

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ ДОНЕЦЬКИЙ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ВАСИЛЯ СТУСА

ЯКУТА ПЕТРО ОЛЕКСАНДРОВИЧ

Допускається до захисту:
в.о. завідувача кафедри
фундаментальної та прикладної хімії,
д-р фіз.-мат. наук, с.н.с.

_____ Ю.В. Рассохіна
« ____ » _____ 2026 р.

**ПРИРОДНІ МЕДІАТОРИ ПЕРОКСИДАЗИ ХРОНУ В ПРОЦЕСАХ
ДЕКОЛОРИЗАЦІЇ СИНТЕТИЧНИХ БАРВНИКІВ**

Спеціальність 102 Хімія
Кваліфікаційна робота магістра

Науковий керівник: Куш О.В.,
професор кафедри фундаментальної
та прикладної хімії, д-р хім. наук,
професор

(Підпис)

Оцінка: / ____ / ____ / ____
(бали / за шкалою ЄКТС/ за національною шкалою)

Голова ЕК: _____
(підпис)

Вінниця 2026

АНОТАЦІЯ

Якута П. О. Природні медіатори пероксидази хрону в процесах деколоризації синтетичних барвників. Спеціальність 102 «Хімія». Донецький національний університет імені Василя Стуса, Вінниця, 2026. – 57 с.

Досліджено біокаталітичні системи із застосуванням пероксидази хрону та природних редокс-медіаторів — ваніліну й сирінгальдегіду — у процесах знебарвлення синтетичних барвників різної хімічної природи: індигокарміну (індигоїдний барвник), метилового оранжевого (азобарвник) і малахітового зеленого (трифенілметановий барвник). Показано, що сирінгальдегід і ванілін, одержувані з відновлюваної сировини — лігніну, є перспективними екологічно безпечними медіаторами пероксидази для розкладання барвників. Встановлено, що ванілін демонструє вищу ефективність окислення для індигокарміну і малахітового зеленого, а азобарвник метиловий оранжевий швидше розкладається в присутності сирінгальдегіду. Вивчено вплив основних параметрів процесу, зокрема рН, періоду інкубації, концентрації H_2O_2 , а також вмісту медіаторів і ферменту, на ефективність перетворення барвників. Використання ферментів і медіаторів біологічного походження зменшує негативний вплив на довкілля, що робить очищення стічних вод із застосуванням ферментно-медіаторних систем екологічно сталим підходом.

Ключові слова: пероксидаза хрону, редокс медіатор, сирінгальдегід, ванілін, індигокармін, метиловий оранжевий, малахітовий зелений.

Табл. 6. Рис. 23. Бібліограф.: 45 найм.

ABSTRACT

Yakuta P. O. Natural mediators of horseradish peroxidase in the processes of decolorization of synthetic dyes. Speciality 102 "Chemistry". Vasyl Stus Donetsk National University, Vinnytsia, 2026. – 57 p.

Biocatalytic systems using horseradish peroxidase and natural redox mediators — vanillin and syringaldehyde— in the processes of decolorization of synthetic dyes of different chemical nature: indigo carmine (indigoid dye), methyl orange (azo dye) and malachite green (triphenylmethane dye) were studied. It was shown that syringaldehyde and vanillin, obtained from renewable raw materials — lignin, are promising environmentally safe peroxidase mediators for the decomposition of dyes. It was found that vanillin demonstrates higher oxidation efficiency for all studied dyes. The influence of the main process parameters, in particular pH, incubation period, H_2O_2 concentration, as well as the content of mediators and enzyme, on the efficiency of dye conversion was studied. The use of enzymes and mediators of biological origin reduces the negative impact on the environment, making wastewater treatment using enzyme-mediator systems an environmentally sustainable approach.

Keywords: horseradish peroxidase, redox mediator, syringaldehyde, vanillin, indigo carmine, methyl orange, malachite green.

Table 6. Fig. 23. Bibliogr.: 45 refs.

ЗМІСТ

ЗМІСТ	4
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	6
ВСТУП.....	7
РОЗДІЛ 1	10
ОКИСЛЮВАЛЬНА ДЕГРАДАЦІЯ СИНТЕТИЧНИХ БАРВНИКІВ ФЕРМЕНТНО-МЕДІАТОРНИМИ СИСТЕМАМИ.....	10
1.1 Оксидоредуктази як універсальні каталізатори для деградації екополлютантів.....	10
1.1.1 Пероксидаза хрому: структура, механізм дії, застосування	11
1.1.2 Медіатори оксидоредуктаз	13
1.2 Синтетичні барвники: класифікація за хімічною структурою	15
1.2.1 Індигокармін	15
1.2.2 Метилловий оранжевий	20
1.2.3 Малахітовий зелений.....	21
1.3 Методи очистки стічних вод від барвників	22
1.4 Біоремедіація як екологічна альтернатива фізико-хімічним методам.....	23
ВИСНОВКИ З ЛІТОГЛЯДУ.....	25
РОЗДІЛ 2	27
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	27
2.1. Об'єкти дослідження	27
2.2 Підготовка та приготування реактивів	30
2.2.1 Приготування буферних систем.....	30

2.2.2 Приготування розчинів ферментів.....	31
2.3 Методи дослідження	31
2.3.1 Метод УФ-видимої спектроскопії для вивчення кінетики деколонізації барвників	31
2.3.2 Вплив рН на знебарвлення барвників	32
2.3. Експерименти зі знебарвлення барвників	33
2.4 Статистичний аналіз	33
2. 5 Техніка безпеки.....	33
РОЗДІЛ 3	35
РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ.....	35
3.1. Вплив рН на швидкість знебарвлення барвників	35
3.2 Знебарвлення різних типів барвників у присутності ферментно- медіаторних системи.....	40
Індиго кармін	41
Метилловий оранжевий	42
Малахітовий зелений.....	44
3.3 Механізм процесу деколонізації барвників у присутності системи пероксидаза хрому – медіатор	46
3.4 Порівняння ефективності ваніліну і сирінальдегіду як медіаторів пероксидази хрому.....	48
ВИСНОВКИ	51
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	52

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

HRP – пероксидаза хрону;

T. versicolor – *Trametes Versicolor*;

Van – ванілін;

SA – сирінгальдегід;

АБТС – 2,2-азино-біс (3-етилбензтіазолін-6-сульфонова кислота);

PCET – протон-спряжений перенос;

HAT – перенос атома Гідрогена;

IC – індигокармін;

МО – метиловий оранжевий;

MalG – малахітовий зелений;

ФМС – ферментно-медіаторна система;

HBT – 1-гідроксибензотріазол;

ISA – ізатин-5-сульфокислота;

ϵ – коефіцієнт екстинції;

SAA – 5-сульфоантранілова кислота;

ПАР – поверхнево- активні речовини;

TEMPO – 1,1,6,6-тетраметилпіперидин-*N*-оксил.

PhOH – фенольна сполука;

PhO[•] – феноксильний радикал;

E – редокс потенціал;

HIPD – 3-(гідроксііміно)пентан-2,4-діон.

ВСТУП

Актуальність теми

Проблема очищення стічних вод від стійких забруднювачів, таких як фармацевтичні препарати, пестициди, гербіциди, барвники та мікропластик, є однією з найскладніших у сучасній екології та інженерії водоочищення. Це зумовлено тим, що такі речовини повільно розкладаються в природних умовах і неефективно видаляються стандартними методами очищення. До недоліків традиційних фізичних і хімічних підходів належать висока вартість, обмежена здатність до деградації забруднювачів і утворення небезпечних побічних продуктів. У зв'язку з цим актуальним є застосування ефективних та екологічно безпечних методів видалення й розкладання екополютантів, зокрема ферментативних процесів. Значний науковий інтерес викликає використання оксидоредуктаз для деградації органічних забруднювачів, що пояснюється їхньою здатністю окислювати широкий спектр сполук, знижувати токсичність утворених метаболітів, а також забезпечувати високу ефективність процесу завдяки низьким енерговитратам і можливості працювати в широкому діапазоні концентрацій.

Барвники стали незамінними для сучасного життя, широко використовуються в харчовій, текстильній, фармацевтичній, медичній та косметичній промисловості. Необхідність очищення стічних вод від барвників зумовлена їхньою високою хімічною стійкістю, резистентністю до біодеградації та здатністю накопичуватися в навколишньому середовищі. Барвники, що надходять у водні об'єкти разом із промисловими стоками, можуть спричиняти токсичний вплив на гідробіоти, порушувати процеси фотосинтезу через зниження проникності світла та погіршувати загальний екологічний стан водних екосистем. Крім того, деякі класи барвників і продукти їхнього розкладання характеризуються мутагенними та канцерогенними властивостями, що

становить потенційну загрозу для здоров'я людини. У зв'язку з цим розроблення ефективних, економічно доцільних та екологічно безпечних методів видалення барвників зі стічних вод є актуальним науково-практичним завданням.

Мета дослідження: порівняти ефективність біокаталітичних систем, що містять пероксидазу хрону і природні фенольні медіатори (ванілін або сирінгальдегід) в процесах деградації синтетичних барвників.

Для реалізації поставленої мети вирішувалися наступні **завдання:**

- 1) Визначити $\lambda_{\max}$ смуг поглинання буферних розчинів і коефіцієнти екстинкції ϵ індигокарміну, метилового оранжевого і малахітового зеленого;
- 2) Визначити оптимуми рН для процесів деколоризації досліджуваних барвників у присутності біокаталітичних систем;
- 3) Вивчити субстратну специфічність пероксидазу хрону по відношенню до синтетичних барвників;
- 4) Порівняти ступінь деколоризації барвників при використанні біокаталітичних систем на основі пероксидазу хрону і природних фенольних медіаторів – ваніліну і сирінгальдегіду.

Об'єкти дослідження: пероксидаза хрону і природні редокс медіатори ванілін і сирінгальдегід, синтетичні барвники індигокармін, метиловий оранжевий, малахітовий зелений.

Предметом дослідження є біокаталітичні системи пероксидазу хрону – ванілін, пероксидаза хрону – сирінгальдегід.

Метод дослідження: метод УФ-видимої спектроскопії для вивчення кінетики деколоризації барвників в присутності ферментно-медіаторних систем.

Апробація результатів дослідження відображена у публікації тез доповіді на міжнародній конференції:

Пухно Н. Г., Якута П. О., Гордєєва І. О., Куц О. В. Природні медіатори оксидоредуктаз у процесах знебарвлення синтетичних барвників: порівняльне дослідження. Хімічні проблеми сьогодення (ХПС-2026): збірник тез доповідей IX Міжнародної (XIX Української) наукової конференції студентів, аспірантів і молодих учених, 24–26 березня 2026 р., Вінниця. Вінниця, 2026. С. 24. DOI: <https://jhps.donnu.edu.ua/article/view/19608>.

РОЗДІЛ 1

ОКИСЛЮВАЛЬНА ДЕГРАДАЦІЯ СИНТЕТИЧНИХ БАРВНИКІВ ФЕРМЕНТНО-МЕДІАТОРНИМИ СИСТЕМАМИ

1.1 Оксидоредуктази як універсальні каталізатори для деградації екополлютантів

Оксидоредуктази (КФ 1) є великим класом ферментів, які каталізують перенесення електронів від донорів (відновників) до акцепторів (окисників) [1]. У сфері екологічної біотехнології ці ферменти розглядаються як універсальний і потужний інструмент для руйнування широкого кола ксенобіотиків, включаючи феноли, фармпрепарати, поверхнево-активні речовини, пестициди та синтетичні барвники [2].

Широка субстратна специфічність є незаперечною перевагою оксидоредуктаз. На відміну від багатьох інших ферментів, які вимагають суворої відповідності структури субстрату активному центру, оксидоредуктази (особливо лаккази грибів білої гнилі та рослинні пероксидази) здатні одночасно атакувати різноманітні за будовою ароматичні молекули. Ця властивість робить їх ідеальними для очищення реальних промислових стоків, які ніколи не містять лише один тип забруднювача, а є складними сумішами барвників різних класів. Така універсальність дозволяє замінити багато специфічних хімічних реагентів однією ферментативною системою, що значно спрощує технологічний процес очищення [3].

Процес ферментативної деградації зазвичай розпочинається з одноелектронного окиснення субстрату, що веде до утворення вільних радикалів. Ці радикали є надзвичайно реакційноздатними й вступають у подальші спонтанні реакції: деметилування, декарбоксилювання та розрив

ароматичних кілець. На відміну від використання цілих мікробних клітин, застосування ізолюваних ферментів дозволяє уникнути проблем, пов'язаних із токсичністю високих концентрацій барвників для живих організмів, яка часто пригнічує їхній метаболізм або призводить до загибелі культури.

