти и горючих сланцев, используются в изготовлении искусственных волокон и пластмасс, для производства новых типов полимерных материалов, синтетических каучуков, поверхностно-активных веществ (ПАВ), пластификаторов, стабилизаторов для нефтепродуктов. Они также применяются с целью синтеза пестицидов, красителей, антиоксидантов для жиров и масел в качестве исходных реагентов [18].

Хлорфенолы образуются в процессе хлорирования фенолсодержащих вод с целью их бактерицидной обработки и превращаются при окислении в диоксины, что являются особо опасными канцерогенами, которые могут накапливаться в пищевой цепи.

После попадания в среду экополлютанты еще длительное время сохраняются в ней. Из-за их токсичности, они должны быть удалены из сточных вод, прежде чем они будут сброшены в окружающую среду.

Некоторые методы широко используются для очистки от экополлютантов, включая физико-химические методы, такие как адсорбция на активированном угле, экстракцию, микробное и химическое окисление, электрохимические методы и облучение. Хотя эти методы эффективны, но они дороги и включают образование концентрированного ила, что создает

проблему вторичной утилизации. В последние годы использование ферментативных методов для обработки сточных вод, содержащих красители и нефтепродукты, вызывает большой интерес. Они являются наиболее подходящими и перспективными из-за их экономической эффективности, способности производить меньше шлама и экологичности [19].

Ферментативный метод был предложен многими исследователями в качестве потенциальной альтернативы обычным методам. Во-первых, ферменты очень селективны и могут эффективно удалить даже разбавленные отходы. Во-вторых, они с меньшей вероятностью будут подавлены веществами, которые могут быть токсичными для живых организмов, и их стоимость, в конечном итоге, может быть меньше, чем у других методов, если коммерчески доступные ферменты производятся в больших количествах. Кроме того, ферменты могут работать в широком диапазоне концентраций субстратов и требовать низкое время удерживания по сравнению с другими методами [12, 21].

В работе [22] была изучена способность микроорганизмов ферментативно окислять нефтяные углеводороды и нефтепродукты. В результате образуют продукты метаболизма, которые изменяют реологические свойства нефти и способствуют ее вытеснению из пласта. Под действием углеводородокисляющей микрофлорой происходит биodeградация углеводородов вязких нефтей месторождений Тамсагбулаг и Цагаан-Элс. Установлено, в течение 14 дней биodeградация сопровождалась изменениями содержания н-алканов. Биологические и триалкилароматические углеводороды подвергаются биологическому разложению, а их содержание уменьшается в 1,4 раза и в 6 раз с течением времени до 21 дня.

В работе [23] были исследованы процессы биодеструкции гумусовых веществ под действием ферментативного окислительного комплекса грибов. Гумусовые вещества представляют собой стойкие органические соединения,

которые трудно разлагаются, склонны к процессам полимеризации. Для исследования в качестве окислительных ферментов были выбраны марганец-пероксидаза из *Phanerochaete chrysosporium* и пероксидаза из *Vjerkandera adusta*.

Из литературных данных [18, 21, 24, 25] видно, что пероксидазы в настоящее время широко применяются в практике, в первую очередь в биоаналитических целях и для очистки сточных вод. В работе [18] были описаны ферментативные методы определения ртути (II) и фенольных соединений в природной воде. По реакции пероксидазного окисления *o*-дианизидина в природной воде ртуть (II) была определена на уровне концентраций 10-50 нг/мл, а концентрации ряда фенольных соединений (2- и 3-аминофенолов, 1-й 2-нафтолов) на уровне 3-100 мкМ (0,3 - 15 мкг/мл) при их индивидуальном и совместном присутствии. Авторы работы [21] описали катализируемое пероксидазой окисление 2,4,6-трихлорфенола с образованием 2,6-дихлор-1,4- бензохинона и удаление фенола и хлорфенола из сточных вод. Удаление фенола и хлорфенола из сточных вод, катализируемых хренопероксидазой, также подробно изучено в статье [25]. Результаты показали, что концентрация фенола и 4-хлорфенола эффективно снижалась в сточных водах, оптимальное значение рН составляло 9,0 в диапазоне испытаний от 5,0 до 9,0.

В работе [26] была изучена кинетика пероксидазной реакции окисления *o*-дианизидина под действием H_2O_2 в присутствии тиолов.

В работе [27] были исследованы условия окислительной деградации бисфенола А пероксидазой хрена (HRP) в сточных водах. Оптимальные рН и температура для окисления БФА, катализируемого HRP, составляли 9,0 и 25 °С соответственно.

1.4 Механизм катализа ферментов из класса растительных пероксидаз

Пероксидаза катализирует реакции окисления различных электронодонорных субстратов с участием перекиси водорода. Наиболее характерными субстратами являются фенолы, индолы, ароматические амины и сульфонаты.

В рис. 1.2 описаны разные состояния активного центра пероксидазы третьего класса. Основное состояние пероксидазы – это ферри-форма. В результате одноэлектронного восстановления образует ферро-состояние. Затем путем связывания с молекулой кислорода образуются Соединение III.

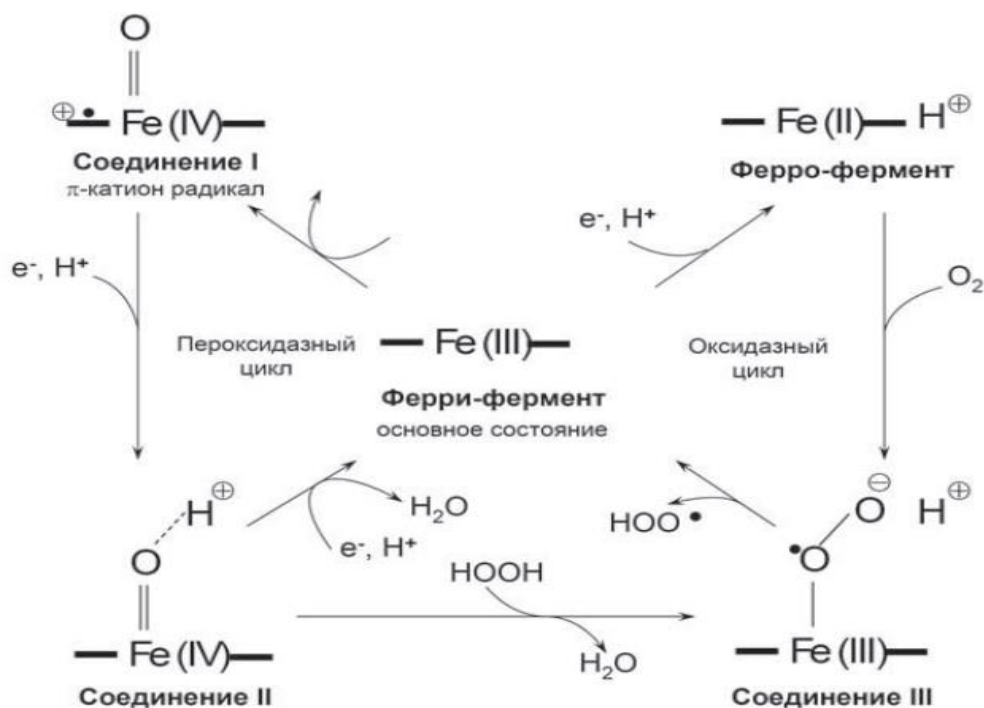


Рис. 1.2. Каталитический цикл гем-содержащих пероксидаз

Согласно литературным данным [28-30], большинство реакций, катализируемых HRP С и другими изоферментами пероксидазы хрена, можно выразить по следующему трехстадийному механизму, который включает образование двух промежуточных соединений.



Соединение I + AN₂ → Соединение II + •АН

Соединение II + AN₂ → HRP + •АН + Н₂О

где AN₂ – электрон-донорный субстрат;

АН• – свободный радикал.

В начале каталитического цикла ферри-фермент окисляется перекисью водорода. Происходит двухэлектронное окисление, в котором один электрон из атома железа и один из порфиринового кольца удаляются из молекулы фермента и образуется промежуточное «Соединение I» с высокой степенью окисления. Это соединение взаимодействует с молекулой субстрата с образованием «Соединения II». Затем происходит еще одно одноэлектронное окисление другой молекулой субстрата, которое возвращает фермент в исходную ферри-форму, что завершает каталитический цикл.

Таким образом, преобразование субстрата происходит согласно механизму пинг-понг (Соединение I взаимодействует с молекулой первого субстрата с образованием Соединения II, которым будет связан вторая молекула субстрата).

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Исходные вещества

В данной работе использовали следующие реактивы без дополнительной очистки:

1. Твердые препараты пероксидазы из корней хрена (HRP) производства «VWR Chemiscals» (США) со спектральным показателем чистоты $RZ = 3.0$.

Раствор фермента готовили растворением навесок твердых препаратов в фосфатном буферном растворе (KH_2PO_4 и Na_2HPO_4 $\text{pH}=6,86$). Концентрацию пероксидазы хрена регистрировали на спектрофотометре, принимая $\epsilon_{403}=9,6 \cdot 10^4$ л/моль·см [31]. Растворы пероксидазы имеют коричневую окраску и характерные полосы поглощения при 403, 498, 548, 583 и 640 нм. Наиболее интенсивная полоса наблюдается при 403 нм (полоса *Sore*) [32]. Растворы пероксидазы различной концентрации готовили непосредственно перед работой разбавлением исходных растворов буферными растворами. Твердый препарат хранили при -10°C , растворы фермента при 4°C .

2. Реагент ОРК-5, содержащий следующие компоненты: оксизин (охузуме), азотная N-база (есозуме) или другой азотосодержащий компонент, перекись водорода, декстроза, диметилсульфоксид (пенетратор).

3. Буферные растворы готовили из фиксаналов.

4. Раствор пероксида водорода «медицинский» 33%.

Растворы с меньшим содержанием пероксида водорода готовили разбавлением дистиллированной водой исходного раствора. Точную концентрацию пероксида водорода определяли заместительным титрованием с применением йодометрического метода. Метод основан на окислении йодида калия в кислой среде пероксидом водорода до йода, который титруется тиосульфатом натрия.

5. Фенол квалификации "ч.д.а", бромфеноловый синий квалификации "ч.д.а", индигокармин марки «ч.д.а», 2,6-динитрофенол квалификации "ч.д.а", метиленовый синий квалификации "ч.д.а".

Растворы данных веществ готовили растворением точных навесок в дистиллированной воде. Точные концентрации бромфенолового синего и индигокармина определяли по градуировочному графику.

Также использовали растительный материал – корни хрена (*Armoracia rusticana*).

2.2 Оборудование

За изменением концентрации веществ в растворах следили спектрофотометрическим методом по изменению интенсивности поглощения. Регистрацию спектров проводили на спектрофотометре UV/Vis Analytik Jena Specord 200 plus.

Измерение pH проводилось на pH-метре Mettler Toledo.

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

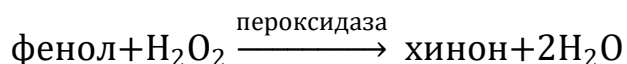
2.3 Методика эксперимента

2.3.1 Определение пероксидазной активности ферментов, содержащихся в корнях хрена, без выделения ферментов из растительного сырья

Работу проводили по следующей методике [33-35]. Навеску корней хрена 0,10321 г растирали пестиком в ступке с небольшим количеством фосфатного буфера, pH=6,86. Количественно переносили растёртую массу в мерную колбу на 25 мл, доводили до метки тем же буфером, хорошо перемешивали и настаивали в течение 15 минут. Затем раствор

отфильтровали. Прозрачный фильтрат (вытяжку) использовали для определения активности фермента.

