



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C02F 1/72 (2022.08); C02F 1/722 (2022.08)

(21)(22) Заявка: 2022108381, 30.03.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
30.03.2022

Дата регистрации:
26.10.2022

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 30.03.2022

(45) Опубликовано: 26.10.2022 Бюл. № 30

Адрес для переписки:
308015, Белгородская обл., г. Белгород, ул.
Победы, 85, НИУ "БелГУ", ОИС, Цуриковой
Н.Д.

(72) Автор(ы):
Лебедева Ольга Евгеньевна (RU),
Соловьева Анна Алексеевна (RU),
Кононова Маргарита Игоревна (RU)

(73) Патентообладатель(и):
федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Белгородский государственный
национальный исследовательский
университет" (НИУ "БелГУ") (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: JP 2001009466 A, 16.01.2001. RU
2294321 C1, 27.02.2007. WO 03008345 A1,
30.01.2003. UA 8115 U, 15.07.2005.

(54) Способ очистки водных растворов от красителей с использованием пероксидазы растительного происхождения

(57) Реферат:

Изобретение относится к области химии, а именно к способу окисления органических красителей, который может быть применен для очистки сточных вод объектов текстильной, пищевой, бумажной, полиграфической, кожевенной и косметической отраслей промышленности от остатков красителей. Способ включает использование пероксидазы растительного происхождения. Обесцвечивание

красителей оксазиновой группы осуществляют при совместном присутствии 0,4 мМ раствора пероксида водорода и кожуры корнеплода сахарной свеклы, при температуре 24 °С и значении pH=4,01 раствора красителя оксазиновой группы. Обеспечивается эффективный способ очистки сточных вод от остатков красителей оксазиновой группы за короткий период времени. 2 ил., 2 табл., 12 пр.

RU
2 7 8 2 3 9 7
C 1

RU
2 7 8 2 3 9 7
C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C02F 1/72 (2022.08); C02F 1/722 (2022.08)

(21)(22) Application: **2022108381, 30.03.2022**

(24) Effective date for property rights:
30.03.2022

Registration date:
26.10.2022

Priority:

(22) Date of filing: **30.03.2022**

(45) Date of publication: **26.10.2022 Bull. № 30**

Mail address:

**308015, Belgorodskaya obl., g. Belgorod, ul.
Pobedy, 85, NIU "BelGU", OIS, Tsurikovoj N.D.**

(72) Inventor(s):

**Lebedeva Olga Evgenevna (RU),
Soloveva Anna Alekseevna (RU),
Kononova Margarita Igorevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Belgorodskij gosudarstvennyj
natsionalnyj issledovatel'skij universitet" (NIU
"BelGU") (RU)**

(54) **METHOD FOR PURIFYING AQUEOUS SOLUTIONS FROM DYES USING VEGETABLE PEROXIDASE**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to the field of chemistry, namely to a method for the oxidation of organic dyes, which can be used to treat wastewater from textile, food, paper, printing, leather and cosmetic industries from dye residues. The method includes the use of vegetable peroxidase. The bleaching of dyes of the oxazine group is carried out in the joint presence of

a 0.4 mM solution of hydrogen peroxide and the peel of the sugar beet root, at a temperature of 24°C and a pH value of 4.01 of a solution of the dye of the oxazine group.

EFFECT: effective method for wastewater treatment from residues of dyes of the oxazine group in a short period of time is provided.

1 cl, 2 dwg, 2 tbl, 12 ex

RU 2 782 397 C1

RU 2 782 397 C1

Изобретение относится к области химии, а именно к способу окисления органических красителей, который может быть применен для очистки сточных вод объектов текстильной, пищевой, бумажной, полиграфической, кожевенной и косметической промышленности от остатков красителей.