1.1.1 Пероксидаза хрону: структура, механізм дії, застосування

Рослинні пероксидази представлені великими мультигенними родинами та беруть участь у метаболізмі активних форм кисню, синтезі й деградації гормонів, рості плодів, захисних реакціях, а також у формуванні та підтриманні клітинної стінки. Завдяки цьому рослинні пероксидази привернули значну увагу дослідників і стали однією з найкраще вивчених груп ферментів [4].

Пероксидази є важливими ферментами для очищення стічних вод, оскільки здатні каталізувати окислення широкого спектра стійких органічних сполук. До цієї родини належать різні представники, зокрема пероксидаза сої, пероксидаза хрону, марганцева пероксидаза, хлорпероксидаза та лігнінпероксидаза, які найчастіше застосовуються в біоремедіації стічних вод [5]. Незважаючи на відмінності у здатності окислювати субстрати, ці ферменти мають подібний каталітичний механізм, як показано на рис. 1.1.

Більшість пероксидаз є гемовими білками, що містять іон заліза, вбудований у протопорфіринове кільце. У ході реакції гемове залізо (II) в активному центрі пероксидази спочатку окислюється пероксидом водню з утворенням високоокисненої проміжної Сполуки I, тоді як H_2O_2 відновлюється до води. Далі Сполука I послідовно відновлюється у двох одноелектронних етапах, окислюючи субстрати-донори електронів, такі як аміни, індоли, ароматичні феноли та фенольні кислоти, і зрештою повертаючи фермент до вихідного стану. Перший етап відновлення супроводжується утворенням Сполуки II та вільного радикала. Потім Сполука II відновлюється до нативного стану ферменту шляхом окиснення ще однієї молекули субстрату. Радикальні

продукти, що утворюються внаслідок двох послідовних одноелектронних переносів, можуть полімеризуватися з утворенням димерів, тримерів та олігомерів або виступати субстратами в наступних реакціях.

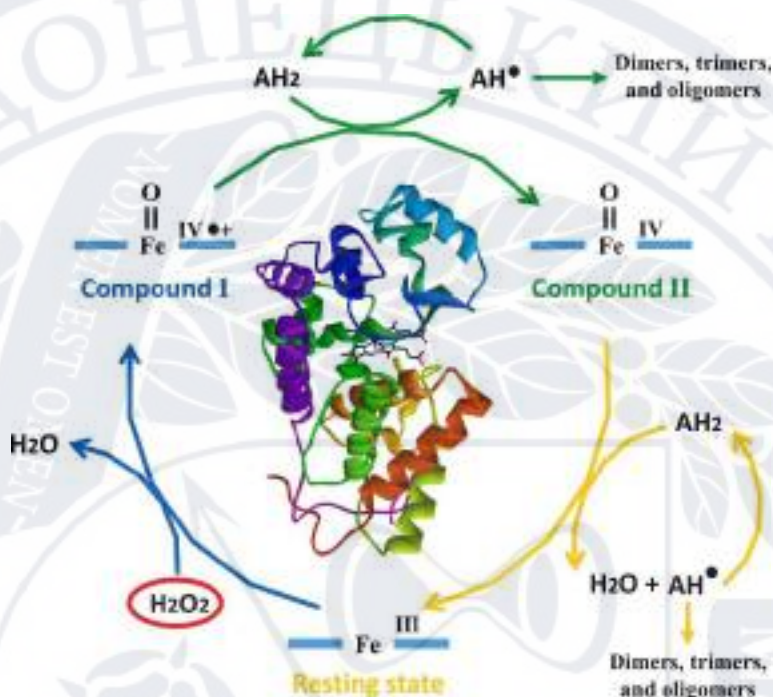


Рис. 1.1. Загальний каталітичний цикл пероксидази хрону. AH_2 – субстрат, що окислюється, а $AH^\bullet$ – його радикальний продукт [6].

Пероксидаза хрону (HRP, EC 1.11.1.7) – це класична рослинна оксидоредуктаза, що містить гем та два іони кальцію, які підтримують структурну цілісність активного центру [7]. HRP – це один із найвідоміших і найбільш доступних у комерційному плані ферментів, який упродовж останніх десятиліть активно використовується у різноманітних галузях науки й технологій. Особливу увагу цей фермент привернув завдяки своїй високій каталітичній активності, відносній стабільності та здатності окислювати широкий спектр органічних субстратів у м'яких умовах. Саме ці властивості зумовили його широке застосування, зокрема в органічному синтезі [8] та

біореMediaції [9]. Важливо, що такі реакції часто відбуваються за екологічно безпечних умов – у водних розчинах, при помірних температурах і без необхідності застосування токсичних реагентів. Це робить HRP привабливим інструментом у контексті «зеленої хімії» та сталого розвитку хімічних технологій.

Пероксидази схильні до розщеплення поліароматичних вуглеводнів, барвників, фармацевтичних сполук, агрохімікатів, фенолів та інших високонебезпечних органічних забруднювачів, що містяться в промислових стічних водах. Таким чином, HRP виступає як ефективний і універсальний біокатализатор, що відкриває широкі можливості для органічного синтезу та біореMediaції. Використання HRP не лише розширює спектр доступних хімічних перетворень, але й сприяє впровадженню екологічно дружніх підходів у сучасну хімію, що є особливо важливим у контексті розвитку медичних і фармацевтичних технологій.

1.1.2 Медіатори оксидоредуктаз

Хоча оксидоредуктази мають широку субстратну специфічність, деякі сполуки (нефенольні структури або субстрати з високим редокс-потенціалом) не можуть окислюватися ферментом безпосередньо. Для подолання цього обмеження використовують ферментно-медіаторні системи (ФМС).

Медіатори – це низькомолекулярні сполуки, які діють як «електронні човники». Фермент спочатку окислює медіатор до високореакційного радикалу, який завдяки своїм малим розмірам може проникати всередину складних структур барвників, недоступних для активного центру ферменту, та окислювати їх хімічним шляхом. Після реакції медіатор повертається у вихідну форму і може

бути знову окислений ферментом. На Рис. 1.2 показано механізм дії лакказно-медіаторної системи в процесі окислення субстрату:

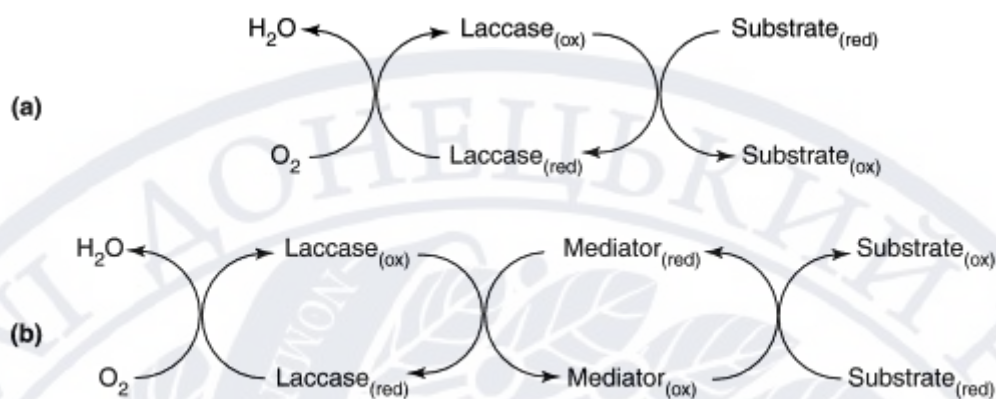


Рис. 1.2 Механізм дії лакказно-медіаторної системи: а) пряме окислення субстрату ферментом, б) опосередковане окислення з використанням медіатора.

До найефективніших медіаторів належать (Рис. 1.3):

- **ABTS** (2,2'-азино-біс(3-етилбензотіазолін-6-сульфонова кислота): забезпечує швидке окиснення в лабораторних умовах.
- **HBT** (1-гідроксибензотріазол): дозволяє оксидоредуктазам деградувати до барвники різної природи.
- **TEMPO** (2,2,6,6-тетраметилпіперидин-1-локсил): високоефективний для розкладання різноманітних екополютантів;
- **Природні медіатори**: сирінгальдегід, ацетосирингон та ванілін, які є продуктами розпаду лігніну і екологічно безпечною альтернативою синтетичним сполукам.

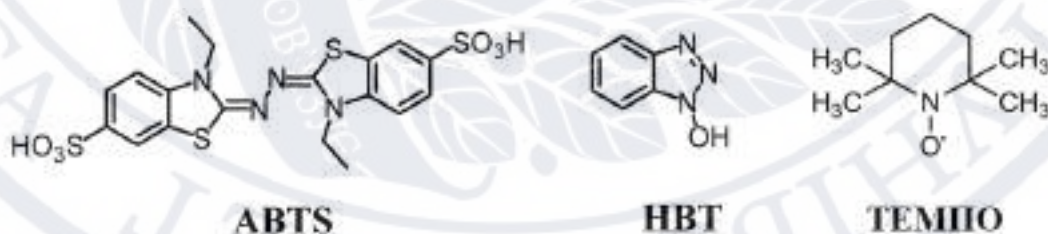


Рис. 1.3 Синтетичні медіатори оксидоредуктаз

1.2 Синтетичні барвники: класифікація за хімічною структурою

Колір барвника зумовлений хромофорами (групи з кратними зв'язками, як-от $-N=N-$, $C=O$) та ауксохромами ($-OH$, $-NH_2$, $-SO_3H$), що підсилюють забарвлення та забезпечують розчинність.

1.2.1 Індигокармін

ІС — найдавніший синтетичний кислотний барвник (Saxon blue), вперше отриманий у 1740 році, відомий у IUPAC як 3,3'-діоксо-2,2'-біс-індоліден-5,5'-дисульфонат натрію, є водорозчинним похідним природного індиго. Структурне ядро молекули базується на двох індольних кільцях, з'єднаних центральним подвійним зв'язком $C=C$, який є основою хромофорної системи [10]. Введення сульфогруп у положення 5 та 5' забезпечує високу розчинність у воді, що робить його зручним для кислотного фарбування вовни та шовку, на відміну від базового індиго, яке потребує складного відновлювального чанового процесу.

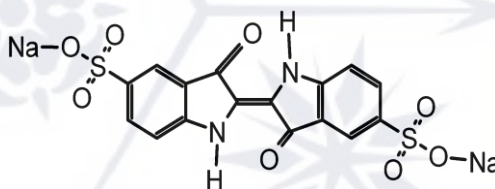


Рис. 1.4 Структура ІС

Стабільність ІС у водному середовищі є низькою. Встановлено, що при рН від 3 до 5 барвник помітно вицвітає протягом тижня, при нейтральному рН 7 процес прискорюється, а при лужному рН 8 відбувається повне знебарвлення. Це робить ІС одним із найменш стабільних харчових барвників та складним компонентом для тривалого зберігання текстильних виробів [11].

Табл. 1.1 Основні характеристики ІС як об'єкта дослідження

Параметр	Значення/Опис
Класифікація барвника	Індигоїдний, кислотний
Колір у розчині	Синій (нейтральний/кислий), зелений/жовтий (лужний)
Розчинність у воді	1,6 г/100 мл при 25 °С
Максимум поглинання (λ_{max})	614 нм
Світлостійкість	Низька (порівняно з індиго)
Токсичність (LD50 для щурів)	250 мг/кг

Процес знебарвлення ІС полягає у руйнуванні системи спряжених подвійних зв'язків [12]. Це може відбуватися шляхом фотолізу, хімічного окислення або ферментативного каталізу. Одним із найцікавіших аспектів хімії ІС є його здатність реагувати з озоном та супероксидними радикалами. Довгий час втрата кольору ІС використовувалася в медицині як тест на утворення озону нейтрофілами людини. Однак детальні дослідження показали, що супероксид-радикал $\text{O}_2^{\cdot-}$, генерований ксантиноксидазою, викликає ідентичне знебарвлення барвника з утворенням тієї самої ізатин-5-сульфо кислоти. Експерименти з ізотопним маркуванням води (H_2^{18}O) продемонстрували, що кисень, який включається в структуру ізатину, походить саме з молекул води або розчиненого кисню, що робить реакції з озоном та супероксидом практично невідрізними за кінцевими продуктами. Таким чином, знебарвлення індигокарміну є універсальним індикатором окиснювального стресу, але не селективним для озону [13].