В качестве субстрата использовали фенол концентрации 2,1 мМ. При пероксидазном окислении фенола образуется окрашенный продукт, и при длине волны 440 нм оптическая плотность раствора увеличивается. Схема реакции:



Для оценки активности пероксидазы хрена в реакции окисления фенола реагенты последовательно добавляли к контрольным и исследуемым образцам в кювете в следующем соотношении:

Исследуемая проба	Контрольная проба
1,5 мл буфера, рН 6,86	2 мл буфера, рН 6,86
0,5 мл вытяжки	0,5 мл фенола
0,5 мл фенола	

После чего запускали реакции отдельно в каждой кювете добавлением 0,5 мл раствора H_2O_2 с концентрацией 0,1 М, включали секундомер и измеряли оптическую плотность раствора при выбранной длине волны в течение 5 минут, каждые 30 с. Каждый тест проводился три раза, среднее арифметическое значений оптической плотности для каждой точки использовалось для расчета.

Пероксидазная активность ($A_{\text{ПО}}$) в исследуемом материале (мкМ/мин·мг) определяется по следующему выражению:

$$A_{\text{ПО}} = \frac{\Delta E'_{440} * N * 60 * 10^6}{m * l * \varepsilon * 10^3},$$

где $\Delta E'_{440}$ – разница скорости увеличения оптической плотности (ед.опт.пл./сек) для опытной и контрольной проб;

$$N – \text{разведение материала, } N = \frac{V_{\text{колбы}}}{V_a}$$

l – толщина кювета, см;

m – масса сырья, г;

ε – коэффициент экстинкции при 440 нм, равный 25500 л/моль·см [34].

2.3.2 Окислительная деструкция бромфенолового синего пероксидом водорода в присутствии пероксидазы

Окислительную деструкцию бромфенолового синего (БФС) проводили в следующих условиях: концентрация пероксидазы – 1,15 нМ, бромфеноловый синий – 17,2-62,9 мкМ, пероксида водорода – 0,04 мМ; рН = 4,0-4,1, калий фталевокислый кислый буферный раствор.

Эксперименты проводились по следующей методике при температуре 30°C. В колбы на 25 мл последовательно вводили разные количества раствора бромфенолового синего (17,2-62,9 мкМ), 1,15 нМ раствора пероксидазы (для проведения контрольного опыта – соответствующий объем буфера). Затем доводили до метки буферным раствором (рН=4,1). После чего добавляли 0,1 мл раствора пероксида водорода концентрации 0,01 М. В момент введения последнего включали секундомер, тщательно перемешивали смесь, в кювету переносили и следили за изменением оптической плотности раствора в течение 10 минут ($l=1$ см, $\lambda=592$ нм). По полученным данным строили кинетические кривые и определяли кинетические параметры ферментативной реакции.

2.3.3 Влияние концентрации пероксида водорода на обесцвечивание раствора бромфенолового синего в пероксидазной реакции

Эксперименты проводили при температуре 23°C. В колбы на 25 мл последовательно вводили 1 мл раствора бромфенолового синего с концентрацией 0,82 мМ, 2,9 нМ раствора пероксидазы хрена. Затем доводили до метки буферным раствором (рН=4,1). В последнюю очередь добавляли 0,1 мл раствора пероксида водорода с концентрациями 0,01, 0,1, 1 или 10 М. Во время добавления последнего включали секундомер, содержимое колбы

тщательно перемешивали и измеряли оптическую плотность раствора в течение 10 мин ($l=1$ см, $\lambda=592$ нм). По полученным данным строили кинетические кривые.

2.3.4 Влияние температуры на обесцвечивание раствора бромфенолового синего в пероксидазной реакции

Эксперименты проводили при температурах 23, 30, 40 и 50°C. В колбы на 25 мл последовательно вводили 1 мл раствора бромфенолового синего концентрацией 0,82 мМ, 2,9 нМ раствора пероксидазы хрена. Затем доводили до метки буферным раствором ($pH=4,1$). В последнюю очередь добавляли 0,1 мл раствора пероксида водорода с концентрацией 0,1 М. В момент введения последнего включали секундомер, реакционную смесь перемешивали, переливали в кювету и снимали спектры в течение 10 мин ($l=1$ см, $A_{\max}=592$ нм). По полученным данным строили кинетические кривые.

2.3.5 Окислительная деструкция раствора бромфенолового синего в реакции, катализируемой пероксидазным экстрактом из хрена

Навеску корней хрена 3,0275 г растирали пестиком в ступке с небольшим количеством буфера, $pH=6,86$. Количественно переносили растёртую массу в мерную колбу на 25 мл, разбавляли до метки тем же буфером, хорошо перемешали и настаивали в течение 15 мин. Затем раствор отфильтровали, прозрачный фильтрат (вытяжку) использовали для экспериментов.

Окислительную деструкцию бромфенолового синего проводили в следующих условиях: 0,1 мл вытяжки (активность, определенная по фенолу, равна 0,59 мкМ/мин·мг), бромфеноловый синий – 32,7 мкМ, пероксида водорода – 0,04 мМ; pH 4,0-4,1, калий фталевокислый кислый буферный раствор.

Эксперименты проводили при температуре 30°C. В колбы на 25 мл последовательно вводили раствор бромфенолового синего 32,7 мкМ, 0,1 мл вытяжки. Затем довели до метки буферным раствором (рН=4,1). Инициировали реакцию добавлением 0,1 мл раствора пероксида водорода 0,01 М. В момент внесения последнего включали секундомер, смеси перемешивали, переносили в кювету и снимали спектры раствора в течение 10 мин ($l=1$ см, $\lambda=592$ нм). По полученным данным строили кинетические кривые.

2.3.6 Применение ферментного препарата ОРК-5 на основе оксизина в реакции деструкции раствора индигокармина

Исходный ферментный препарат ОРК-5 на основе оксизина разбавили в 100 раз и хранили при 4 °С для следующих экспериментов.

Для оценки возможности реагента ОРК-5 для обесцвечивания водных растворов красителей в качестве субстратов применяли растворы индигокармина, 2,6-динитрофенола 0,25 мМ и метиленового синего 0,025 мМ.

Эксперименты проводили по следующей методике при температуре 23°C. В колбы на 25 мл последовательно вводили разные количества раствора индигокармина (0,012-0,093 мМ) (2,6-динитрофенола 0,25 мМ или метиленового синего 0,025 мМ), 2,5 мл раствора разбавленного фермента (1:100 разбавление) (для контрольного опыта – соответствующий объем буфера). Потом довели до метки буферным раствором (рН=4,1). Реакцию инициировали 2,5 мл раствора пероксида водорода 0,1 М. Во время введения последнего включали секундомер, тщательно перемешивали содержимое, переливали в кювету и снимали спектры раствора в течение 75 мин ($l=1$ см, $A_{\max}=611$ нм). По полученным данным строили кинетические кривые и определяли кинетические параметры ферментативной реакции.

Начальные скорости ферментативных реакций окисления фенола, бромфенолового синего, индигокармина определяются по тангенсу угла наклона касательной к началу кинетической кривой.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Определение активности пероксидазы, содержащейся в корнях хрена

Большинство ферментативных реакций являются обратимыми, поэтому рекомендуется определять каталитическую активность ферментов в течение короткого промежутка времени по начальной скорости реакции, поскольку с увеличением времени инициируется обратная реакция. В результате вносится ошибка в определении активности фермента. Поэтому пероксидазное окисление фенола проводили в течение 5 минут.

Для определения пероксидазной активности строили графики изменения оптической плотности при 440 нм во времени для контрольной и исследуемой проб (рис. 3.1).

Для каждого полученного графика на линейном участке вычисляли скорость изменения оптической плотности.

В опытной пробе:

$$\Delta E_{440} = \frac{0,17477 - 0,04767}{240} = 5,3 \cdot 10^{-4} \text{ ед.опт.пл./сек.}$$

В контрольной пробе:

$$\Delta E_{440} = \frac{0,0015 - 0,0004}{90} = 1,2 \cdot 10^{-5} \text{ ед.опт.пл./сек.}$$

Пероксидазная активность ($A_{\text{ПО}}$) в корнях хрена (в мкМ/мин·мг сырья) определяется следующим образом:

$$A_{\text{ПО}} = \frac{\Delta E_{440} \cdot N \cdot 60 \cdot 10^6}{m \cdot l \cdot \epsilon \cdot 10^3} = \frac{(5,3 \cdot 10^{-4} - 1,2 \cdot 10^{-5}) \cdot \frac{25}{0,5} \cdot 60 \cdot 10^3}{0,10321 \cdot 1 \cdot 25500}$$

$$= 0,59 \text{ мкМ/мин} \cdot \text{мг}$$

Единица ферментативной активности равна количеству корней хрена в мг, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в 1 мин.

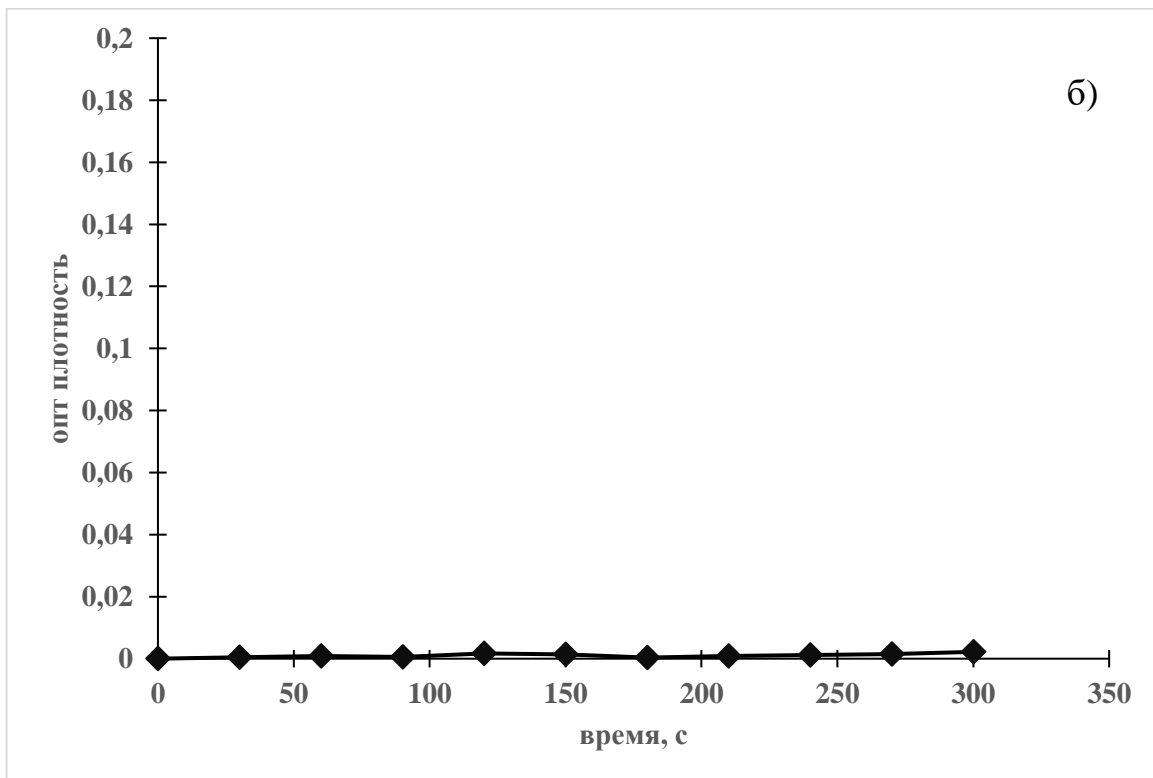
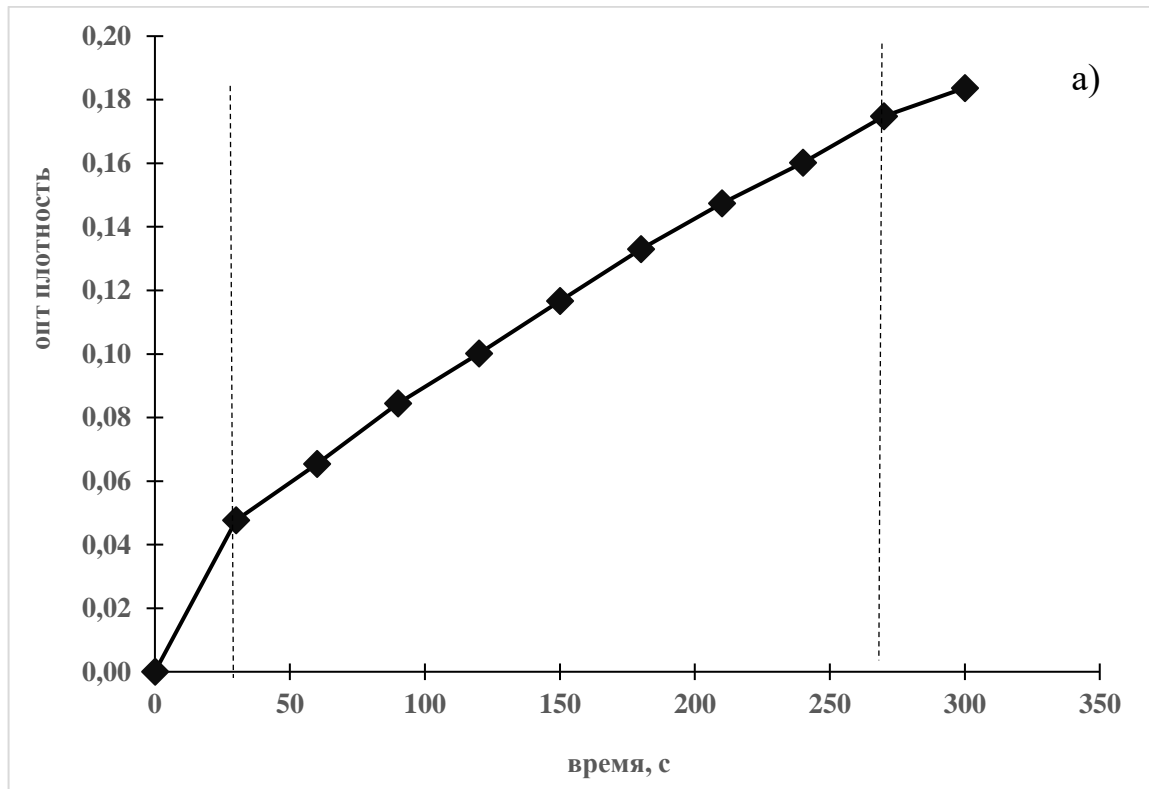