5 Ферментативное окисление красителей привлекает значительное внимание в научном мире из-за явных своих преимуществ: высокая специфичность, эффективность и экологичность. Среди различных ферментов растительные пероксидазы представляют особый интерес для применения в природоохранных технологиях. Пероксидазы – это универсальный биокатализатор, число применений которого постоянно растет. В
10 настоящее время корни хрена служат основным источником коммерчески доступной пероксидазы. Так, в работах [Terres J. et al. Decolorization and degradation of Indigo Carmine dye from aqueous solution catalyzed by horseradish peroxidase // Biocatalysis and Biotransformation. 2014. V. 32. №1. P. 64-7; Farias S., et al. Removal of reactive blue 21 and reactive red 195 dyes using horseradish peroxidase as catalyst // Brazilian Journal of Chemical
15 Engineering. 2017. V. 34. N 3. P. 701-707; YixinHuang et al ABTS as an electron shuttle to accelerate the degradation of diclofenac with horseradish peroxidase-catalyzed hydrogen peroxide oxidation // Science of The Total Environment. 2021. V.798. P. 1–10; Kheireddine Sellami et al Peroxidase enzymes as green catalysts for bioremediation and biotechnological applications: A review // Science of The Total Environment. 2022. V. 806. Part 2. P. 1–18.] подробно изучена
20 деструкция органических красителей пероксидом водорода с участием коммерческой пероксидазы хрена. Авторы определили кинетические характеристики реакции, оптимальное соотношение реагентов, изучили влияние температуры и pH на скорость реакции, были определены некоторые термодинамические параметры реакции. Однако, помимо выдающихся преимуществ, стоимость препаратов коммерческих пероксидаз
25 относительно высока, поскольку процедуры их очистки слишком дороги, что является существенным недостатком. Поэтому разработка новых подходов применения растительных пероксидаз является актуальной задачей.

Исследуются новые пероксидазы с повышенной стабильностью и свойствами, подходящими для различных биотехнологических, биомедицинских и других применений.
30 В работе [Ahmedi A. et al. Enzymatic degradation of Congo Red by turnip (*Brassica rapa*) peroxidase // Zeitschrift für Naturforschung C. 2012. V. 67. №7-8. P. 429-436; Dave, B.; Sanghvi, G. Enzyme Action for Dye Degradation. In Dye Biodegradation, Mechanisms and Techniques; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2022; pp. 141–163; Aziz G. M. et al. Degradation of reactive dyes using immobilized peroxidase purified from *nigella sativa* // Iraqi journal of
35 agricultural sciences. V. 52. №6. P. 1365–1374.] проводилась экстракция пероксидазы из различных растительных источников (репа (*Brassica rapa*), кабачки (*Cucurbita pepo*), капуста (*Brassica oleracea* var. *Capitata*), сладкий картофель (*Ipomea batatas*), редис красный (*Raphanus sativus*), цветная капуста (*Brassica oleracea* var. *Botrytis*) и картофель (*Solanum tuberosum*)), для сравнительной оценки активности пероксидазы этих овощей. Авторы
40 показали, что самая высокая активность пероксидазы наблюдается у репы (*Brassica rapa*). Экстракт пероксидазы репы был использован авторами в реакции обесцвечивания азокрасителя Конго Красный. В оптимизированных авторами условиях, 90% красителя разлагалось в течение первых 2 минут реакции, а полное обесцвечивание реакционной смеси достигалось примерно через 16 минут.

45 Известен способ быстрой обработки сточных вод для удаления загрязняющих веществ из сточных вод по патентам: RU 2 021 371 C1 (опубликовано 15.10.1994) – использование Mn-зависимых пероксидаз и других лигнолитических ферментов, выделяемых в культуральную жидкость грибами белой гнили *Panus tigrinus* для

дальнейшего использования в реакциях деструкции фенольных и нефенольных структур, RU 2 196 744 C2 (опубликовано 20.01.2003) – патент на установку комплексной очистки сточных вод от трудноокисляемых органических соединений с применением пероксидазы хрена в качестве ферментного препарата, катализирующего окисление фенолов, RU 2617937 (опубликовано 28.04.2017) – настоящее изобретение предлагает композиции, представляющие собой комбинации ферментов, микроорганизмов и питательных веществ, пероксида водорода, сульфата двухвалентного железа. Группа изобретений обеспечивает очистку сточных вод за короткий период времени. Значительное снижение различных параметров загрязнения, измеряемых в сточных водах, сбрасываемых предприятиями текстильной и целлюлозно-бумажной промышленности, после их обработки композицией наблюдалось после 16 часов реакции.

В способе RU 2294321 (Опубликовано: 27.02.2007) окисления фенольных соединений пероксидом водорода в присутствии гетерогенного катализатора в водной среде, процесс проводят на катализаторе, выполненном на основе оксида алюминия, содержащем пероксидазу хрена и модифицированном полисахаридной матрицей хитозана в среде с эквимольным количеством окислительного агента. Окисление фенольных соединений по данному способу осуществляется при атмосферном давлении, перемешивании с интенсивностью 400-500 об/мин, автоматической подачей окислительного агента, при температуре 20-50°C, при концентрации фенола 0,01-0,3 моль/л. При этом удается достигнуть конверсии фенола до 99,9%.

Недостатками способов, описанных в перечисленных выше публикациях, является необходимость применения коммерческого препарата пероксидазы, либо выделения пероксидазы из частей растений. Не встречаются публикации, в которых для ферментативной деструкции органических веществ применяются непосредственно части растений, без стадии выделения из них пероксидазы.