Найбільш перспективним методом детоксикації промислових стоків є використання оксидоредуктаз, зокрема лакказ і пероксидаз, хоча останні вивчені значно менше. Проте ІС не завжди є прямим субстратом для оксидоредуктаз

через свій високий окисно-відновний потенціал або стеричну недоступність до активного центру ферменту. Для подолання цього бар'єру використовують лакказно-медіаторні системи (LMS). Наприклад, дослідження Зосенко та спів. [11] представили новий ефективний медіатор — 3-(гідроксііміно)пентан-2,4-діон (HIPD). HIPD є недорогим, нетоксичним та добре розчинним у воді аліфатичним оксимом. Встановлено, що система лаккази з *Trametes versicolor* та HIPD забезпечує майже 100% біодеградацію ІС протягом 3 годин. Помилка! Закладку не визначено.

Іншим широко вивченим медіатором є TEMPO (2,2,6,6-тетраметилпіперидин-1-оксил) [12]. На відміну від оксимів, окислення за участю TEMPO протікає за іонним механізмом через утворення оксоамонієвого катіона. Система лаккази/TEMPO продемонструвала здатність знебарвлювати високі концентрації ІС (0,5 г/л) за 5–7,5 годин.

Табл. 1.2 Порівняльна ефективність різних медіаторів у ІС знебарвленні

Медіатор	Тип механізму	Час знебарвлення	Стабільність системи
HIPD	Радикальний (PCET/HAT)	3 години (100%)	Висока, не інактивує фермент
TEMPO	Іонний (оксоамоній)	5 годин (100%)	Низька, потребує CuCl ₂ для захисту
Ванілін	Радикальний (фенольний)	24 години	Середня, екологічно безпечний
HBT	Радикальний (N-OH)	0,5–3 години	Висока ефективність, але токсичність

Однак TEMPO має суттєвий недолік — він інактивує фермент. Встановлено, що в присутності 1,5 мМ TEMPO лаккази повністю втрачає активність протягом 96 годин. Цікаво, що додавання ІС сповільнює цей процес, оскільки барвник виступає як "пастка" для активних радикалів, відволікаючи їх від атаки на амінокислотні залишки ферменту. Для стабілізації лаккази в таких

системах успішно застосовують іони міді. Додавання CuCl_2 дозволяє підтримувати активність ферменту на рівні 100% навіть після 72 годин інкубації з медіатором.

Ключовим моментом у розумінні знебарвлення IC є ідентифікація кінцевих продуктів. При розриві центрального подвійного зв'язку молекула розпадається на два фрагменти. Основними метаболітами, ідентифікованими за допомогою ВЕРХ -хроматографії, є [12, 11]:

- Ізатин-5-сульфо кислота (ISA): Первинний продукт окиснення. Має слабо-жовте забарвлення, що пояснює зміну кольору розчинів при неповному знебарвленні.
- 5-сульфоантранілова кислота (SAA): Продукт подальшого розщеплення ізатинового кільця.
- Антранілова кислота (AA): Утворюється при десульфонуванні або як результат глибокої деградації.

Механізм передбачає атаку радикалу (наприклад, TEMPO або HIPD-радикалу) на центральний зв'язок, що призводить до втрати спряження і, як наслідок, зникнення синього кольору. Оскільки ці продукти є значно менш токсичними, ніж вихідний барвник, процес ферментативного знебарвлення одночасно є процесом детоксикації.

Токсичність IC ($\text{LD}_{50} = 250 \text{ мг/кг}$) зумовлює необхідність його видалення зі стічних вод перед їх скиданням у водойми. Окрім прямого впливу на здоров'я людини, барвник перешкоджає проникненню світла в товщу води, що пригнічує фотосинтез водних рослин. Для оцінки ефективності детоксикації використовують фітотоксичні тести, зокрема на насінні люцерни (*Medicago sativa*). Дослідження системи лаккази-HIPD показали (Табл. 1.3), що після обробки барвника спостерігається значне поліпшення показників росту рослин [11]:

Табл. 1. 3 Результати фітотоксичного тесту (*Medicago sativa*) після обробки
LMS-HIPD

Показник	Вихідний барвник (IC)	Після обробки (LMS)	Покращення (%)
Проростання насіння	65%	100%	+35% 1
Пригнічення росту коренів	50%	21%	-29%

Аналогічні результати отримані для системи з TEMPO, де продукти деградації (ISA та SAA) не виявляли інгібуючого впливу на біологічні об'єкти, що підтверджує екологічну безпеку пропонуєваних методів.

Для практичного застосування важливо, щоб система працювала в умовах реальних текстильних стоків, які містять велику кількість солей (Na_2SO_4) та миючих засобів. Встановлено, що система лаккази/TEMPO знебарвлює IC у імітованому стоку навіть швидше (5 годин), ніж у чистому буфері (7,5 годин). Це може бути пов'язано з іонним ефектом, який сприяє стабілізації перехідних станів реакції. Система з HIPD також продемонструвала високу толерантність до компонентів фарбувальних ванн, досягаючи 92% знебарвлення азобарвників та 100% індигокарміну в присутності сульфату натрію протягом тижня. Це відкриває можливості для створення циклічних систем очищення води безпосередньо на підприємствах.

Дослідження знебарвлення IC розкриває складну картину взаємодії хімічної структури барвника з навколишнім середовищем. Низька стабільність центрального хромофора, з одного боку, створює проблеми для збереження історичного текстилю, а з іншого – надає можливість для ефективної біодеградації.

Використання лакказно-медіаторних систем (зокрема з HIPD та TEMPO) дозволяє досягати повного знебарвлення та детоксикації ІС, перетворюючи його на безпечні метаболіти, такі як ізатин-5-сульфо кислота та антранілова кислота. Ключовим фактором успіху є оптимізація параметрів (рН 4,5, присутність іонів міді), що забезпечує стабільність ферментів у агресивному середовищі. Подальший розвиток цього напрямку дозволить інтегрувати біокаталітичні методи в промислові цикли, забезпечуючи захист водних екосистем від синтетичних забруднювачів.

1.2.2 Метилоранжевий

Метилоранжевий — класичний представник аніонних азобарвників (Рис. 1.5). Згідно з номенклатурою IUPAC, сполука ідентифікується як натрій 4-(4-(диметиламінофеніл)діазеніл)бензол-1-сульфонат. Структурне ядро молекули включає бензольне кільце, заміщене сульфогрупою ($-\text{SO}_3\text{Na}$), яка забезпечує високу гідрофільність та розчинність у воді, та друге бензольне кільце, що містить диметиламіногрупу ($-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), яка є сильним електронним донором. Саме ця конфігурація зумовлює інтенсивне поглинання світла у видимому спектрі. Барвник демонструє максимум поглинання (λ_{max}) при 464 нм у водному розчині за нейтрального рН [14]:

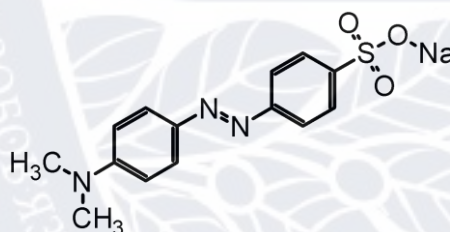


Рис. 1.5 Структура МО

Незважаючи на свою корисність, МО визнаний токсичною та потенційно канцерогенною речовиною. Основна небезпека полягає не стільки в самій молекулі барвника, скільки в продуктах його біотрансформації в організмах

савців та під дією навколишнього середовища [15]. При потраплянні в організм людини шляхом ковтання або через шкіру, МО піддається відновному розщепленню під дією азoredуктаз печінки та мікрофлори кишечника. Цей процес розриває зв'язок $-N=N-$, вивільняючи ароматичні аміни, зокрема сульфанілову кислоту та *N,N*-диметил-*n*-фенілендіамін. Останній є особливо небезпечним, оскільки він легко окиснюється до радикальних форм, які взаємодіють з ДНК, викликаючи мутації та потенційно призводячи до розвитку раку.

1.2.3 Малахітовий зелений

MalG — трифенілметановий барвник (Рис. 1.6), відомий мікрозабруднювач, який у значних концентраціях присутній у промислових стічних водах і становить загрозу для рослинного покриву. Цей барвник є небіорозкладною сполукою, здатною тривалий час зберігатися в навколишньому середовищі та проникати в харчові ланцюги. Він характеризується генотоксичною, мутагенною та канцерогенною дією на живі організми.

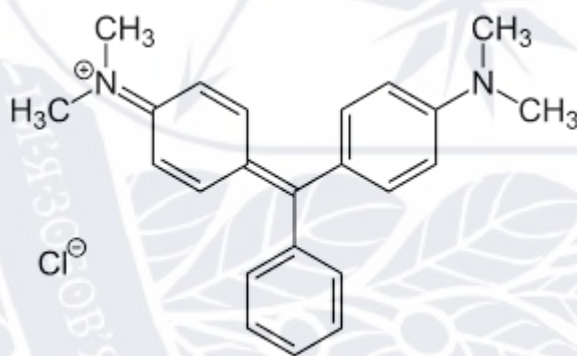


Рис. 1.6 Структура MalG

У сучасних умовах світова спільнота орієнтується на впровадження ефективних і водночас екологічно безпечних технологій очищення стічних вод, що не завдають додаткової шкоди екосистемам. Останнім часом як перспективні

агенти для видалення MalG активно досліджуються різні мікроорганізми та рослини. Біологічні метаболічні процеси та фіторе mediaція визначено як екологічно безпечні та ефективні підходи до деградації, видалення й детоксикації цього барвника. Окрема увага останнім часом приділяється функціональним особливостям різних видів рослин і їхнім метаболічним можливостям, що забезпечують успішне усунення MalG з довкілля [16].

1.3 Методи очистки стічних вод від барвників

Видалення барвників зі стічних вод здійснюється за допомогою комплексу фізичних, хімічних та біологічних методів, кожен з яких характеризується специфічними механізмами дії, рівнем ефективності та економічними показниками. Вибір конкретної технології залежить від хімічного складу барвника, його концентрації, а також необхідного ступеня мінералізації.

Фізичні методи традиційно вважаються надійними інструментами знебарвлення завдяки їхній здатності до швидкого видалення широкого спектру забруднювачів без суттєвої зміни хімічного складу води на початкових етапах. Проте головною рисою цих методів є те, що вони не руйнують молекулу барвника, а лише переносять її з розчину на твердий субстрат або концентрують у меншому об'ємі [17].

Мембранні технології, такі як ультрафільтрація, нанофільтрація та зворотний осмос, забезпечують високий ступінь очищення, дозволяючи видаляти навіть низькомолекулярні барвники та розчинені солі. Головною перевагою є можливість отримання чистої води для повторного використання в технологічному циклі. Однак застосування мембран супроводжується значними енергетичними витратами на створення високого тиску та проблемою забруднення мембран. Органічні молекули барвників та добавки (солі, ПАВ) накопичуються на поверхні мембрани, що призводить до падіння потоку та необхідності регулярної хімічної промивки, яка скорочує термін служби

обладнання. Окремою екологічною проблемою є ретентат (концентрат) – потік води, що містить надвисокі концентрації барвників. Скидання ретентату у водойми має катастрофічні наслідки, тому він потребує додаткової деструктивної обробки [18].

Хімічні методи очистки базуються на окиснювальній деструкції молекул барвників. Найбільш розповсюдженими є передові процеси окислення через реакцію Фентона, де ключовим агентом є гідроксильний радикал ($\text{OH}^\bullet$) — надзвичайно сильний окисник з редокс-потенціалом 2,8 В.

1.4 Біоремедіація як екологічна альтернатива фізико-хімічним методам

Біологічні методи очищення стічних вод від барвників розглядаються як найбільш екологічно безпечна та економічно вигідна альтернатива традиційним фізико-хімічним підходам. Як зазначається у комплексному огляді [19], присвяченому аналізу переваг біодеградації над фізико-хімічними методами, біологічний підхід став найпопулярнішим, добре зарекомендував себе як економічно ефективний та екологічно безпечний метод боротьби із забрудненням стічних вод барвниками. На відміну від традиційних методів, які часто утворюють токсичний шлам, біоремедіація забезпечує фундаментальну зміну хімічної структури поллютантів. Мікроорганізми та їх ферменти відіграють ключову роль у розщепленні органічних сполук та молекул барвників на менші метаболіти, перетворюючи їх на менш токсичні форми [20]. Біоремедіація забезпечує глибоку детоксикацію стічних вод. У порівнянні з традиційними методами, вона пропонує наступні переваги:

- Низькі енерговитрати: Процеси протікають за нормальних температур (25–40 °C) та атмосферного тиску, що не потребує значних витрат енергії на нагрівання або створення тиску [21].

- Екологічна безпека та детоксикація.
- Мінімальне утворення відходів: На відміну від процесу Фентона, біоремедіація не створює залізного шламу, що усуває витрати на його зневоднення, транспортування та захоронення.