Рис. 3.1. Графики зависимости оптической плотности в опытной (а) и контрольной (б) пробах (отмечен линейный участок)

На практике определение пероксидазной активности широко используется в физиологических и патологических процессах. Пероксидаза из хрена широко применяется в качестве аналитического реагента при клинических и биохимических исследованиях. Следовательно, для контроля качества ферментного препарата необходим метод измерения активности фермента.

3.2 Окислительная деструкция бромфенолового синего пероксидом водорода в присутствии пероксидазы

Эксперименты по деструкции раствора бромфенолового синего проводили при температуре 30°C в присутствии фермента HRP. Обесцвечивание контролировали путем регистрации уменьшения полосы поглощения бромфенолового синего при 592 нм, как показано на рис. 3.2. Из рисунка видно, что фермент HRP с H_2O_2 катализирует обесцвечивание красителя в растворе. В течение первых 10 минут более 89% раствора обесцветилось. При использовании только H_2O_2 или HRP не наблюдалось особенного снижения поглощения (не более 2%), что подтверждает необходимость сочетания пероксидазы и H_2O_2 для обесцвечивания раствора и возможной дегградации красителя.

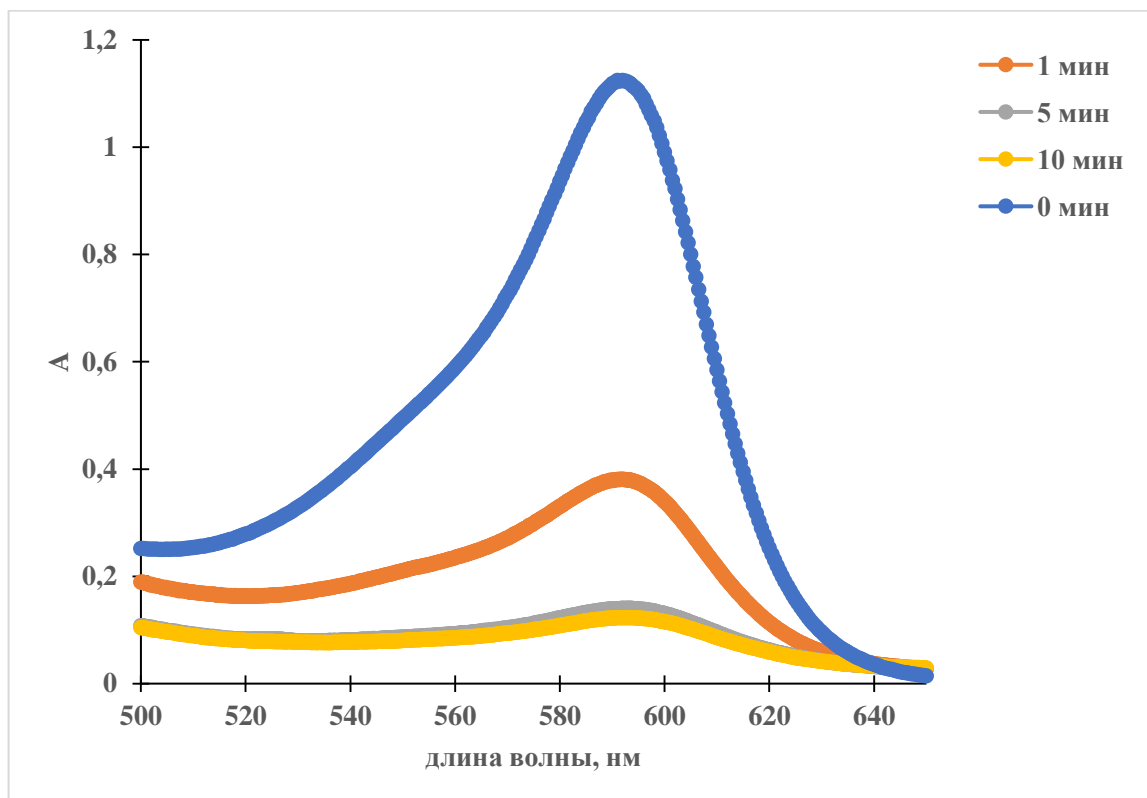


Рис. 3.2. Спектры поглощения раствора бромфенолового синего при окислительной деструкции в присутствии пероксидазы и перекиси водорода при 30°C ($C(\text{БФС})=32,9 \text{ мкМ}$, $C(\text{HRP})=1,15 \text{ нМ}$, $C(\text{H}_2\text{O}_2)=0,04 \text{ мМ}$, $\text{pH}=4,1$)

Начальные скорости деградации красителя определяли при различных концентрациях красителя, но при фиксированной концентрации раствора H_2O_2 , пероксидазы и значении pH. Кинетические кривые представлены на рис. 3.3.

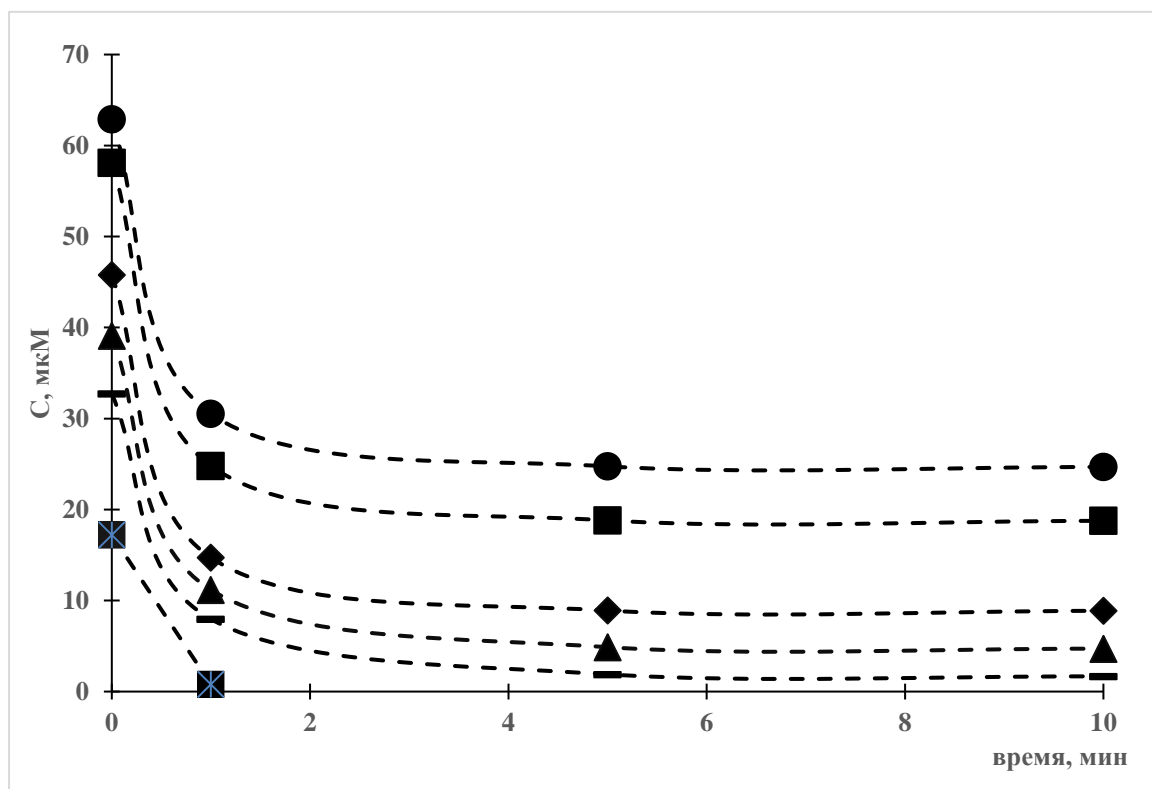


Рис. 3.3. Кинетические кривые окисления бромфенолового синего в присутствии пероксидазы и пероксида водорода ($C(\text{HRP}) = 1,15 \text{ нМ}$, $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,04 \text{ мМ}$, $\text{pH} = 4,1$, $t = 30^\circ\text{C}$) с различным содержанием субстрата: (●) – 62,9 мкМ, (■) – 58,1 мкМ, (◆) – 45,8 мкМ, (▲) – 39,1 мкМ, (-) – 32,7 мкМ (*) – 17,2 мкМ

Анализ кинетических кривых и данных в табл. 3.1 показывает, что в течение 10 минут при малых содержаниях красителя степень деструкции достигает 100%. Из данных табл. 3.1 видно, что 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 V_{max} . Для определения максимальной скорости и константы Михаэлиса изучаемой ферментативной реакции была построена зависимость начальной скорости реакции от концентрации субстрата (рис. 3.4).

Таблица 3.1.