В связи с этим, задачей настоящего изобретения является разработка простого способа удаления из водных растворов органических красителей в результате их деструкции, протекающей с участием пероксида водорода и пероксидазы, источником которой служат отходы корнеплодов сахарной свеклы *Beta vulgaris* L.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является эффективный способ, обеспечивающий очистку объектов текстильной, пищевой, бумажной, полиграфической, кожевенной и косметической промышленности от остатков красителей оксазиновой группы за короткий период времени.

Поставленная задача решается предлагаемым способом очистки водных растворов от красителей с использованием пероксидазы растительного происхождения, включающий обесцвечивание красителей оксазиновой группы при совместном присутствии 0,4 мМ раствора пероксида водорода и кожуры корнеплода сахарной свеклы, который осуществляют при температуре 24 °С, значении pH=4,01 раствора красителя оксазиновой группы.

Пример осуществления способа.

Способ осуществляли при температуре 24 °С и значении pH=4,01 (фталатный буферный раствор). Для этого в объем 25 мл буферного водного раствора Нильского синего с разными концентрациями – от 9,6 до 132 мкМ помещали 0,5 г кожуры корнеплода сахарной свеклы. Реакцию запускали добавлением 0,1 мл 0,1 М раствора пероксида водорода, это считали временем начала реакции. Перемешивали содержимое в стаканах, переносили в кювету и регистрировали спектры поглощения в интервале длин волн 400–900 нм. Эффективность удаления красителя (%), определяли по формуле:

$$\% = \frac{D_0 - D_t}{D_0} \cdot 100\% = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \cdot 100\%,$$

где D_0 , C_0 – оптическая плотность и концентрация исходного раствора Нильского синего, соответственно. D_t , C_t – оптическая плотность и концентрация раствора

5 Нильского синего во время t , соответственно.

При использовании только пероксида водорода без растительного материала, снижение интенсивности поглощения раствора красителя в течение двух часов составило не более 1%. При проведении реакции в присутствии только растительного материала, при этом кожуру овоща помещали непосредственно в раствор красителя, через 2 часа
10 степень деструкции Нильского синего составила 1%. Что свидетельствует о незначительной величине адсорбции красителя на поверхности кожуры корнеплода. Необходима комбинация растительной пероксидазы и пероксида водорода для разрушения раствора красителя.

Изобретение характеризуют следующие графические изображения: Фиг. 1 - показано
15 уменьшение интенсивности поглощения водного раствора Нильского синего при начальном содержании 48 мкМ при окислительной деструкции с участием пероксида водорода и кожуры корнеплода сахарной свеклы, при массе кожуры 0,5 г, концентрации пероксида водорода 0,4 мМ, $t=24^\circ\text{C}$, $\text{pH}=4,01$.

Фиг. 2 - приведены кинетические кривые изменения концентрация Нильского синего
20 при различных температурах в результате окислительной деструкции с участием пероксида водорода и кожуры корнеплода сахарной свеклы, при массе кожуры 0,5 г, концентрации пероксида водорода 0,4 мМ, $t=24^\circ\text{C}$, $\text{pH}=4,01$.

В результате пероксидазного удаления из раствора Нильского синего с использованием кожуры сахарной свеклы и пероксида водорода наблюдается
25 значительное уменьшение интенсивности поглощения при длинах волн 600 и 640 нм, как показано на Фиг. 1, что свидетельствует об уменьшении концентрации красителя. Также в области 300–900 нм не наблюдается появление новых максимумов поглощения, что свидетельствует о полном разрушении красителя.

Описание способа поясняется следующими примерами.

30 Пример 1. Корнеплод сахарной свеклы вначале отмывали с помощью щетки под проточной водой от частичек земли, потом споласкивали дистиллированной водой. Корнеплоды чистили от кожуры с помощью ножа. Полученную кожуру использовали как источник пероксидазы. Для удаления красителя, в объем 25 мл буферного водного раствора Нильского синего концентрацией 9,6 мкМ помещали 0,5 г кожуры корнеплода
35 сахарной свеклы. Реакцию запускали добавлением 0,1 мл 0,1 М раствора пероксида водорода, это считали временем начала реакции.

Пример 2. Аналогичен примеру 1, отличающийся тем, что содержание Нильского синего составляет 14,4 мкМ.

40 Пример 3. Аналогичен примеру 1, отличающийся тем, что содержание Нильского синего составляет 19,2 мкМ.

Пример 4. Аналогичен примеру 1, отличающийся тем, что содержание Нильского синего составляет 24 мкМ.