Вирішальною перевагою ферментативної біоремедіації є здатність не просто знебарвлювати розчини, а й суттєво знижувати токсичність оброблених стічних вод. Високий окислювальний потенціал, низька субстратна специфічність та відсутність стеричної селективності роблять рослинні пероксидази та лаккази з грибів білої гнилі особливо цікавими для екологічного використання в процесах деградації екополлютантів [22].

Каталітичний цикл позаклітинних пероксидаз базується на двоелектронному процесі окислення в присутності H_2O_2 . На наступному етапі субстрати-донори електронів повертають окислену форму ферменту в початковий стан після двох послідовних етапів відновлення. Пероксидази є найширшими оксидоредуктазами грибах білої гнилі, які каталізують окислення широкого кола органічних сполук через чотириелектронне відновлення O_2 до води. Унікальні каталітичні системи на основі оксидоредуктаз пропонують різноманітність в окисленні фенольних та нефенольних сполук через радикальні процеси [23] і демонструють неймовірний потенціал для видалення стійких забруднювачів зі стічних вод.

ВИСНОВКИ З ЛІТОГЛЯДУ

Біокаталітичні системи на основі оксидоредуктаз є високоефективним інструментом для деградації синтетичних барвників. Головною перевагою цих ферментів є їхня надзвичайно широка субстратна специфічність, що дозволяє успішно видаляти складні суміші азобарвників, трифенілметанових та індигоїдних сполук. Використання медіаторів та іммобілізація на наноносіях забезпечують стабільність і економічну доцільність процесів біоремедіації, що відповідає глобальним цілям сталого розвитку у сфері захисту водних ресурсів. Однак практичне впровадження ферментативного очищення стічних вод від барвників супроводжується низкою суттєвих проблем. Насамперед, це обмежена стабільність ферментів у реальних умовах: коливання температури, рН, а також наявність інгібіторів у стічних водах можуть призводити до швидкої інактивації біокаталізаторів. У промислових стоках часто присутні важкі метали, поверхнево-активні речовини та інші токсиканти, що негативно впливають на активність ферментів.

Іншою важливою проблемою є висока вартість ферментів і складність їх багаторазового використання. Вільні ферменти зазвичай не підлягають ефективній регенерації, що обмежує економічну доцільність процесу. Хоча іммобілізація ферментів може підвищити їх стабільність і забезпечити повторне використання, вона часто супроводжується зниженням каталітичної активності та потребує додаткових витрат.

Крім того, ефективність ферментативного розкладання барвників залежить від їх хімічної структури. Деякі синтетичні барвники, особливо азобарвники, є стійкими до біодеградації, що вимагає застосування комбінованих методів очищення. У ряді випадків утворюються проміжні продукти, які можуть бути ще більш токсичними, ніж вихідні сполуки, що потребує додаткового контролю та доочищення.

Ще одним викликом є масштабування процесів: результати, отримані в лабораторних умовах, не завжди легко відтворити на промисловому рівні. Це пов'язано з необхідністю оптимізації масопереносу, підбору ефективних реакторів та забезпечення стабільної роботи системи впродовж тривалого часу. Таким чином, попри значний потенціал ферментативних методів очищення стічних вод від барвників, їх широке застосування стримується технологічними, економічними та екологічними обмеженнями. Подальші дослідження спрямовані на підвищення стабільності ферментів, зниження вартості процесів і розробку комбінованих підходів, що поєднують ферментативні та фізико-хімічні методи очищення.

РОЗДІЛ 2

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1. Об'єкти дослідження

Пероксидаза хрону (HRP), медіатори ванілін (Van), сирінальдегід (SA) та барвники індигокармін (IC), метиловий оранжевий (МО) були отримані від Sigma-Aldrich та використані без додаткової обробки.

Структурні формули HRP, медіаторів Van та SA і барвників IC, МО та MG наведено на рисунках 2.1-2.3.



Рис. 2.1. Структурна формула пероксидази хрону

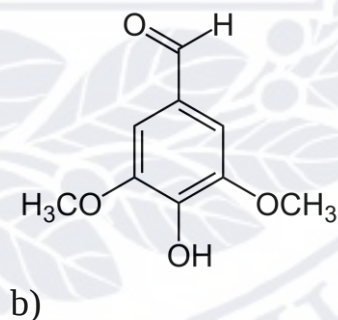
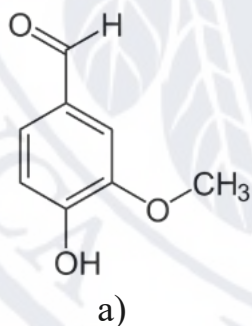
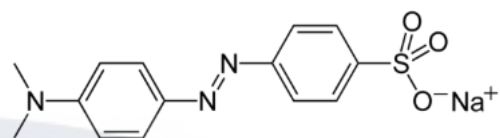
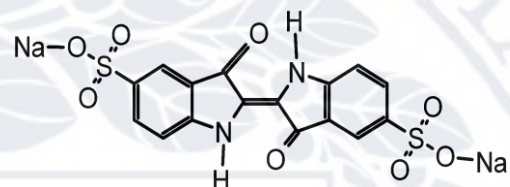


Рис. 2.2. Структурні формули медіаторів Van (a) і SA (б)

Метиловий оранжевий



Індигокармін



Малахітовий зелений

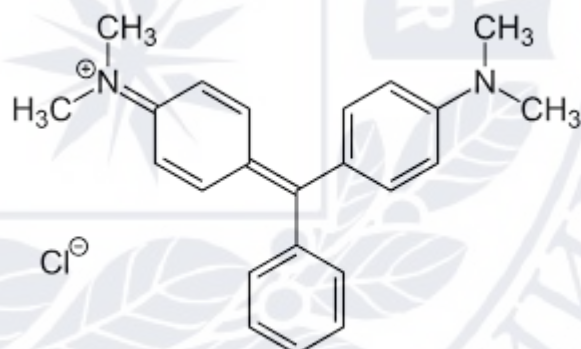


Рис. 2.3 Структурні формули барвників ІС (а), МО (б) та МГ (в).

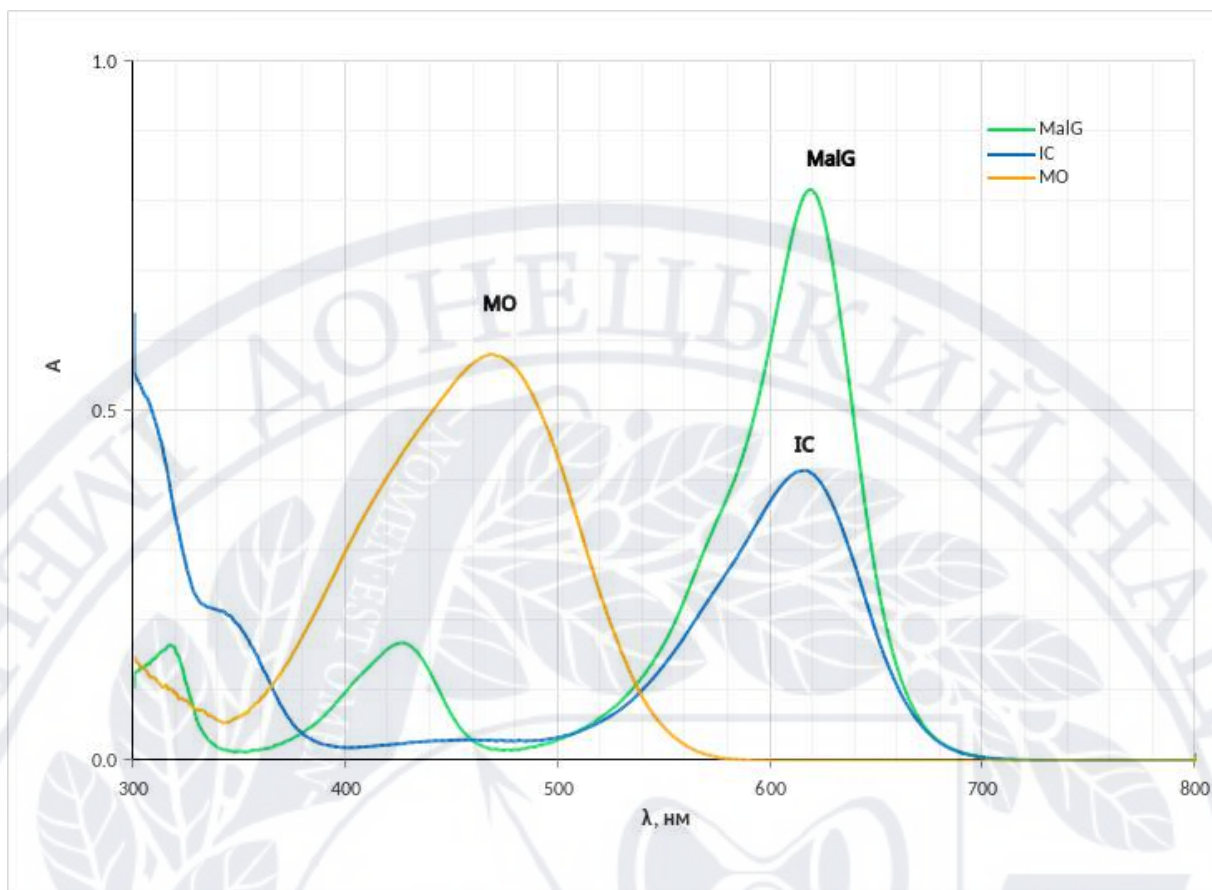


Рисунок 2.4 УФ-видимі спектри барвників

На рисунку 2.4 наведено спектри поглинання барвників у воді. Розчини Van і SA не поглинають у видимій частині спектру і не перешкоджають проведенню досліджень (Рис. 2.5). Максимальне поглинання МО спостерігається за довжини хвилі, що становить 471 нм. Для IC характерний максимум поглинання при 614 нм, а спектр MalG демонструє пік при 618 нм (Табл. 2.1).

Таблиця 2.1 – Довжини хвиль максимумів поглинання досліджуваних барвників у ЦБС 4.5

Сполука	λ_{max} , нм
IC	614
MO	471
MalG	618

Чітке розмежування максимумів поглинання медіаторів і барвників у видимій області дозволяє ефективно проводити моніторинг процесу їх одночасного або роздільного знебарвлення спектрофотометричним методом.

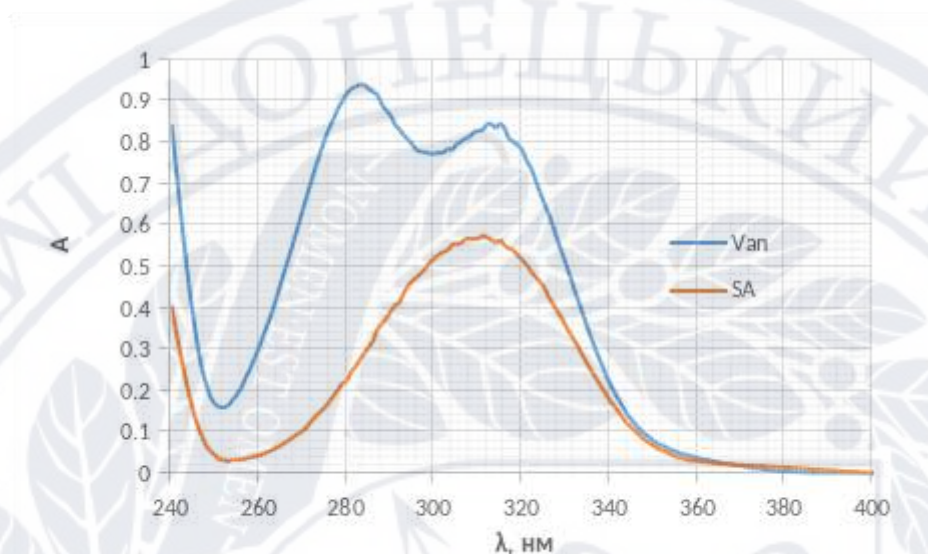


Рис. 2.5 УФ-видимі спектри медіаторів Van і SA

2.2 Підготовка та приготування реактивів

2.2.1 Приготування буферних систем

Цитратно-фосфатний буферний розчин $pH = 2,5-5,5$ готується шляхом змішування свіжоприготованих $0,2\text{ M}$ розчину лимонної кислоти та $0,2\text{ M}$ розчину гідрофосфату натрію.

Ацетатний буферний розчин $pH = 3,5-5,5$ готується шляхом змішування свіжоприготованих $0,2\text{ M}$ розчину ацетату натрію та $0,2\text{ M}$ розчину оцтової кислоти.

Фосфатний буферний розчин $pH = 6,0-8,0$ готується шляхом змішування свіжоприготованих $0,2\text{ M}$ розчину гідрофосфату натрію та $0,2\text{ M}$ розчину дигідрофосфату натрію.