Некоторые кинетические характеристики деструкции бромфенолового синего в присутствии пероксидазы (1,15 нМ) и H_2O_2 (0,04 мМ)

конц БФС, мкМ	начальная скорость, мкМ/мин	% деструкции (10 мин.)
17,22	16,45	100,0
32,72	24,76	94,9
39,08	27,91	88,0
45,79	31,07	80,6
58,11	33,32	67,7
62,86	32,35	60,7

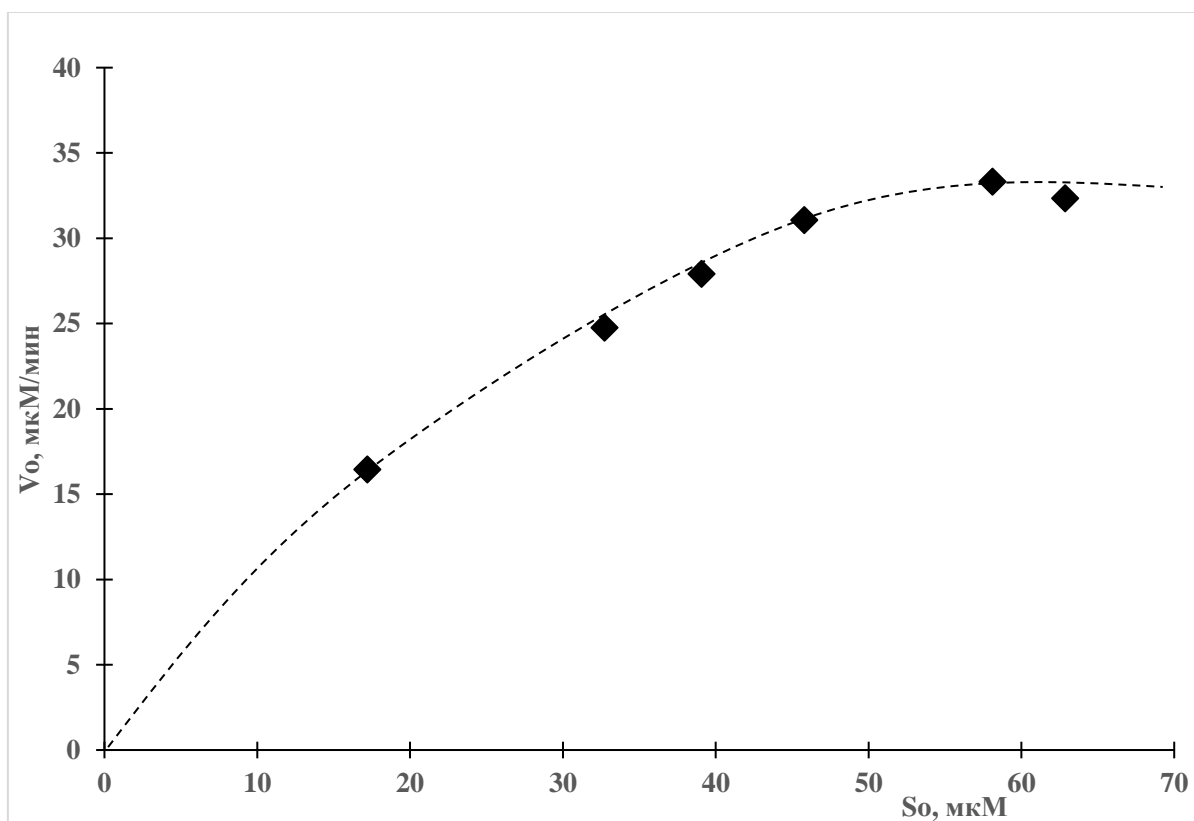


Рис. 3.4. Зависимость начальной скорости реакции окисления бромфенолового синего от концентрации при температуре 30°C: $C(\text{HRP})=1,15$ нМ, $C(\text{H}_2\text{O}_2)=0,04$ мМ, $\text{pH}=4,1$

Часто в эксперименте бывает трудно добиться насыщения субстрата (и даже если это достигается, сложно определить параметры по кривым насыщения), поэтому построение такого графика эмпирически не применяется для определения значения V_{\max} и K_M .

Параметры ферментативных реакций обычно определяются одним из трёх методов, основанных на линейаризации уравнения Михаэлиса-Ментен в координатах Лайнуивера-Берка, Вульфа-Хэйенса или Иди-Хофсти (см. рис. 3.5-3.7) [36].

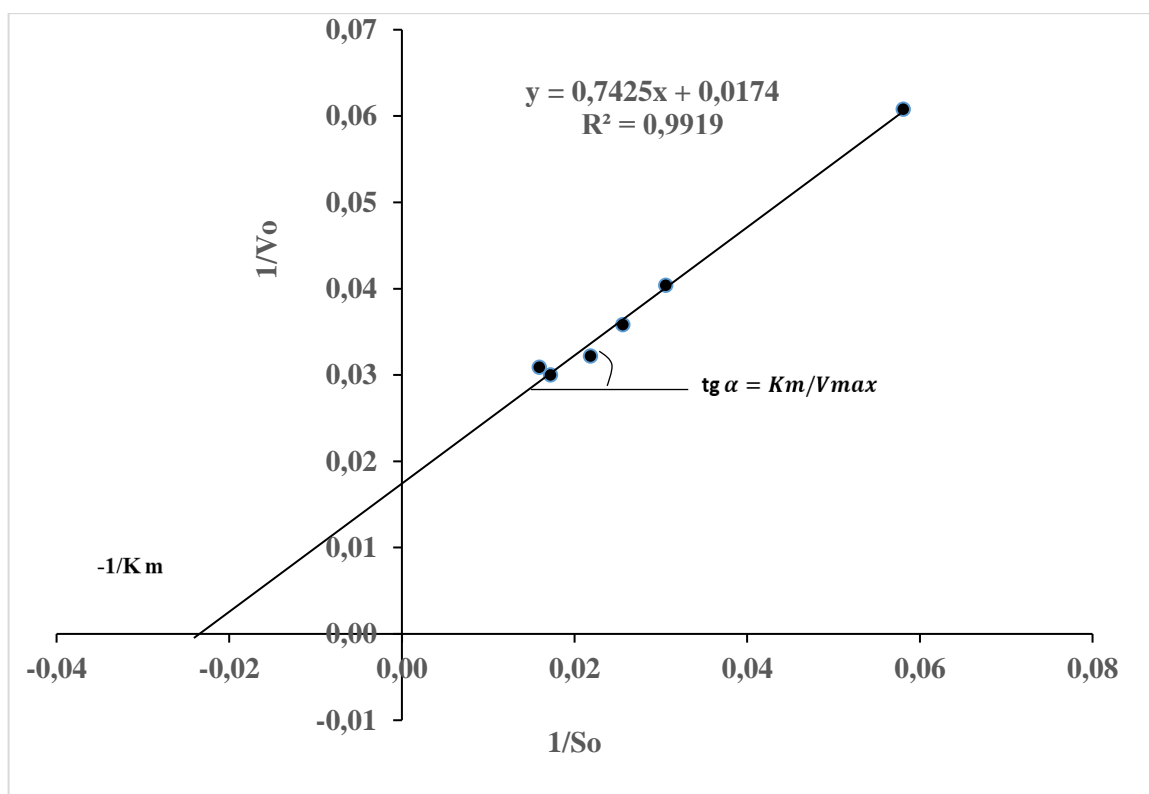
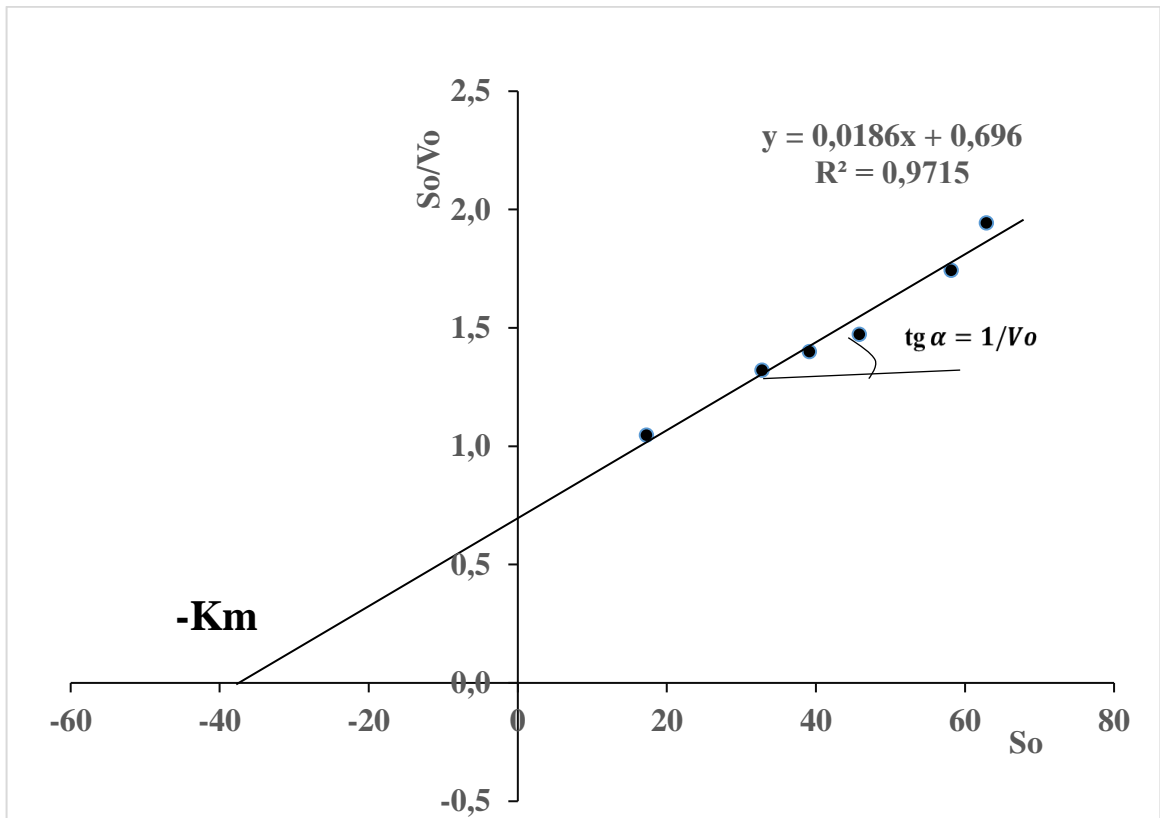
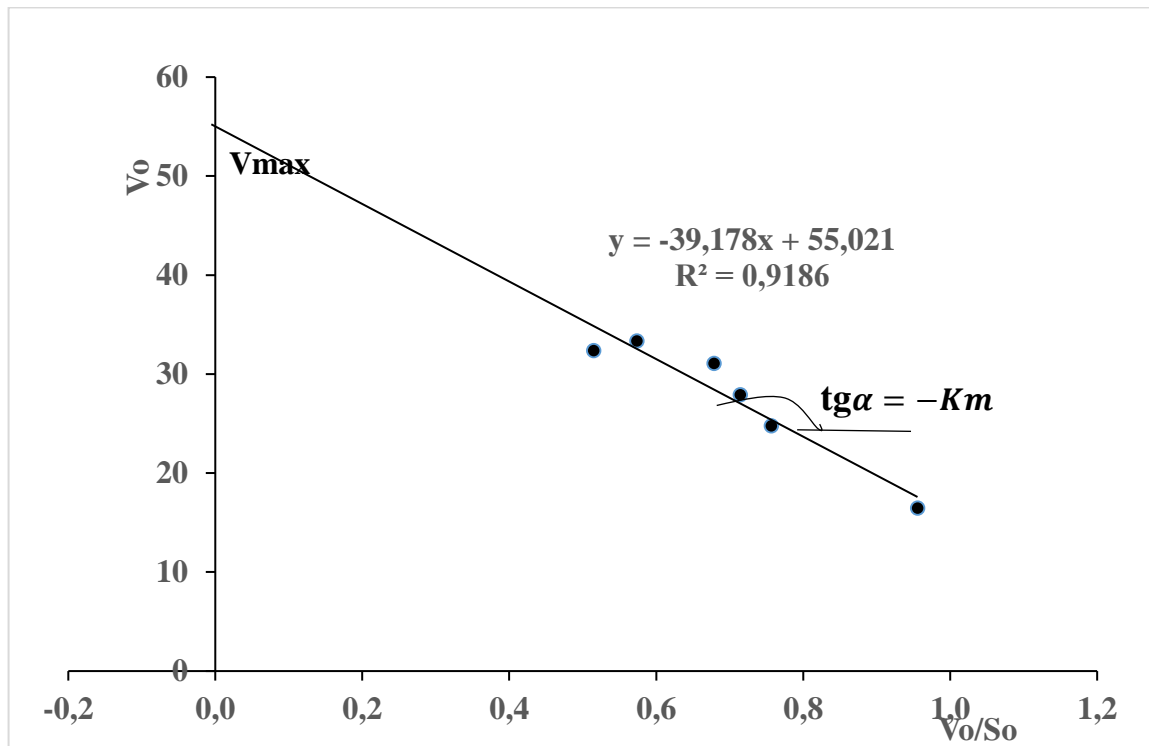


Рис. 3.5. Графическое определение K_M и V_{\max} в координатах Лайнуивера-Берка

Рис. 3.6. Графическое определение K_M и V_{\max} в координатах Вульфа-ХэйсаРис. 3.7. Графическое определение K_M и V_{\max} в координатах Иди-Хофсти

Значения эффективных констант Михаэлиса и максимальных скоростей реакций, полученных тремя различными методами, приведены в табл. 3.2.