Пример 5. Аналогичен примеру 1, отличающийся тем, что содержание Нильского синего составляет 28,8 мкМ.

45 Пример 6. Аналогичен примеру 1, отличающийся тем, что содержание Нильского синего составляет 33,6 мкМ.

Пример 7. Аналогичен примеру 1, отличающийся тем, что содержание Нильского синего составляет 43,2 мкМ.

Пример 8. Аналогичен примеру 1, отличающийся тем, что содержание Нильского синего составляет 48 мкМ.

Пример 9. Аналогичен примеру 1, отличающийся тем, что содержание Нильского синего составляет 72 мкМ.

5 Пример 10. Аналогичен примеру 1, отличающийся тем, что содержание Нильского синего составляет 96 мкМ.

Пример 11. Аналогичен примеру 1, отличающийся тем, что содержание Нильского синего составляет 120 мкМ.

10 Пример 12. Аналогичен примеру 1, отличающийся тем, что содержание Нильского синего составляет 132 мкМ.

В зависимости от начального содержания Нильского синего в водном растворе, как описано в примерах 1-12, степень удаления и начальные скорости ферментативной реакции в результате окислительной деструкции с участием пероксида водорода и кожуры сахарной свеклы, могут быть различны. Кинетические характеристики

15 деструкции Нильского синего в присутствии кожуры корнеплодов сахарной свеклы и пероксида водорода: $C(H_2O_2)=0,4$ мМ, $m(\text{кожуры})=0,5$ г, $pH=4,1$, $t=24^\circ C$ представлены в таблице 1.

Таблица 1.

С (Нильский синий), мкМ	Начальная скорость, мкМ·мин ⁻¹	Эффективность удаления красителя, % за 15 минут
9,6	1,5	41
14,4	1,7	30,4
19,2	3,13	43,3
24	6,65	73,65
28,8	7,61	70,3
33,6	10,8	85,4
43,2	14,0	86,3
48	15,7	87
72	24,1	89,1
96	30,8	85,25
120	35,7	79,1
132	35,4	75,4

Константа Михаэлиса K_M и максимальная скорость V_{max} – это два важных кинетических параметра ферментативной реакции, с помощью которых можно характеризовать эффективность работы изучаемого фермента. Для определения этих параметров, была получена зависимость начальной скорости реакции от концентрации

45 субстрата. Параметры ферментативной реакции определялись методом линеаризации уравнения Михаэлиса-Ментен в координатах Лайнуивера-Берка. Для объективной оценки активности пероксидазы, содержащейся в овощных культурах, определяли изменение значений константы Михаэлиса K_M и максимальной скорости V_{max} при

использовании пероксидазы в реакции деструкции красителя из трех различных образцов сахарной свеклы. Кинетические параметры ферментативной реакции удаления Нильского синего с участием кожуры корнеплодов различных образцов сахарной свеклы: $C(H_2O_2) = 0,4$ мМ, $m(\text{кожуры}) = 0,5$ г, $pH = 4,1$, $t = 24^\circ C$ представлены в таблице 2.

5 Таблица 2.

Кинетические параметры	K_m , мМ			V_{max} , мМ·мин ⁻¹		
	номер образца			номер образца		
Концентрация	1	2	3	1	2	3
9,6	0,045	0,047	0,036	0,067	0,07	0,054
14,4	0,04	0,042	0,035	0,068	0,072	0,06
19,2	0,027	0,027	0,029	0,085	0,083	0,09
24	0,047	0,06	0,05	0,31	0,4	0,33
28,8	0,022	0,021	0,025	0,17	0,16	0,19
33,6	0,051	0,05	0,056	0,55	0,54	0,61
43,2	0,04	0,044	0,041	0,56	0,61	0,57
48	0,053	0,05	0,052	0,83	0,79	0,81
72	0,046	0,047	0,049	1,12	1,13	1,17
96	0,14	0,14	0,142	4,34	4,31	4,37
120	0,12	0,12	0,121	4,3	4,27	4,31
132	0,12	0,12	0,12	4,28	4,26	4,32

Таблица 2 показывает, что для каждого образца овоща эти параметры меняются, что объясняется различием времени и условий хранения овощей, а также циклом развития овощной культуры.

Пероксидаза относится к достаточно термоустойчивым ферментам. В данном способе определена оптимальная температура ферментативной реакции, катализируемой пероксидазой, содержащейся в сахарной свекле. Кинетические кривые изменения концентрации Нильского синего при различных температурах показаны на Фиг. 2. Активность пероксидазы сохраняется при повышении температуры от $23^\circ C$ до $40^\circ C$, ферментативная реакция протекает с высокой эффективностью, степень деструкции составляет около 90%. При повышении температуры до $40^\circ C$ степень деструкции Нильского синего уменьшается до 78%, что связано разрушением активных центров фермента.