Значення рН приготованих буферних розчинів вимірювали за допомогою іонометра.

2.2.2 Приготування розчинів ферментів

Розчин HRP готували шляхом розчинення 0,0040 г ферменту в 10 мл ацетатної буферної системи, з подальшим розведенням таким чином щоб концентрація HRP у реакційній суміші складала 3,0 мкг/мл.

2.3 Методи дослідження

2.3.1 Метод УФ-видимої спектроскопії для вивчення кінетики деколоризації барвників

Дослідження проводили за допомогою спектрофотометричного методу з використанням спектрофотометра SPECORD 50 (Analytik Jena, Німеччина), кварцових кювет з товщиною поглинаючого шару 1 см. УФ-спектр записували у діапазоні 190 – 1100 нм за температури 35 °С. Отримані значення оптичної густини пропорційні концентрації досліджуваної речовини у розчині і ґрунтуються на законі Бугера–Ламберта–Бера (2.1):

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C, \quad (2.1)$$

де, A – оптична густина розчину;

C – молярна концентрація речовини, яка поглинає світло, моль/л;

ε – молярний коефіцієнт поглинання, л/(моль·см).

Для визначення коефіцієнтів екстинкції барвників ε , було приготовано серію розчинів з різними концентраціями. На рисунку 2.6 наведено

калібрувальний графік барвника МО при рН=5,5. За кутовим коефіцієнтом нахилу лінійної залежності оптичної густини від концентрації барвника, визначено молярний коефіцієнт поглинання метилового оранжевого $\varepsilon = 25665$ л/моль·см.

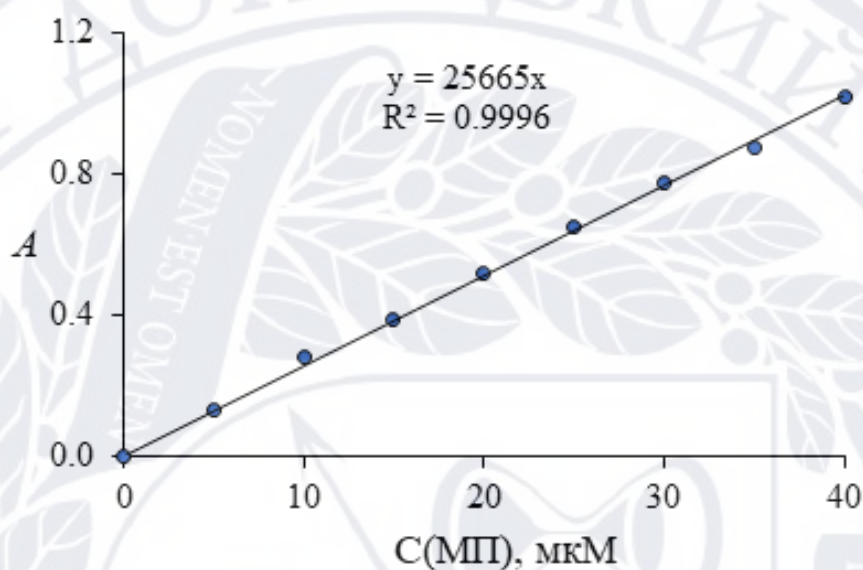


Рис. 2.6 Калібрувальний графік МО у цитратно-фосфатній буферній системі рН 4.5

2.3.2 Вплив рН на знебарвлення барвників

Вплив рН на швидкість знебарвлення барвників вивчали шляхом обробки 0,1 мл барвників (20 мкМ) у присутності 0,1 мл HRP (0,15 U/мл), 0,1 мл H_2O_2 (3 мМ) та 0,1 мл Van (50 мкМ) або SA (50 мкМ) з використанням 2,6 мл відповідного буфера (0,1 М) у кварцовій кюветі об'ємом 3,0 мл. рН змінювали в діапазоні рН 2.5–8 з інтервалами в 0.5 одиниці рН. Реакційні суміші витримували при 35 °С протягом 30 хвилин, а отримані значення поглинання вимірювали при $\lambda_{\max}$ барвників.

2.3. Експерименти зі знебарвлення барвників

Знебарвлення барвників вивчали шляхом моніторингу зменшення поглинання розчинів при максимальній довжині хвилі кожного барвника за допомогою аналітичного спектрофотометра Jena SPECORD 50 UV-Vis, оснащеного термостатованим тримачем для кювет. Кожна реакційна суміш містила HRP (30 мкг/мл, 0.15, U/мл), 0,1 мл H_2O_2 (3 мМ), 0,1 мл барвника (20 мкМ), 0,1 мл Van або SA (50 мкМ) та 2.6 мл буфера (0,1 М), що відповідав кожній системі при відповідному рН та 35 °С у 3,0 мл кварцових кюветах. Реакційні суміші витримували при 35 °С протягом 0.5, 1, 24 або 72 години і вимірювали абсорбцію при λ_{max} барвників. Ефективність знебарвлення або відсоток видалення кольору розраховували за рівнянням (2.2):

$$\% \text{ знеб.} = (A_0 - A_t) / A_0 \cdot 100\% \quad (2.2)$$

де A_0 та A_t – початкова абсорбція та після обробки у певний момент часу t . Контрольні зразки аналізували паралельно окремо з ферментом або медіатором. Для приготування розчинів використовували двічі дистильовану воду.

2.4 Статистичний аналіз

Усі експериментальні дані, зазначені в тексті та на графіках, є середніми значеннями трьох експериментів. Значення похибок є стандартними відхиленнями середнього значення ($\pm$ SD). Дані аналізували за допомогою Microsoft Excel.

2.5 Техніка безпеки

Перебуваючи в хімічній лабораторії, слід дотримуватися низки правил:

1. Переконайтесь, що робоче місце чисте і немає нічого зайвого на столі.

2. При роботі в хімічній лабораторії необхідно надягати халат з бавовняної тканини.
3. Для захисту рук від дії кислот, лугів, солей, розчинників застосовують гумові рукавички. На рукавичках не повинно бути порізів, проколів та інших пошкоджень.
4. Всі гріючі прилади встановлені на термоізолюючих підставках.
5. Забороняється експлуатація несправних лабораторних і нагрівальних приладів.
6. При зважуванні твердих речовин необхідно користуватися тарою, неприпустимо насипати речовини безпосередньо на вагову чашку.
7. Роботу з порошкоподібними речовинами для запобігання їх розпилення потрібно проводити в таких місцях, де немає протягів або сильного руху повітря.
8. Випадково розсипаний на стіл реактив не можна всипати назад в ту ж банку, де він зберігається.
9. Сухі речовини необхідно брати спеціальним шпателем.
10. Переконатись, що використовуваний реактив, — той, що необхідний, і співпадає з назвою на етикетці.
11. При змішуванні речовин слід використовувати спеціальні корки, забороняється затискати долонею і перемішувати.
12. Утилізація речовин відбувається в спеціально відведені місця.
13. Луги, кислоти та інші речовини набирати в піпетки гумовою грушею.
14. Після закінчення роботи переконайтесь, що робоче місце чисте, всі реактиви знаходяться на своїх місцях та всі електричні прилади вимкнені.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Вплив рН на швидкість знебарвлення барвників

В умовах ферментативного окислення початковий рН є одним із найважливіших параметрів, що визначає ефективність розкладання забруднюючих речовин [24]. Це пов'язано з тим, що ферменти є білками, а їхня структура і активність суттєво залежать від концентрації іонів водню. По-перше, рН впливає на іонізацію активного центру ферменту. Багато амінокислот у складі активного центру можуть набувати або втрачати протони. Якщо рН змінюється, це змінює їхній заряд і здатність взаємодіяти із субстратом. У результаті фермент може або працювати ефективніше, або втрачати активність. По-друге, рН визначає просторову структуру ферменту. За надто кислих або лужних умов відбувається денатурація – руйнування вторинної та третинної структури білка. У такому стані фермент втрачає свою функцію. Кожен фермент має свій оптимальний рН, при якому його активність максимальна. По-третє, рН впливає на ступінь іонізації субстрату, що також визначає швидкість реакції, адже взаємодія фермент–субстрат залежить від їхніх зарядових характеристик. Отже, значення рН: регулює активність ферментів, визначає їхню структурну стабільність, забезпечує специфічність і швидкість каталізу.

рН розчину значно впливає на процес знебарвлення барвників, викликаючи депротонування, а також структурні перебудови медіаторів і субстратів. Наприклад, малахітовий зелений є катіонним барвником, і його зарядовий стан змінюється в залежності від рН середовища. Це впливає на його розчинність, здатність зв'язуватися з активним центром ферменту, швидкість окисно-відновних реакцій.

У зв'язку з цим було вивчено вплив рН на ефективність видалення забарвлення для кожного барвника з використанням розчинів при однакових значеннях решти всіх параметрів. Ефективність знебарвлення визначали при різних значеннях рН (2,0–8,0) через 30 хв інкубації.

Встановлено, що оптимальний рН для деколоризації барвників у досліджуваних каталітичних системах HRP-Van та HRP-SA завжди перебуває в кислій області з поступовим зниженням до нейтрального рН, що типово для оксидоредуктаз (Рис. 3.1-3.6, Табл.3.1). Таким чином, оптимальні значення рН залежать від природи ферменту, типу медіатора і субстрату. Пероксидаза демонструє максимальну ферментативну активність у діапазоні рН 3,5–6,0. У цих умовах Van та SA переважно знаходяться у молекулярній формі, оскільки значення рКа для медіаторів становлять 7,3 та 7,4 для SA та Van, відповідно [25]. Одноелектронне окислення фенолів є дисоціативним переносом електрона та включає втрату протона: $\text{PhOH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{PhO}^- + \text{H}_3\text{O}^+ + e^-$, і тому їх окисно-відновні потенціали залежать від рН. Окислення фенолят-іонів призводить до утворення феноксильних радикалів: $\text{PhO}^- \rightarrow \text{PhO}^\bullet + e^-$. З підвищенням рН зростає частка депротонованої (аніонної) форми фенолів, що сприяє їх окисненню оксидоредуктазами за механізмом PCET з утворенням реакційноздатних феноксильних радикалів. Проте за високих значеннях рН спостерігається різке зниження активності ферментів. Падіння ефективності ФМС відзначається при $\text{pH} \leq 3,5$ та ≥ 6 внаслідок впливу іонів H^+ та OH^- на заряджені ділянки ферментів. Це призводить до руйнування водневих зв'язків та дисульфідних містків білків [26], а також до порушення мережі водневих зв'язків у гемовій кишені пероксидази [27].

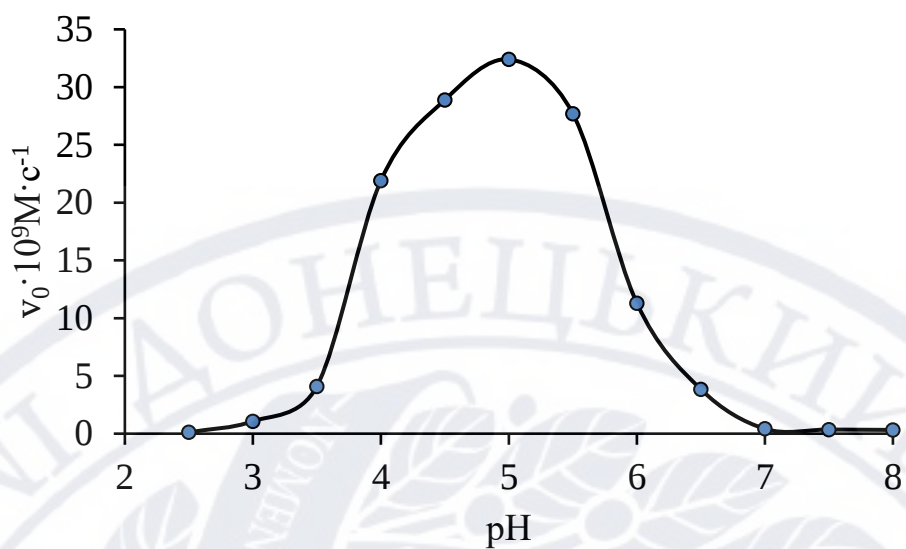


Рис. 3.1 Залежність швидкості знебарвлення ІС від рН розчину в присутності системи HRP – SA.