Таблица 3.2.

Значения эффективных константы Михаэлиса и максимальной скорости реакции

Кинетический параметр	Способ обработки экспериментальных данных		
	Координат Лайнуивера–Берка	Координат Вульфа–Хэйенса	Координат Иди–Хофсти
K_m , эфф, мкМ	42,7	37,4	39,2
V_{max} , эфф, мкМ*мин ⁻¹	57,5	53,8	55,02
Коэффициент корреляции R^2	0,9919	0,9715	0,9186

На основании сравнения коэффициентов корреляции R^2 видно, что координаты Лайнуивера–Берка являются наиболее успешными для определения параметров уравнения Михаэлиса-Ментена. Было найдено, что для окислительной реакции деструкции бромфенолового синего при температуре 30 °С и рН= 4,1 константа Михаэлиса и максимальная скорость составляют 42,7 мкМ и 57,5 мкМ·мин⁻¹, соответственно.

3.2.1 Влияние концентрации пероксида водорода на обесцвечивание раствора бромфенолового синего в пероксидазной реакции

Для изучения влияния содержания H_2O_2 на степень обесцвечивания растворов бромфенолового синего варьировали концентрацию пероксида водорода от 0,04 до 40 мМ при 23° С. На рисунке 3.8 показаны кинетические кривые деструкции бромфенолового синего при различном содержании пероксида водорода.

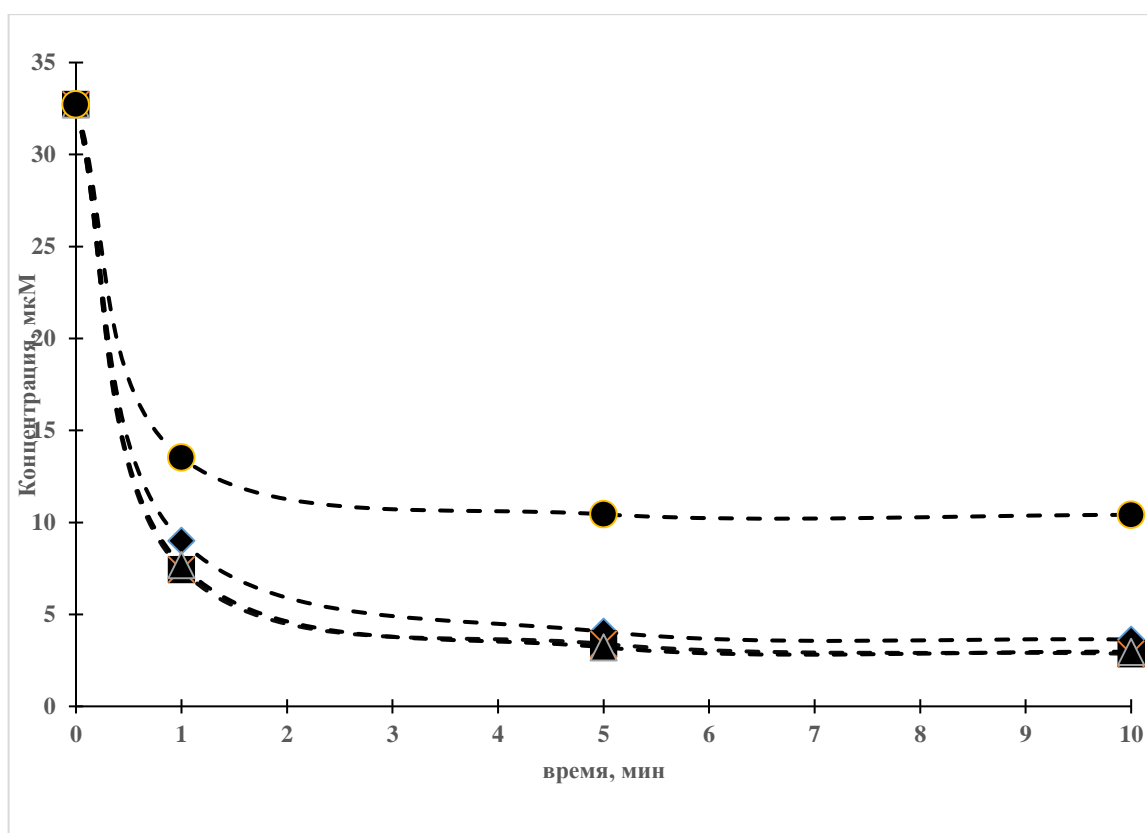


Рис. 3.8. Кинетические кривые окисления бромфенолового синего в присутствии пероксидазы ($C(\text{БФС}) = 32,7 \text{ мкМ}$, $C(\text{HRP}) = 2,9 \text{ нМ}$) при различном содержании H_2O_2 , $t=23^\circ\text{C}$: (◆) – 0,04, (■) – 0,4, (▲) – 4 и (●) – 40 мМ

Видно, что при содержании пероксида водорода 0,04, 0,4 и 4 мМ удается достигнуть обесцвечивания раствора красителя на 89% и 91% соответственно в течение 10 мин (рис. 3.9). С повышением концентрации

H_2O_2 степень деструкции уменьшается и составляет 68%. Можно сделать вывод, что H_2O_2 может оказывать токсическое действие на пероксидазу в высоких концентрациях, вызывая частичную инактивацию. Избыток H_2O_2 может вызвать торможение (деактивацию) каталитического процесса. Также была показана необходимость присутствия H_2O_2 в каталитическом процессе пероксидазы и то, что ферменту требуется минимум H_2O_2 , чтобы активировать себя.

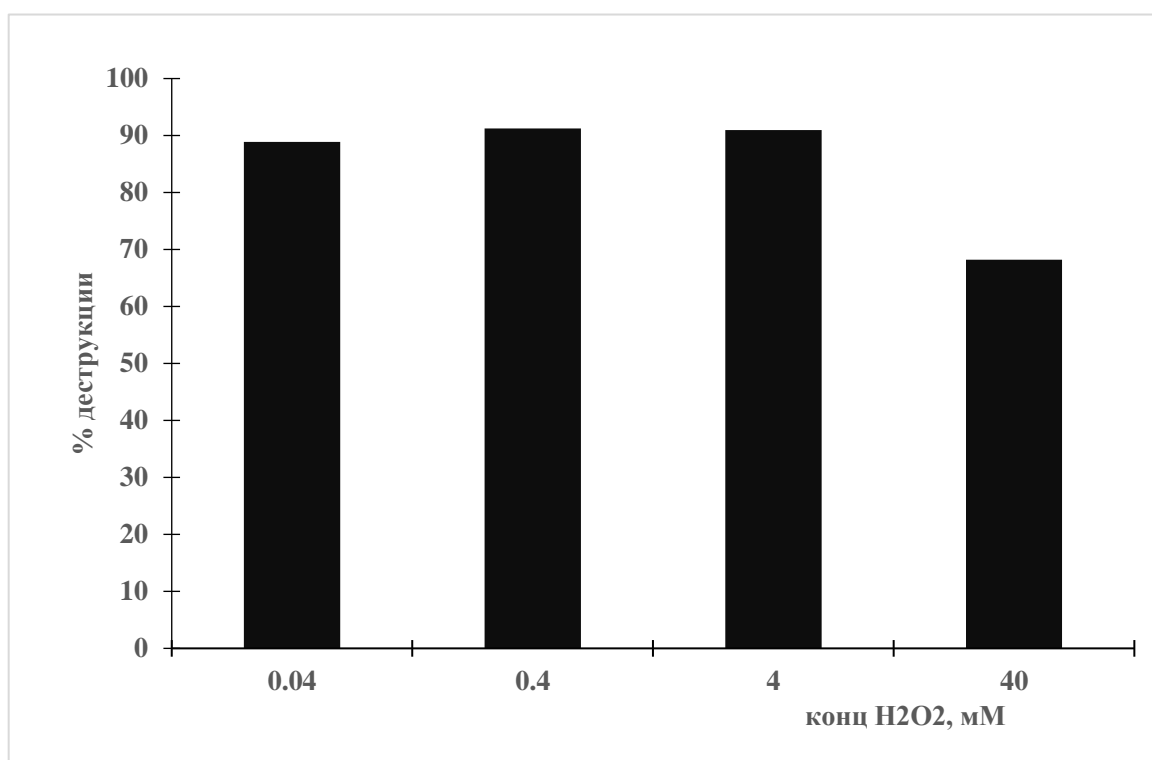


Рис. 3.9. Влияние концентрации пероксида водорода на степень деструкции растворов бромфенолового синего при 23°C

3.2.2 Влияние температуры на обесцвечивание раствора бромфенолового синего в пероксидазной реакции

Известно, что на скорость ферментативных реакций сильно оказывает влияние температурный фактор. Важно определить оптимальную температуру изучаемой реакции с участием фермента. Для этого деструкцию бромфенолового синего проводили при различных температурах (рис. 3.10 и 3.11.).

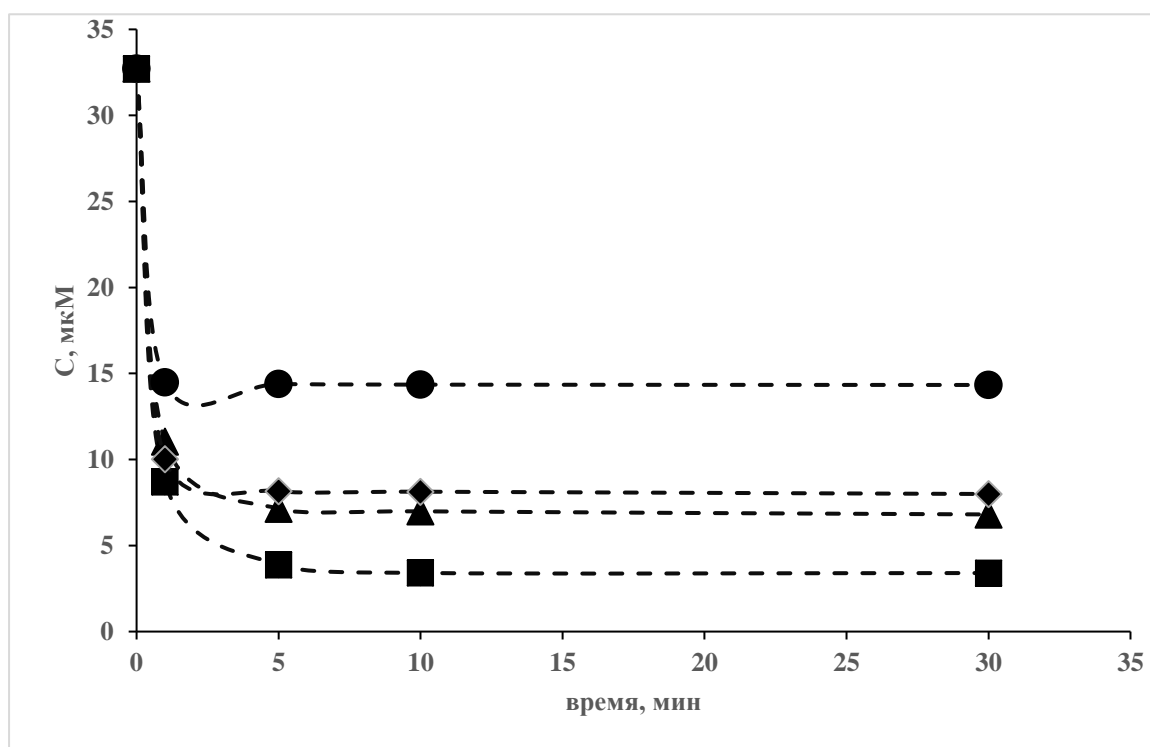


Рис. 3.10. Кинетические кривые обесцвечивания растворов БФС $C(\text{БФС})=32,7\text{ мкМ}$, $C(\text{HRP})=2,9\text{ нМ}$, $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,4\text{ мМ}$ при различных температурах: (■) - 23°C, (▲) - 30 °C, (◆) - 40°C и (●) - 50°C