Таким образом, приведенные примеры доказывают, что поставленная задача по разработке простого в реализации способа удаления из водных растворов органических красителей оксазиновой группы за короткий период времени в результате их деструкции, протекающей с участием пероксида водорода и пероксидазы растительного происхождения источником которой служат отходы (кожура) корнеплодов сахарной

свеклы решена.

(57) Формула изобретения

5 Способ очистки водных растворов от красителей с использованием пероксидазы растительного происхождения, включающий обесцвечивание красителей оксазиновой группы при совместном присутствии 0,4 мМ раствора пероксида водорода и кожуры корнеплода сахарной свеклы, который осуществляют при температуре 24 °С, значении рН=4,01 раствора красителя оксазиновой группы.

10

15

20

25

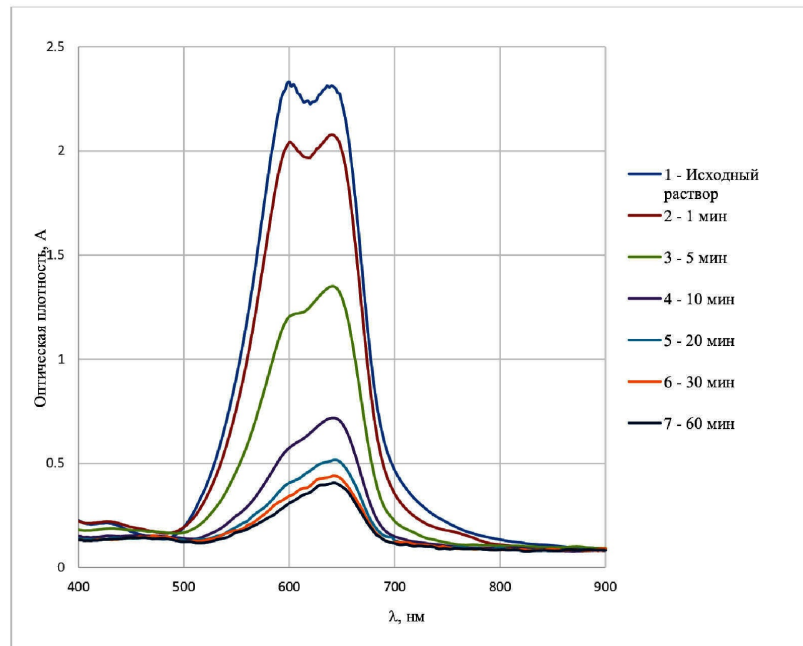
30

35

40

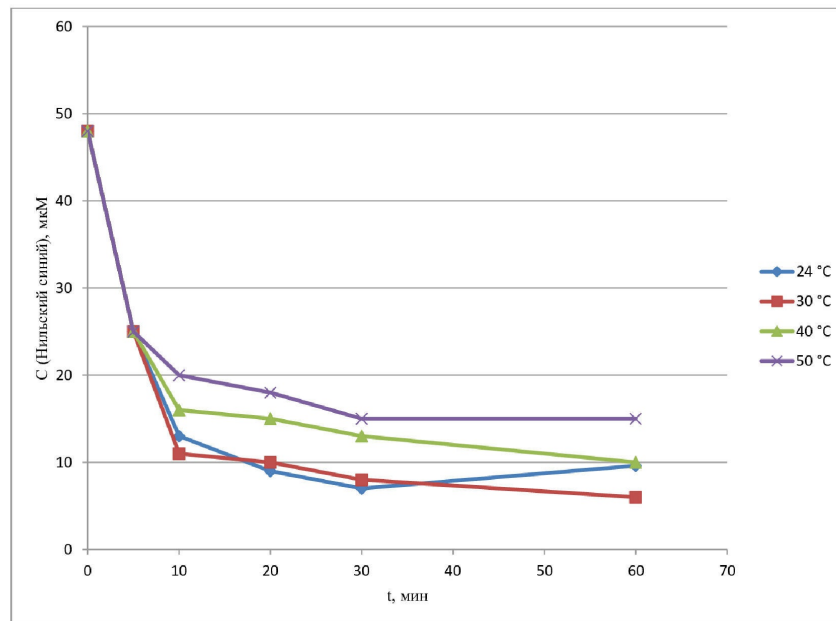
45

1



Фиг. 1

2



Фиг. 2