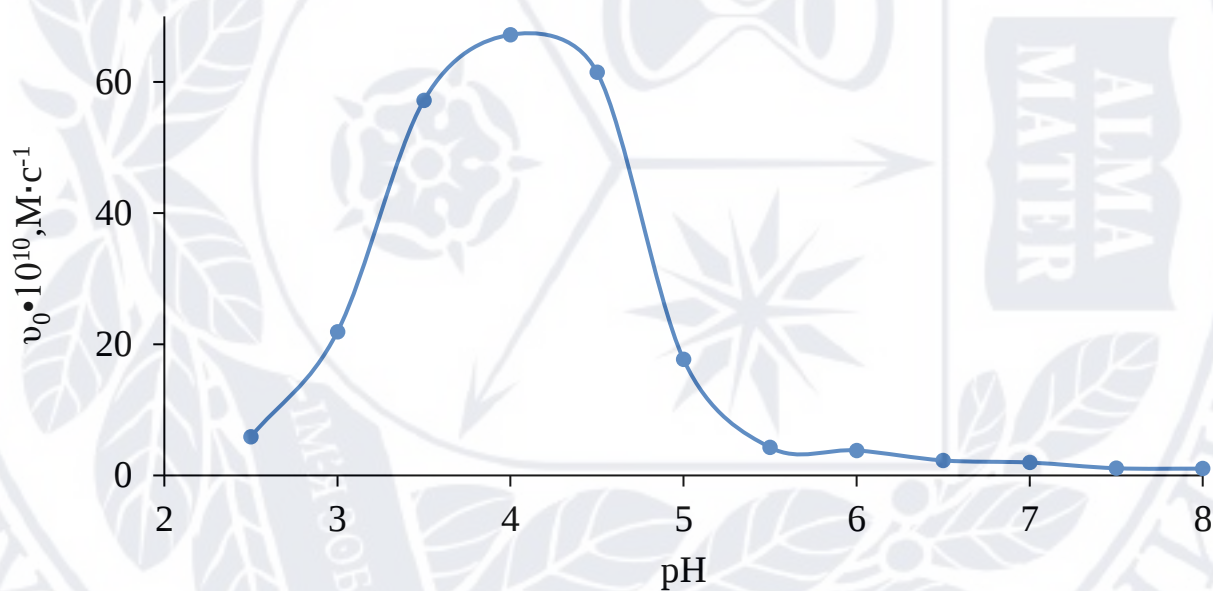


Рис. 3.2 Залежність швидкості знебарвлення МО від рН розчину в присутності системи HRP – SA.

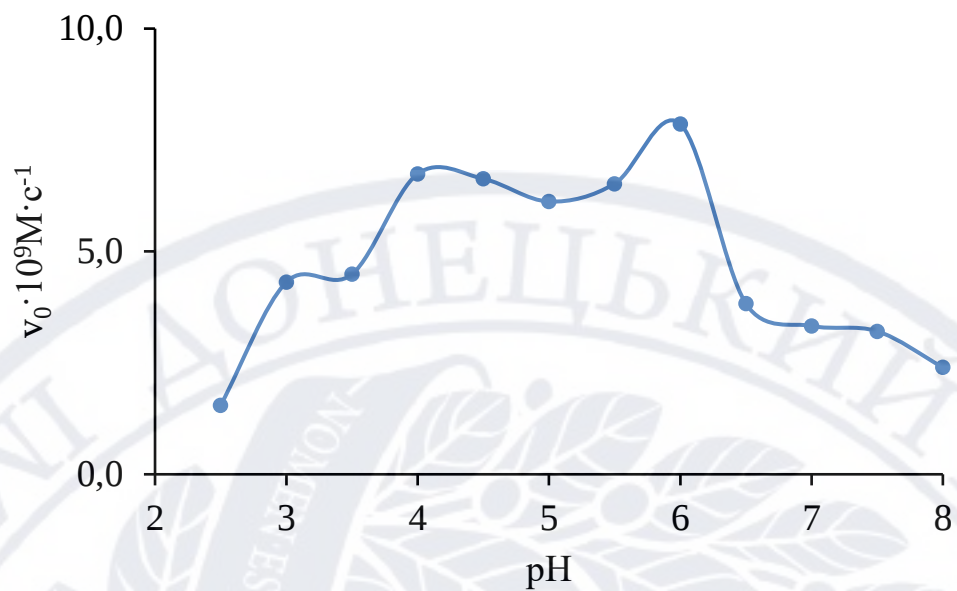


Рис. 3.3 Залежність швидкості знебарвлення MalG від рН розчину в присутності системи HRP – SA.

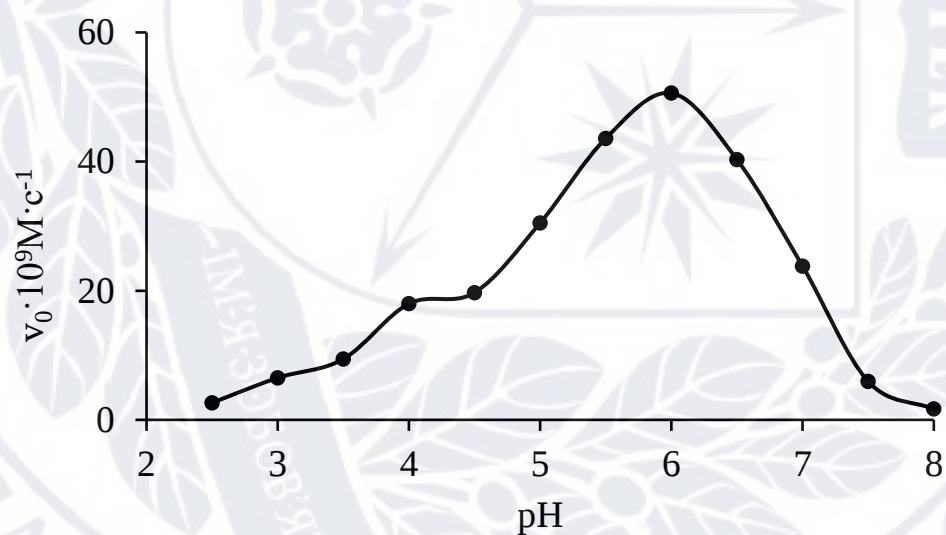


Рис. 3.4 Залежність швидкості знебарвлення IC від рН розчину в присутності системи HRP – Van.

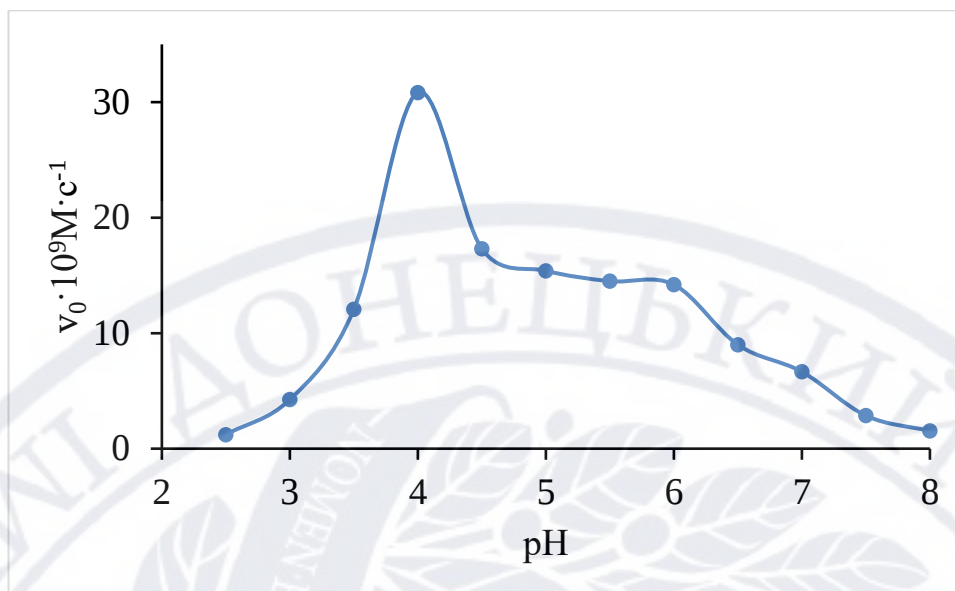


Рис. 3.5 Залежність швидкості знебарвлення МО від рН розчину в присутності системи HRP – Van.

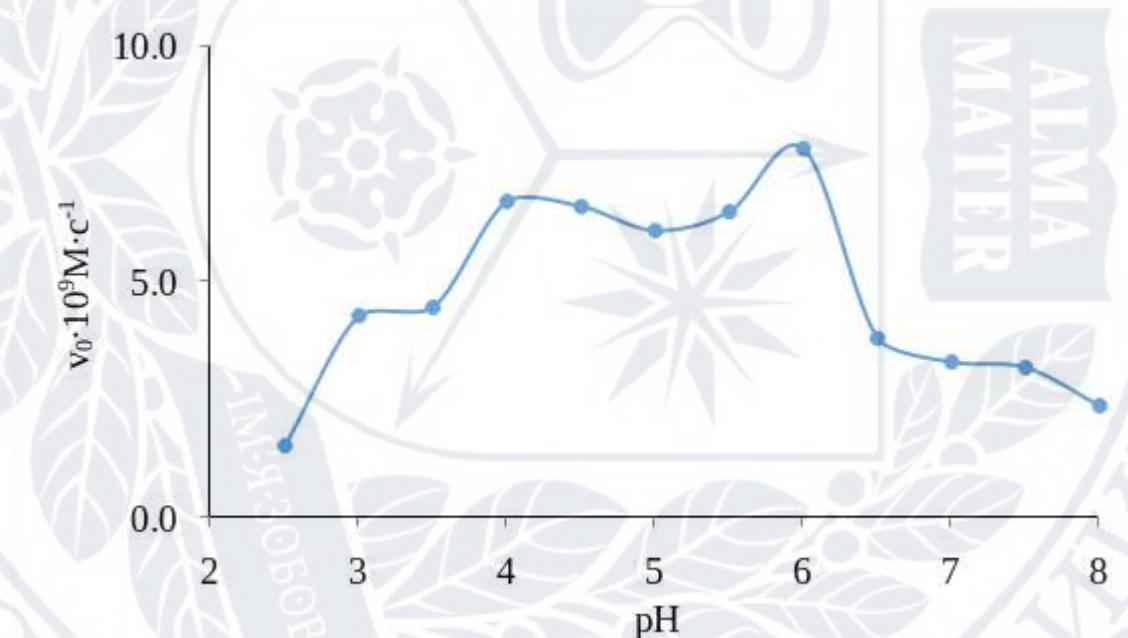


Рис. 3.6 Залежність швидкості знебарвлення MalG від рН розчину в присутності системи HRP – Van.

Табл. 3.1 Оптимуми рН для реакцій знебарвлення барвників в присутності HRP і медіаторів SA і Van. Дані представлені як середнє значення $\pm$ стандартне відхилення трьох незалежних експериментів.

Барвник	SA	Van
IC	5.0	6.0
MO	4.0	4.0
MalG	5.0	6.0

Наступні дослідження проводилися з урахуванням оптимальних значень рН для процесів знебарвлення різних барвників у присутності ФМС.

3.2 Знебарвлення різних типів барвників у присутності ферментно-медіаторних системи

Оптимальний процес знебарвлення було визначено шляхом дослідження впливу знебарвлення на чотири аспекти: концентрація HRP становила 0.12 U/мл, кількість H_2O_2 – 3.0 мл/л, рН=3.5-5.0, температура– 35 °С та час реакції 0.5, 1, 24 і 72 год. Біорозклад барвників контролювали за зникненням максимальних смуг поглинання барвників.

Ферментативне знебарвлення барвників проведено як у присутності, так і у відсутності медіаторів. Для оцінки субстратної специфічності ферменту барвники різної структури (Табл. 3.2) інкубували у присутності вільних ферментів в цитратфосфатному буфері в діапазоні рН 3,0–6,0 протягом 24 години. Швидкість знебарвлення залежить від основної структури молекули барвника. Індигоїдний барвник IC розкладається за 24 год за відсутності медіатора в присутності HRP на 19%. Азобарвник MO за 24 години знебарвлюється на 12%. Найкращий результат спостерігається для трифенілметанового барвника MalG, який розкладається з ефективністю

знебарвлення 30% при пероксидазному окисненні. Ефективність окислення барвників значно зросла в присутності медіаторів порівняно з використанням вільного фермента.

Індиго кармін

ІС дуже широко використовується в різних галузях – текстильній, паперовій, харчовій промисловості, медицині. Разом з тим його пов'язують з різними захворюваннями та небезпекою для навколишнього середовища. ІК є погано біорозкладним барвником, і його неконтрольоване потрапляння в природне середовище спричиняє сильне біоаккумуляцію. У зв'язку з цим живі істоти піддаються забрудненню, коли контактують зі стічними водами, забрудненими ІК. Максимальна доза ІК у воді повинна бути менше 0,005 мг/л, згідно з рекомендаціями Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) [28]. Вдихання або проковтування ІС у дозі, що перевищує цю, спричиняє негативний вплив на здоров'я живих істот, а саме: тяжку гіпертонію, серцево-судинні та респіраторні розлади, подразнення шлунково-кишкового тракту. Вкрай важливо очищати стічні води перед скиданням у природу. Пошук рішень для усунення вищезгаданих забруднювачів призводить до дослідження нових фізико-хімічних процесів за допомогою адсорбції, флокуляції/коагуляції, електрокоагуляції, принципів іонного обміну [29].