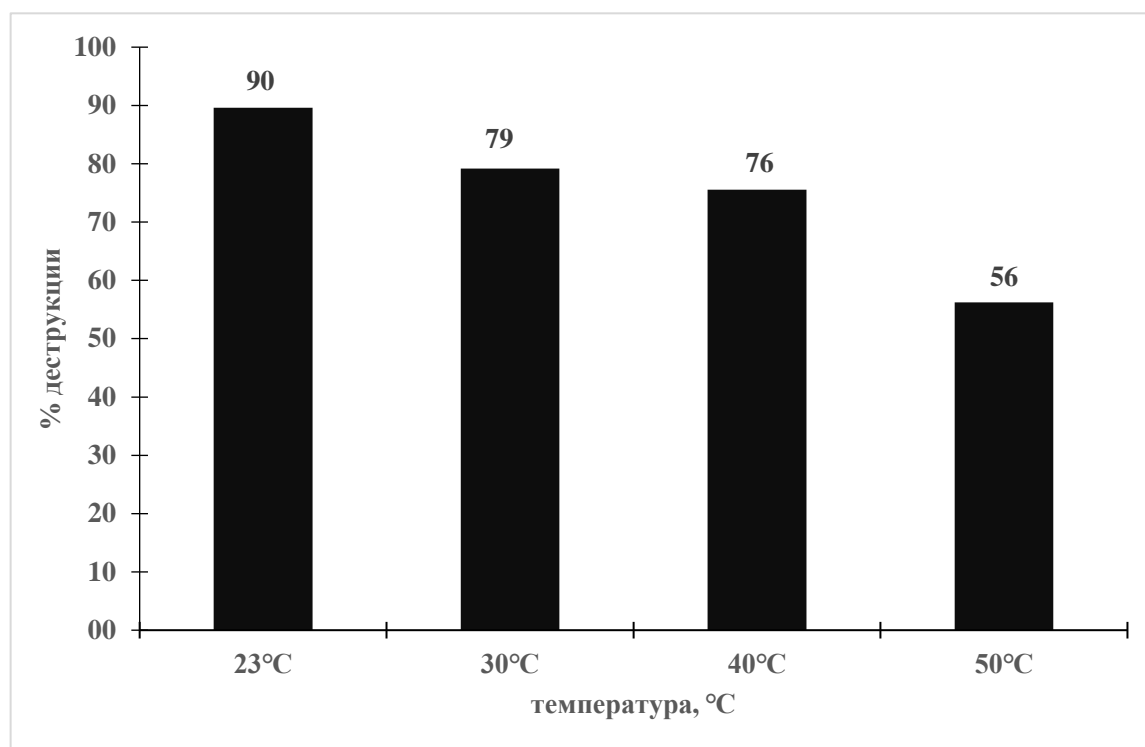


Рис. 3.11. Влияние температуры на степень обесцвечивания бромфенолового синего

Из полученных экспериментальных данных видно, что максимум каталитической активности пероксидазы в реакции окисления бромфенолового синего пероксидом водорода наблюдается при температуре 23°C, степень деструкции достигает 90%. При повышении температуры фермент начинает терять свою активность и при температуре 50°C степень обесцвечивания составляет всего 56%. Видимо, при повышении температуры активные центры фермента разрушаются, образование ферментно-субстратного комплекса затруднено, и скорость ферментативной реакции уменьшается.

3.3 Окислительная деструкция раствора бромфенолового синего в реакции, катализируемой пероксидазным экстрактом из хрена

Дальнейшая работа была направлена на изучение возможности использования пероксидазы, выделенной из корней хрена, в реакции обесцвечивания бромфенолового синего. Эксперименты проводили при

температуре 30 °С и рН = 4,1 в течение 30 минут и результаты показаны на рис. 3.12 и 3.13.

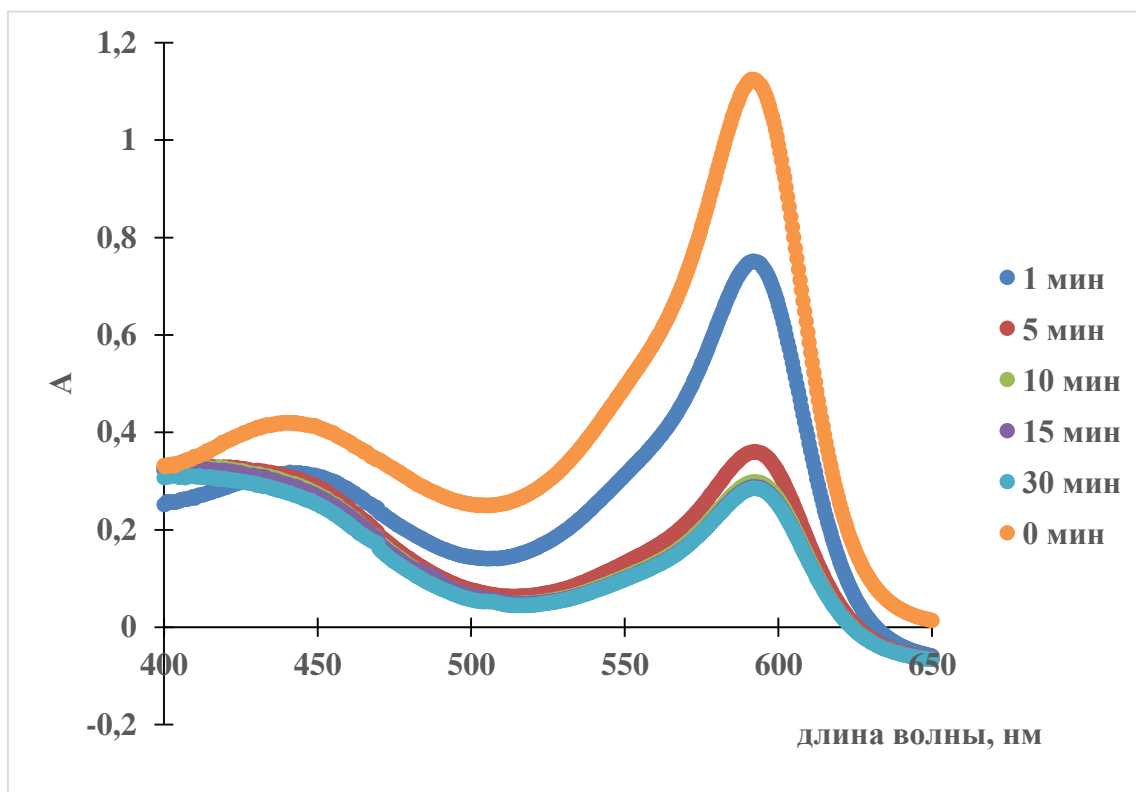


Рис. 3.12. Спектры поглощения раствора бромфенолового синего при окислительной деструкции пероксидазным экстрактом из хрена при температуре 30 °С: С(БФС)=32,7мкМ, С(H₂O₂) = 0,4 мМ, рН=4,1

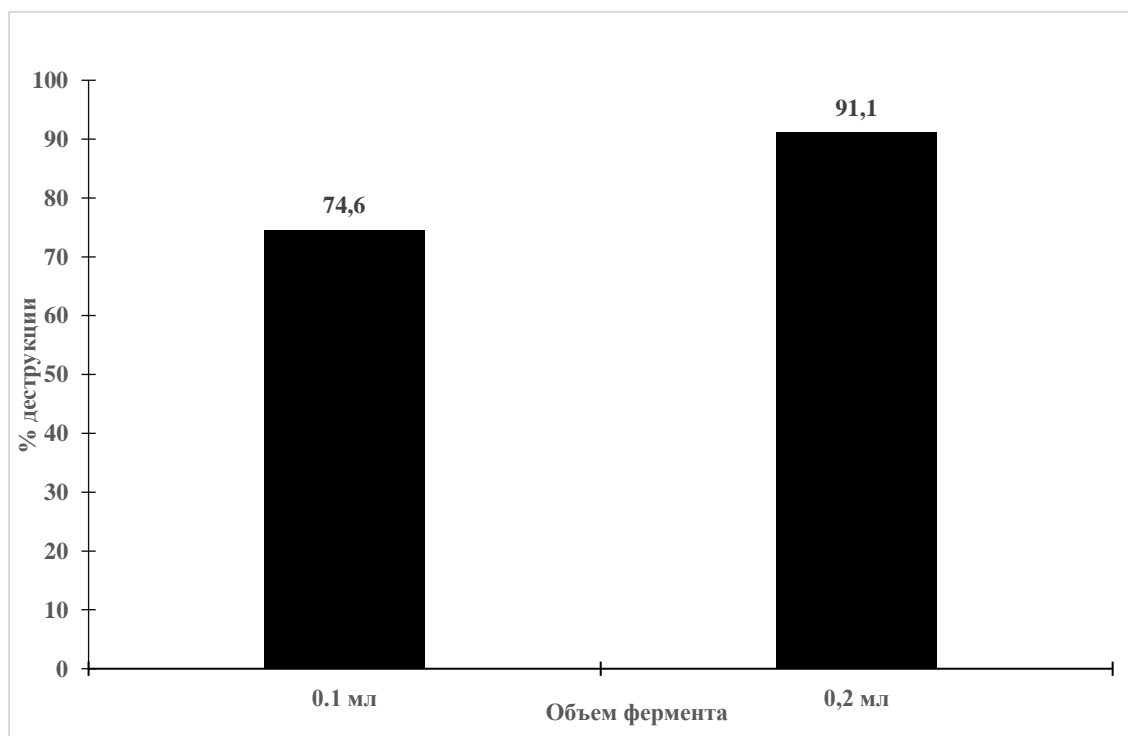


Рис. 3.13. Степень деструкции раствора бромфенолового синего через 30 мин

С ростом объема вытяжки до 0,2 мл степень деструкции увеличивается до >91%.

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.

3.4 Применение ферментного препарата ОРК-5 на основе оксизина в реакции деструкции раствора индигокармина

Ферментный препарат ОРК-5 на основе оксизина представляет собой сложную органическую композицию, используемую для ускорения разрушения органических отходов и увеличения глубины их переработки. В данной работе препарат ОРК-5 применяли для деструкции водных растворов красителей: индигокармина 0,056 мМ, 2,6-динитрофенола 0,25 мМ и метиленового синего 0,025 мМ. Эксперименты проводили при температурах 21°C и 35°C, pH = 4,1. Полученные результаты приведены в таблице 3.3.

Таблица 3.3.

Степень деструкции некоторых органических веществ в присутствии реагента ОРК-5 (1:100 разбавление), $C(H_2O_2) = 0,01$ М, время 75 минут

Субстрат, концентрация	t=21 °C	t=35 °C
2,6-динитрофенол 0,25 мМ	0	0
Метиленовый синий 0,025 мМ	0	0
Индиго кармин 0,058 мМ	60 % в течение 75 мин	100 % в течение 45 мин

Из данных таблицы 3.3 видно, что препарат ОРК-5 активен в реакции окислительной деструкции лишь для индигокармина. Остальные органические вещества оказались устойчивы к действию фермента.

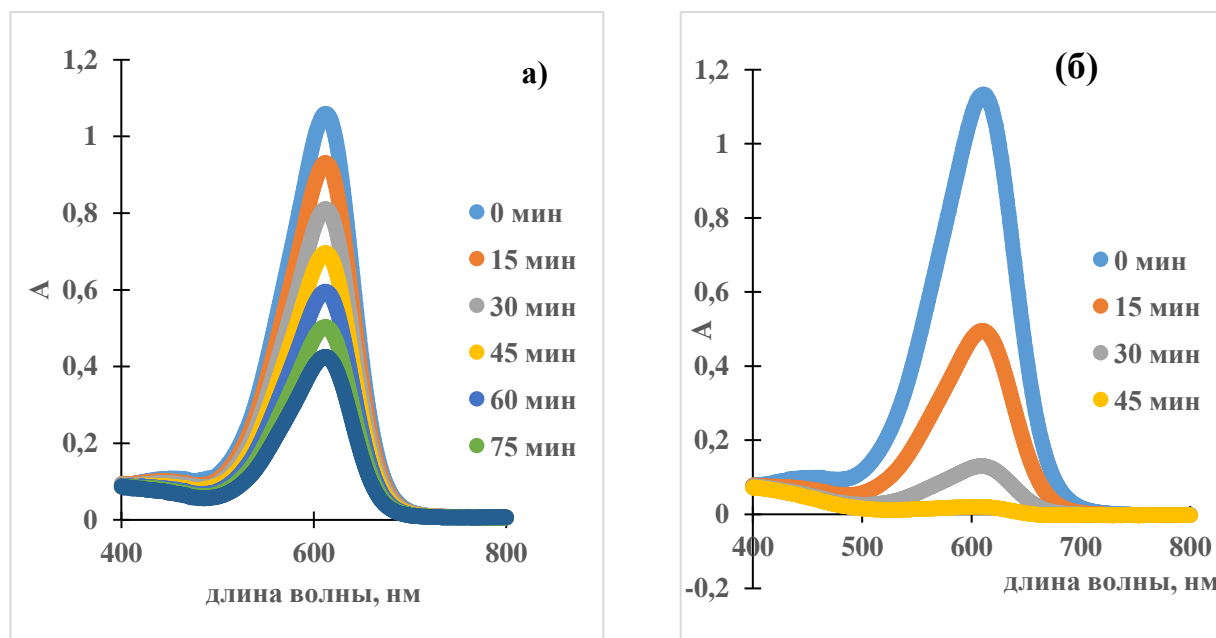


Рис. 3.14. Изменение оптической плотности раствора индигокармина в реакции окислительной деструкции, катализируемой реагентом ОРК – 5 (1:100 разбавление), $C(\text{БФС}) = 0,056 \text{ мМ}$, $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,01 \text{ М}$ при (а) $t = 21^\circ\text{C}$ и (б) $t = 35^\circ\text{C}$

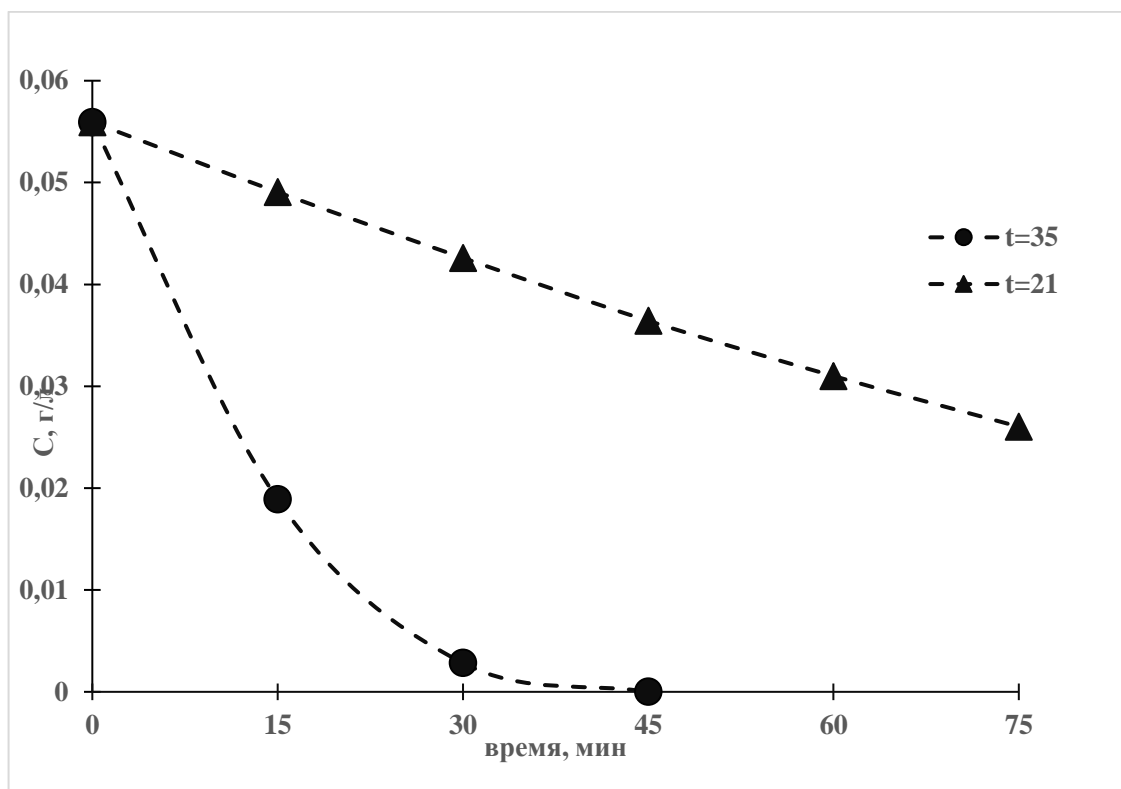


Рис. 3.15. Кинетические кривые деструкции индигокармина в присутствии реагента ОРК-5 (1:100 разбавление) и пероксида водорода при различных температурах

($C(\text{индигокармина})=0,056 \text{ мМ}$, $C(\text{H}_2\text{O}_2)=0,01 \text{ М}$)

Полученные данные (рис. 3.14, 3.15 и таблица 3.3.) показали, что повышение температуры способствовало обесцвечиванию раствора индигокармина. При температуре 21°C в течение 75 минут, деструкции подверглось примерно 60% индигокармина. С ростом температуры до 35°C степень деструкции красителя достигает 100% за 45 минут.

На рис. 3.16 представлены кинетические кривые окисления индигокармина при 21°C . На основании этих данных был построен график зависимости начальной скорости реакции окисления индигокармина от начальной концентрации красителя (рис. 3.17).

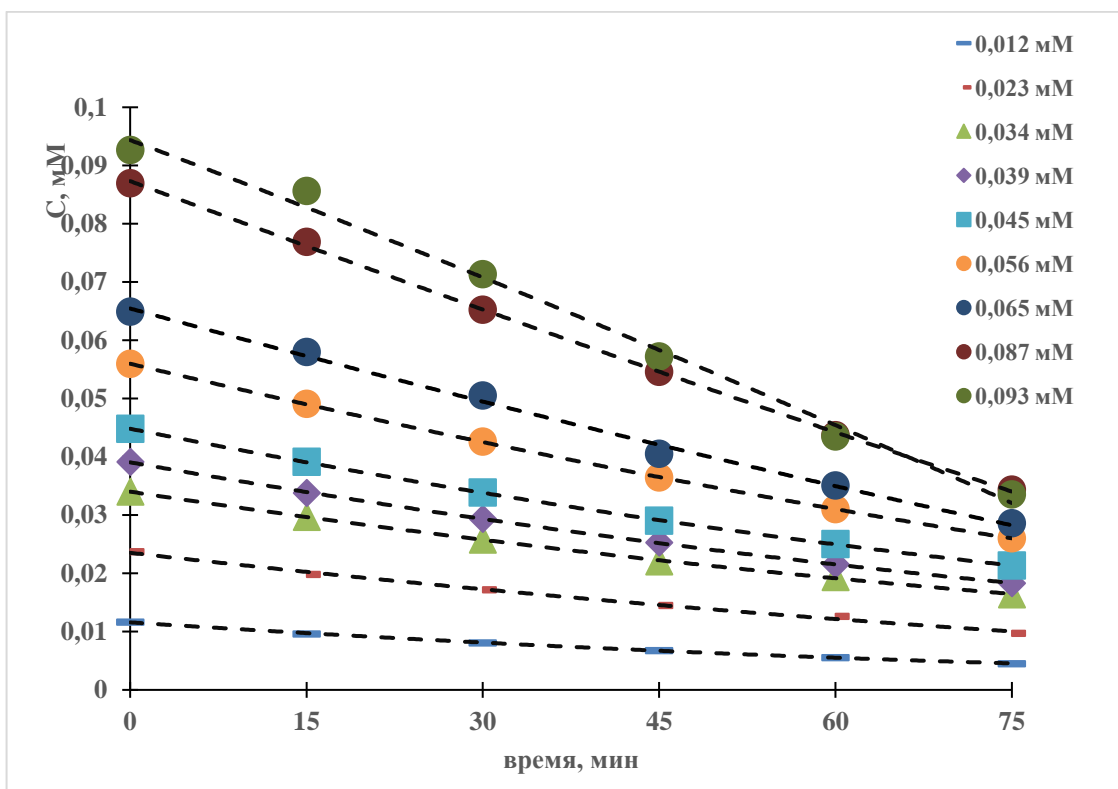


Рис. 3.16. Кинетические кривые окисления индигокармина ферментом при 21°C (реагент ОРК-5 (1:100 разбавление), $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,01 \text{ M}$, $\text{pH}=4,1$)

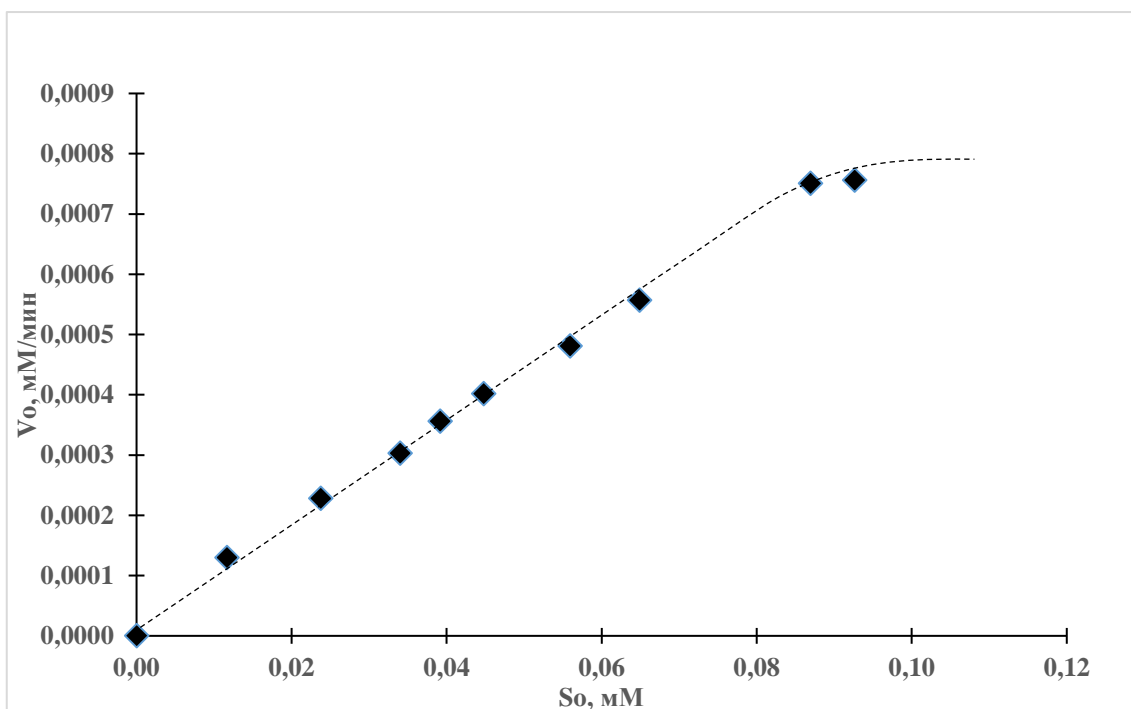


Рис. 3.17. Зависимость начальной скорости реакции окисления индигокармина от концентрации при 21°C

Кинетические параметры ферментативной реакции определяли путем линеаризации уравнения Михаэлиса-Ментен в координатах $1/V_0-1/S_0$.