З розвитком та застосуванням біологічних ферментів у текстильній промисловості, оксидоредуктази почали застосовуватися в процесі знебарвлення стічних вод, що містили ІС, а також для знебарвлення джинсових тканин. Але в таких процесах частіше застосовуються лаккази, що отримують з грибів білої гнилі. Процес знебарвлення ІС барвника за допомогою HRP практично не досліджено, за винятком 2-х робіт. Вперше метод використання HRP був описаний Терресом та ін. у 2014 р. [30]. Експерименти проводилися з концентрацією барвника 25 мкМ. Було виявлено, що у присутності 3% H_2O_2 та 1

мг HRP (74,1 U/мл) при 40 °C, pH 6,8 без використання будь-якого медіатора, знебарвлення IC на 99% було досягнуто за 120 хвилин. Крім того, у роботі [31] було запропоновано ефективний, чистий та контрольований метод знебарвлення джинсової тканини з використанням HRP, концентрація якої була 150 U/мл, дозування H₂O₂ становило 2,5 мл/л та додавалося 3 рази, pH 5, температура та час реакції становили 35 °C протягом 1 години. У нашому випадку, при використанні HRP дуже низької активності (0,12 U/мл) і медіатора Van спостерігається дуже швидке знебарвлення IC вже через 0.5 год. У разі SA досягти повної деколоризації можна через 1 год (Рис. 3.8 і 3.9).

Метилловий оранжевий

МО (диметиламіноазобензолсульфонат) – це азобарвник, що належить до групи ароматичних сполук, що мають подвійний зв'язок між двома атомами азоту і як замісник сульфогрупу, що значно підвищує стійкість молекули. Ця група становить близько 70% барвників, що використовуються в текстильній промисловості, а її структури можуть бути канцерогенними. Азобарвники дуже стабільні у воді та мають низьку біорозкладність, що безпосередньо впливає на водне життя, зменшуючи вміст розчиненого кисню та проникнення світла у воду. Повідомлялося, що метаболіти азобарвників, включаючи МО, мають канцерогенний, тератогенний, мутагенний та дуже стійкий характер [32, 33]. Таким чином, стічні води, що містять МО, слід знебарвлювати та детоксикувати перед скиданням у навколишнє середовище. Відомо, що метилловий оранжевий можна знебарвити окисленням за допомогою різних фізико-хімічних методів [34, 35], за допомогою біоплівки [36], та ферментативне окислення [37, 38].

Раніше потенціал HRP для знебарвлення МО досліджувався різними авторами, використовуючи очищений фермент, неочищений з хрону після мінімальної обробки [39], іммобілізований на різних підложках [40]. Використання ферментів в іммобілізованій формі є одним із підходів, що

підвищує стійкість та подовжує термін зберігання біокатализатора у водному розчині.

У представленому дослідженні ми використовували комерційний фермент з додаванням пероксидази з низькими концентраціями. На Рис. 3.7. Представлено УФ-спектри зміни абсорбції розчину МО у присутності HRP і ваніліну.

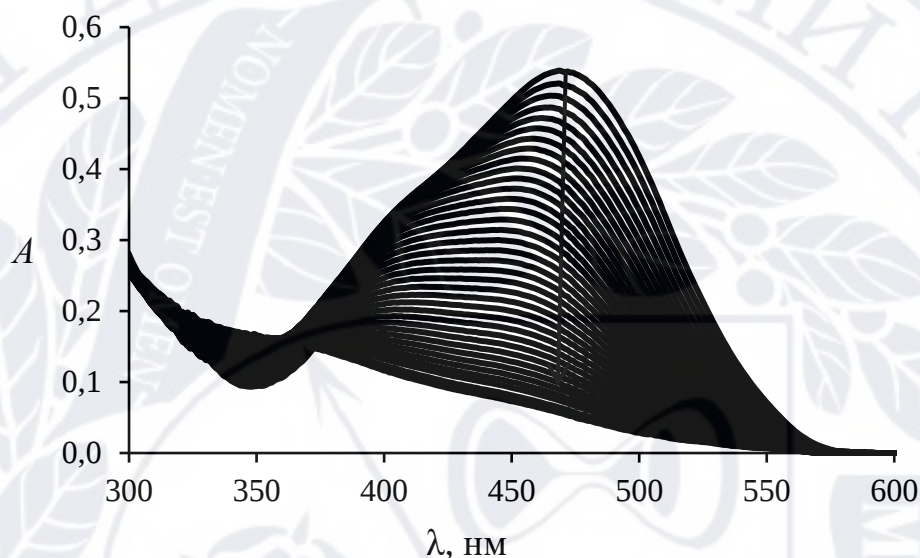


Рис. 3.7 УФ-спектри зміни абсорбції розчину МО у присутності HRP і ваніліну у ЦБС 4.0 за 35 °С з інтервалом 5 хв ($[HRP]_0 = 30$ мкг/мл (0.15 U/мл), $[ванілін]_0 = 1.5 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $[МО]_0 = 2.0 \cdot 10^{-5}$ моль/л)

За відсутності медіаторів пероксидаза досягла 20% знебарвлення МО через 24 години, що підтверджує її обмежену внутрішню здатність окислювати барвник. Додавання природних медіаторів значно підвищило ефективність знебарвлення, хоча ступінь та швидкість покращення варіювалися залежно від медіатора.

У досліджуваних умовах азобарвник МО не вдалося деколоризувати на 100% в присутності жодної системи навіть через 72 години. Пероксидаза продемонструвала знебарвлення у присутності SA, досягнувши 57, 59, 69 і 70% видалення барвника після 0.5, 1, 24 і 72 години інкубації, відповідно. При використанні системи HRP-Van ступінь деколоризації становила 44, 53, 61 і 62%

після 0.5, 1, 24 і 72 години інкубації, відповідно. Після 24 годин реакція зупинилась і збільшення часу інкубації до 72 години не допомагає досягти 100% знебарвлення (Рис. 3.8 і 3.9)..

Малахітовий зелений

Триарилметановий барвник MalG використовується для фарбування шовку, вовни, джуту та бавовни; однак його також використовують як біоцид у аквакультури, а також як харчову добавку та медичний дезінфікуючий засіб. Незважаючи на те, що MalG заборонено в багатьох країнах, він продовжує використовуватися через свою низьку, вартість, легку доступність та ефективність. Було показано, що MalG, відомий канцерогенний та мутагенний барвник, становить великий ризик для здоров'я людей та інших живих організмів при споживанні [41]. MalG та його відновлена форма, лейкомалахітовий зелений, є потужними забруднювачами водних екосистем, і було розроблено різні методи концентрування та очищення барвників із стічних вод. Незважаючи на існування численних хімічних та фізичних процесів обробки, видалення залишків барвників з навколишнього середовища є дуже складним, але ферментативна обробка стічних вод допомагає вирішити цю проблему [42].

MalG показав найвищу ступінь деколоризації (30%) серед досліджуваних барвників за відсутності медіаторів. При додаванні як Van, так і SA спостерігається різке збільшення швидкості знебарвлення. Як видно з Рис. 3.8 і 3.9 і Табл. 3.2 при пероксидазному окисненні в присутності Van барвник розкладається через 0.5, 1, 24 і 72 години інкубації на 43, 55, 97, 99%, відповідно. SA виявився менш ефективним для розкладання MalG: ступінь деколоризації досягла 18, 28, 54, 77% через 0.5, 1, 24 і 72 години інкубації, відповідно.

Таким чином, як видно з представлених даних, більш ефективним медіатором для HRP виявився Van. В присутності цього фенолу вдалося досягти 100% деколоризації індигоїдного барвника IC і трифенілметанового барвника MalG.

Табл. 3.2 Ефективність знебарвлення (%) барвників системами HRP-Van і HRP- SA

	Пероксидаза								
	Без мед.	Van				SA			
год	24	0.5	1	24	72	0.5	1	24	72
IC	17±3	99±2	99±4	99±3	99±2	78±3	97±3	100±5	100±2
MO	11±2	44±1	53±2	61±3	62±2	57±2	59±3	69±2	70±1
MalG	29±4	43±3	55±1	97±1	99±2	18±4	28±2	54±1	77±1

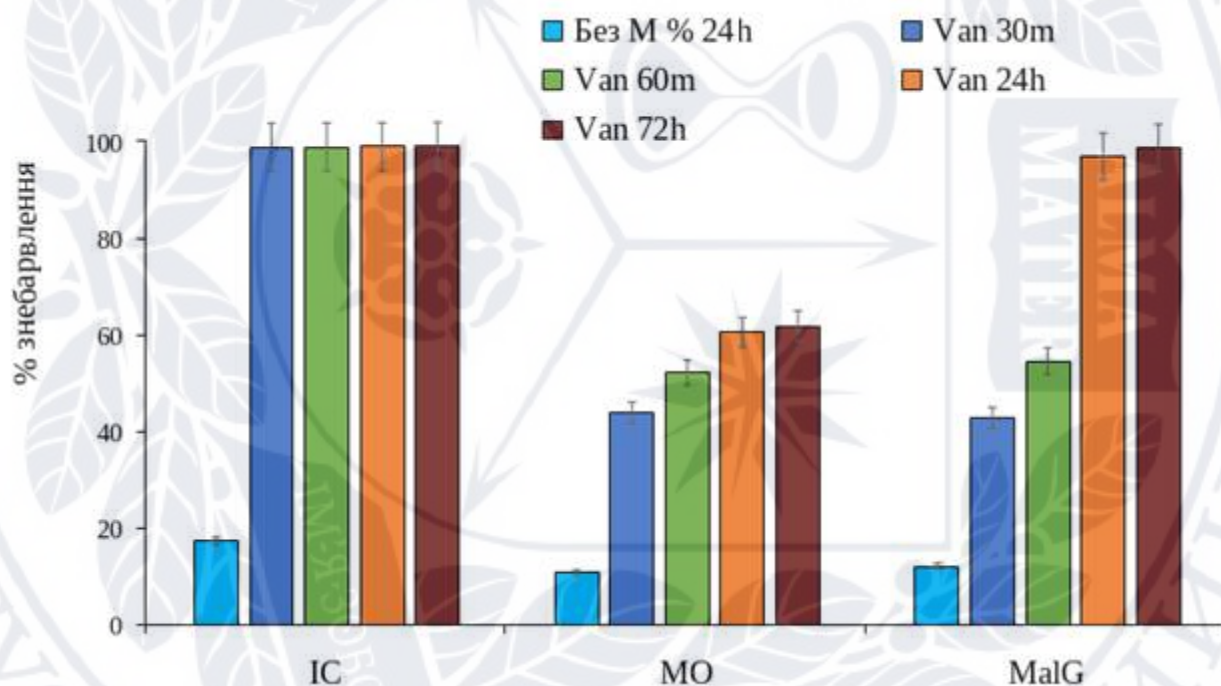


Рис. 3.8 Знебарвлення барвників в присутності системи HRP-Van, $[HRP]_0 = 3.0 \cdot 10^{-7}$ г/мл (0.15, U/мл), $[Van]_0 = 1.5 \cdot 10^{-4}$ М, $[барвник]_0 = 2.0 \cdot 10^{-5}$ М.