Линеаризация кривой в координатах Лайнуивера-Берка (рис. 3.18) позволяет определить константу Михаэлиса и максимальную скорость реакции этой реакции - 0,154 мМ и 1,8 мкМ/мин, соответственно.

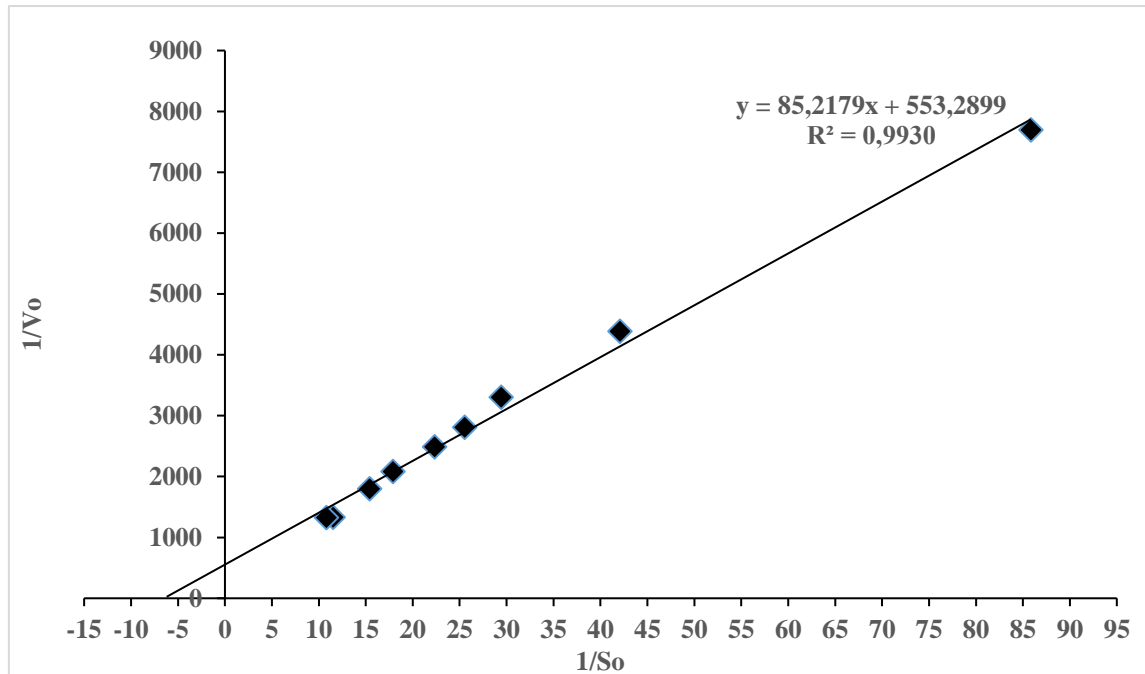


Рис. 3.18. Графическое определение K_M и V_{max} в координатах Лайнуивера-Берка

Таким образом, ферментный препарат ОРК-5 на основе оксизина имеет большой потенциал для обесцвечивания водных растворов индигокармина, причем окислительная деструкция протекает с высокой эффективностью и может стать альтернативой биodeградации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальные результаты, полученные в настоящей работе, показали эффективность ферментативных реакций, катализируемых ферментным препаратом пероксидазы, пероксидазой из корней хрена и реагентом ОРК-5, при обработке водных растворов бромфенолового синего и индигокармина.

Была определена пероксидазная активность ферментного комплекса, содержащегося в корнях хрена, – 0,59 мкМ/мин•мг.

Проведена окислительная деструкция бромфенолового синего пероксидом водорода при участии ферментного препарата пероксидазы. Эксперименты подтвердили необходимость сочетания пероксидазы и H_2O_2 для обесцвечивания раствора красителя. Показано, что реакция окисления протекает с высокой эффективностью. При температуре 30°C и значении pH 4,1 в течение 10 минут обесцвечивается более 89 % раствора бромфенолового синего (32,7 мкМ). Были найдены кинетические параметры уравнения Михаэлиса-Ментен при температуре 30 °C и pH= 4,1. Константа Михаэлиса и максимальная скорость составляют 42,7 мкМ и 57,5 мкМ•мин⁻¹, соответственно.

В результате изучения влияния температуры и концентрации пероксида водорода на возможность деструкции бромфенолового синего обнаружено, что при малом содержании пероксида водорода эффективность обесцвечивания раствора красителя составила до 91% в течение 10 минут. Высокие концентрации H_2O_2 могут вызвать торможение каталитического процесса. Также показано, что максимум каталитической активности пероксидазы в реакции окисления бромфенолового синего пероксидом водорода наблюдается при температуре 23°C, 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 30 минут более 91 % красителя обесцвечивалась.

Исследовано использование реагента ОРК-5 на основе оксизина для обесцвечивания водных растворов индигокармина. Показано, что степень деструкции красителя достигает 100% за 45 минут при 35°С. Были определены константа Михаэлиса и максимальная скорость этой реакции – 0,154 мМ и 1,8 мкМ/мин, соответственно, при 21°С и значении рН 4,1.

Таким образом, результаты показывают, что ферментативное обесцвечивание красителей происходит быстро и открывает новые перспективы для использования этих или аналогичных систем в охране окружающей среды.

Эксперименты по ферментативному окислению красителей хорошо воспроизводятся, не требуют сложного аппаратного оформления. Они могут быть рекомендованы для включения в лабораторный практикум по физической химии, раздел «Ферментативный катализ».

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kim G.Y., et al. Electroenzymatic degradation of azo dye using an immobilized peroxidase enzyme // *Journal of Hazardous Materials*. 2005. V. 126(1–3). P. 183–188.
2. Souza S., Forgiarini E. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP) // *Journal of Hazardous Materials*. 2007. V. 147(3). P. 1073–1078.
3. Денисов Е.Т., Саркисов О.М., Лихтенштейн Г.И., Денисов Е.Т. *Химическая кинетика: Учебник для вузов*. - М.: Химия, 2000. 568 с.: ил.
4. Севрюкова Г.А., Картушина Ю.Н., Бочарова И.А. Получение и применение ферментов для биodeградации загрязнений (на примере очистки сточных вод). Волгоград: ВолГТУ, 2016. С. 7-10.
5. Славянский А.К., Шарков В.И., Ливеровский А.А. и др. *Химическая технология древесины. Учеб. пособие для технол. и лесотех. вузов*. М.: Гослбумиздат, 1962. 576 с.
6. Огурцов А.Н. *Ферментативный катализ*. Харьков: НТУ "ХПИ", 2010. 304 с.
7. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. *Биологическая химия: Учебник*. – 3-е изд., перераб. и доп.– М.: Медицина, 1998. 704 с.: ил.
8. Banci L. Structural properties of peroxidases // *J. Biotechnol.* 53. 1997. P. 253 – 263.
9. Welider K.G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidase // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1992. V. 2. № 3. P. 388 – 393.
10. Захарова Г.С., Упоров И. В., Тишков В. И. Peroксидаза из корней хрена: модулирование свойств химической модификацией белковой глобулы и гемма // *Успехи биологической химии*. 2011. Т. 51. С. 37–64.
11. Захарова Г.С. Анионная пероксидаза табака: получение рекомбинантного фермента и его применение как компонента

биоаналитических систем: Дисс. ... кандидата химических наук. - Москва, 2015. - 159 с.: ил

12. Aitken M.D. Waste treatment applications of enzymes: opportunities and obstacles // *The Chemical Engineering Journal*. 1993. V. 52. № 2. P. B49–B58.

13. Singh R.L., Singh P.K., Singh R.P. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes-a review // *Int Biodeterior Biodegradation* 104. 2015. P. 21 – 31.

14. Gajhede M., et al. Crystal structure of classical horseradish peroxidase C at 2.15Å resolution // *Nat. Struct. Biol.* 1997. V. 4. P. 1032-1038.

15. Banci L., Carlom P., Diaz A., Savellini G.G. Molecular dynamics calculations on peroxidases: the effect of calcium ions on protein structure // *J.Biol.Inorg.Chem.* 1996. V. 1. P. 264 – 272.

16. Haschke R.H., Friedhoff J.M. Calcium – related properties of horseradish peroxidase // *Biochem. Res. Commun.* 1978. V. 80. №4. P. 1039 – 1042.

17. Howes B.D., Feis A., Raimondi L., Indiani C., Smulevich G. The critical role of the proximal calcium ion in the structural properties of horseradish peroxidase // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 44. P. 40704 – 40711.

18. Багирова Н.А. Ферментативное определение фенолов и ртути (II) с использованием пероксидазы арахиса: автореферат дис. ... кандидата химических наук: 02.00.02. - Москва, 2000. - 24 с.

19. Saratale R.G., et al. Outlook of bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2009. V. 59. № 2. P. 72 – 84.

20. Hamid M., Khalil R., Potential applications of peroxidases // *Food Chemistry*. 2009. V. 115. № 4. P. 1177–1186.

21. Duran N., Esposito E. Potential application of oxidative enzymes and phenoloxidase – like compounds in wastewater and soil treatment: a review // *Applied Catalysis B: Environmental*. 2000. V. 28. P. 83–99.

22. Тумэндэмбэрэл Г. Исследование процессов биodeградации вязких нефтей Монголии для создания методов увеличения нефтеотдачи и рекультивации нефтезагрязненных почв: Дисс. ... кандидата химических наук. – Томск, 2010. – 124 с.: ил.

23. Губер Наторова Т.Н., Дину М.И. Экспериментальные исследования биодеструкции соединений под действием ферментативного окислительного комплекса грибов. Вестник Тюменского государственного университета. 2014. № 12. Экология. С. 72–78.

24. 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. № 9. P. 1879 – 1889.

25. Tong Z., et al. Removal of toxic phenol and 4-chlorophenol from wastewater by horseradish peroxidase // *Chemosphere*. 1997. V. 34. № 4. P. 893–903.

26. Флюрик Е.А., Леонтьев В.Н., Буткевич О.Г., Чеушева М.В. Влияние тиолов на пероксидазную реакцию окисления о-дианизидина, [Текст], БГТУ Минск: БГТУ, 2010. P. 280-282.

27. Li H., Nicell J.A. Optimal conditions for oxidative degradation of bisphenol A by horseradish peroxidase in aqueous phase. 2011. P. 5442 – 5446.

28. Айзенштадт М.А. Пероксидазное окисление лигнина и его модельных соединений // *Химия растительного сырья*. 2009. № 2. С. 5 - 18.

29. Veitch N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme // *Phytochemistry*. 2004. V. 65. P. 249 – 259.

30. Dolman D., Newell G.A., Thurlow M.D. A kinetic study of the reaction of horseradish peroxidase with hydrogen peroxide // *Canadian Journal of Biochemistry*. 1975. V. 53. P. 495 – 501.

31. Shannon L.M., Kay E., Lew J.Y. Peroxidase isozymes from horseradish roots. Isolation and physical properties. // J. Biol. Chem. 1966. V. 249. № 9. P. 2166 – 2172.
32. Иванова Т.М., Рубин Б.А. О природе фенолоксидазного действия пероксидазы // Биохимия. 1962. Т. 27. № 4. С. 622–630.
33. Куцкир М.В. Определение экологической безопасности наноматериалов на основе морфофизиологических и биохимических показателей сельскохозяйственных культур: Дис. ... канд. биол. Наук. – Рязань, 2014. – 133 с.
34. Keescy Ed.Y. Biochimica Information, Indianapolis. 1987. 57p.
35. Бояркин А.Н. Быстрый метод определения активности пероксидазы // Биохимия. 1951. Т. 16. Вып. 4. С. 352 – 355.
36. Рощина Т.М., Жирякова М.В., Тифлова Л.А., Ермилов А.Ю. Практикум по физической химии. М.: МГУ им. М.В. Ломоносова, 2010. 91с.