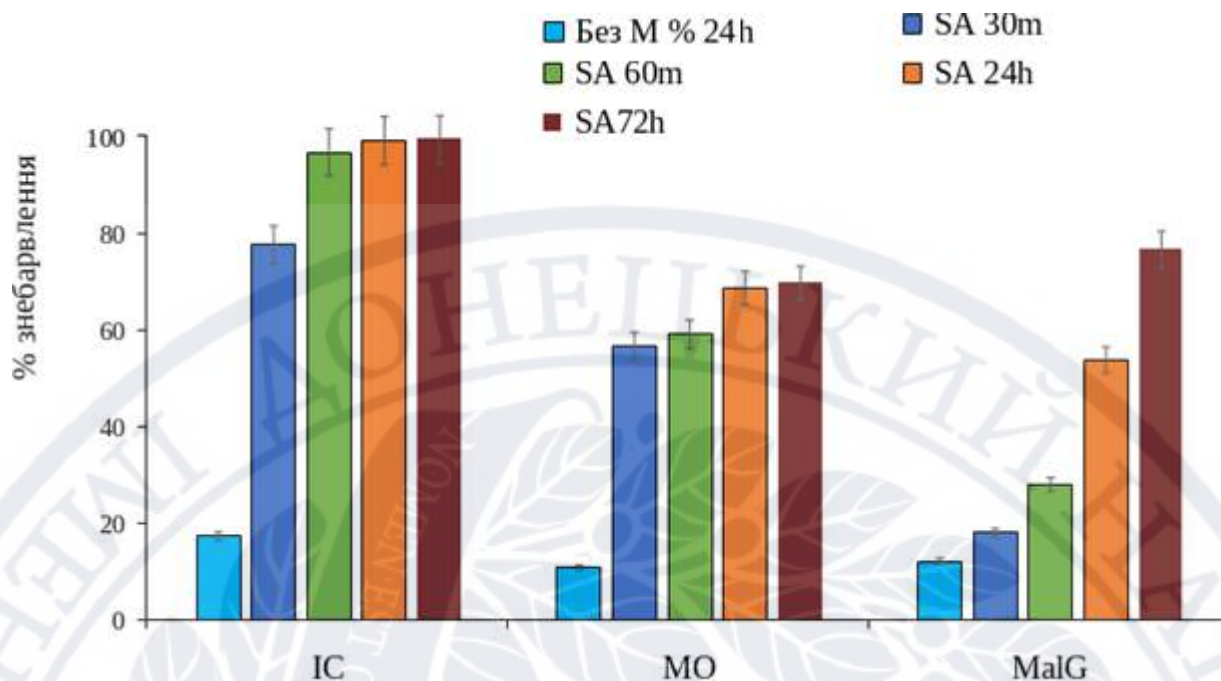


Рис. 3.9 Знебарвлення барвників в присутності системи HRP-SA в ацетатному буферному розчині, $[HRP]_0 = 3.0 \cdot 10^{-7}$ г/мл (0.15, U/мл), $[SA]_0 = 1.5 \cdot 10^{-4}$ М, $[барвник]_0 = 2.0 \cdot 10^{-5}$ М

3.3 Механізм процесу деколоризації барвників в присутності системи пероксидаза хропу – медіатор

Каталіз процесу окисної деградації барвників може протікати за двома принципово різними механізмами. Перший шлях (Рис. 3.10) – це класичний механізм ферментативного каталізу, тобто пряме окислення субстрату безпосередньо в двохсубстратному ферментативному процесі. Другий шлях (Рис. 3.11) – це непрямий механізм за участю окисно-відновного медіатора. У цьому випадку медіатори виступають в якості первинних субстратів оксидоредуктаз, вони окислюються ферментом через механізм PCET з утворенням високореакційних фенокисильних радикалів. Відносно невеликий розмір молекули медіатора дозволяє їм легко досягти активного центру по вузьким каналам.



Рис. 3.10 Механізм прямого окислення субстратів пероксидазою хрому.

Однак активний центр пероксидази має додаткові характеристики, які регулюють активність і специфічність ферментів. До нього відносять електростатичну та гідрофобну середовище субстратзв'язуючого кармана, що впливають на орієнтацію у субстрату в активному центрі ферменту. Вільні радикали, що утворились з медіатора потрапляють в реакційний об'єм в процесі дифузії та швидко реагують з різними органічними речовинами, які не є прямими субстратами ферменту.

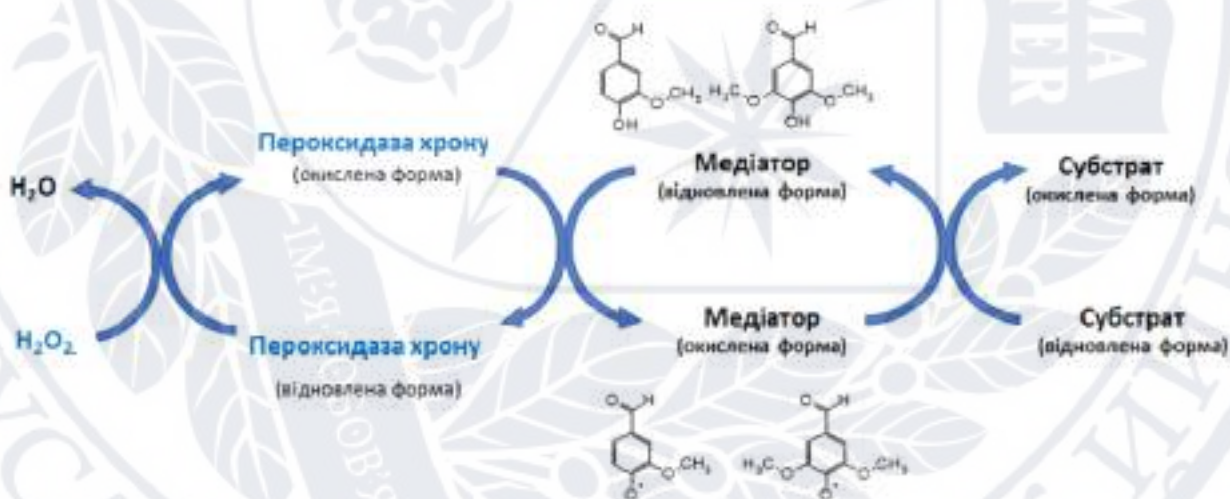


Рис. 3.11 Механізм опосередкованого окислення субстратів біокаталітичною системою пероксидаза хрому - медіатор.

У цьому випадку електрони переносяться медіатором через фермент від субстратів до молекули пероксиду водню, як акцептора електронів, з його відновленням до води. Відновлення медіаторних радикалів до їх початкової молекулярної форми відбувається за реакцією переносу атома водню (НАТ) або за механізмом PCET, залежно від структури субстрату та рН середовища.

3.4 Порівняння ефективності ваніліну і сирінальдегіду як медіаторів пероксидази хрому

Природні медіатори, такі як SA і Van, є типовими представниками двох класів фенольних сполук, пов'язаних з лігніном: фенольні сполуки сирінгільного типу з метоксизамісниками в обох *орто*-положеннях, фенольні сполуки гваяцильного типу з однією метоксигрупою. Вони мають подібні структури та відрізняються лише метоксилюванням ароматичного кільця: SA має дві метоксигрупи в *орто*-положенні до фенольної групи, тоді як Van має лише одну метоксигрупу і, таким чином, більш стерично доступну реакційну фенольну групу. Обидві сполуки вже були випробувані як медіатори у знебарвленні барвників, показавши багатообіцяючі результати [24, 43]. Перевагою медіаторів, окрім того, що вони діють як електронний човник між ферментом та субстратами, є те, що вони можуть слідувати шляху окислення, що відрізняється від ферментативного. Електронодонорний ефект метоксизамісників у бензеновому кільці посилює активність фермента через зниження окисно-відновного потенціалу. Таким чином, SA (сполука S-типу) швидше окислюється пероксидазою ніж фенол Van G-типу (гваяцильного типу), а також виявилися найшвидшими та найефективнішими медіаторами ферментів. Це було пов'язано з іншими факторами, що впливають на швидкість окислення оксидоредуктазами, особливо рKa, оскільки окисленню фенолу до феноксирадикалу сприяє наявність фенолятної форми [44]. Потенціали окиснення фенольних сполук при збільшенні рН зменшуються, що пов'язано з близькістю до значень pKa більшості

фенольних сполук (Табл. 3.3); через вищі концентрації фенолят-іонів при рН 8 вони більш схильні до окислення, ніж відповідна фенольна група. Потенціали окислення відповідають тенденції сирингіл < гваяцил, а наявність та положення замісників в ароматичному кільці безпосередньо впливають на окисно-відновні потенціали. Окиснення відбувається легше, коли присутні електродонорні групи (наприклад, Me, OMe, OH); ці групи можуть викликати стабілізацію радикалів, що призводить до зниження окисно-відновного потенціалу, тоді як наявність електроноакцепторних функціональностей (наприклад, COR, R=H, CH₃) має протилежний ефект.

Таблиця 3.3 рKa і редокс потенціали (E) Van і SA

Медіатор	pKa [25]	E (pH 4) [45]
Van	7.3	1.14
SA	7.4	1.06

Таким чином, SA легше окислюється ферментом, ніж Van, через нижчий окисно-відновний потенціал, але сирінгальдегід менш ефективний як медіатор через стеричний фактор (наявність двох метоксигруп в *орто*-положенні до фенольної групи).

HRP має один з найвищих потенціалів, що робить цю пероксидазу особливо привабливою, оскільки високі окисно-відновні потенціали корелюють з високою активністю ферменту. Синтетичні медіатори відомі своєю швидкістю розкладання, але атакують фермент, зменшуючи її каталітичну активність. Цих хімічних речовин слід уникати, оскільки вони, ймовірно, можуть бути додатковим забруднювачем у стічних водах. Порівняно з іншими синтетичними медіаторами, природні медіатори сприяють покращенню стабільності ферментів та здатності очищувати стічні води. Причина полягає в тому, що активність вільних радикалів цих медіаторів після окислення низька, що значно знижує

ймовірність атаки груп, чутливих до поверхневої активності пероксидази, завдяки чому фермент може стабільно існувати протягом тривалого часу. Природні медіатори можуть подовжити рівень виживання та покращити стабільність ферментів шляхом зв'язування з активним центром ферменту або відповідним сайтом у білковому ланцюзі ферменту. Фенольні медіатори також покращують ефективність переносу електронів, опосередковано збільшуючи окислювальний потенціал ферменту та зменшуючи просторовий бар'єр між пероксидазою та субстратом, тим самим покращуючи каталітичну ефективність ферменту, розширюючи діапазон субстратів та розширюючи область застосування ферменту.

Таким чином, можливість використання систем пероксидаза-медіатор залежить від окисно-відновної оборотності реакції радикала з субстратом, а також від балансу між стабільністю та реакційною здатністю медіаторного радикала, який, крім того, не повинен пригнічувати активність ферменту.

ВИСНОВКИ

1. Досліджено біокаталітичні системи із застосуванням пероксидази хрону та природних редокс-медіаторів – ваніліну й сирінгальдегіду – у процесах знебарвлення синтетичних барвників різної хімічної природи: індигокарміну (індигоїдний барвник), метилового оранжевого (азобарвник) і малахітового зеленого (трифенілметановий барвник).
2. Показано, що досліджувані барвники не є прямими субстратами пероксидази хрону і тільки в присутності медіаторів спостерігається їх знебарвлення. Найбільш стійким виявився азобарвник метиловий оранжевий: в умовах експерименту не вдалося досягти його 100% деколоризації.
3. Вивчено вплив рН розчину (від 2.5 до 8.0) та час інкубації (від 0.5 до 24 год) на ефективність перетворення барвників. Показано, що каталітичні системи найбільш ефективні в кислому середовищі в інтервалі рН від 4.0 до 6.0, що характерно для оксидоредуктаз. Оптимальний час інкубації коливається в залежності від природи медіатора і барвника.
4. Встановлено, що ванілін демонструє вищу ефективність окислення для індигокарміну і малахітового зеленого, а азобарвник метиловий оранжевий швидше розкладається в присутності сирінгальдегіду.
5. Використання ферментів і медіаторів біологічного походження зменшує негативний вплив на довкілля, що робить очищення стічних вод із застосуванням ферментно-медіаторних систем екологічно сталим підходом.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Cárdenas-Moreno, Y., González-Bacerio, J., García Arellano, H., & del Monte-Martínez, A. (2023). Oxidoreductase enzymes: Characteristics, applications, and challenges as a biocatalyst. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 70(6), 2108-2135. <https://doi.org/10.1002/bab.2513>
2. Shen, C., & Wang, Y. (2024). Recent Progress on Peroxidase Modification and Application. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-25. <https://doi.org/10.1007/s12010-023-04835-w>
3. de Boer, S. R., Schäffer, A., & Moreira, M. T. (2023). Towards oxidoreductase-based processes for the removal of antibiotics from wastewater. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 22(4), 899-932. <https://doi.org/10.1007/s10562-019-02732-8>
4. Freitas, C. D., Costa, J. H., Germano, T. A., Rocha, R. D. O., Ramos, M. V., & Bezerra, L. P. (2024). Class III plant peroxidases: From classification to physiological functions. *International journal of biological macromolecules*, 263, 130306. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130306>
5. Morsi, R., Bilal, M., Iqbal, H. M., & Ashraf, S. S. (2020). Laccases and peroxidases: the smart, greener and futuristic biocatalytic tools to mitigate recalcitrant emerging pollutants. *Science of the total environment*, 714, 136572. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136572>
6. Tonoyan, L., Montagner, D., Friel, R., & O'Flaherty, V. (2020). Antimicrobials offered from nature: Peroxidase-catalyzed systems and their mimics. *Biochemical Pharmacology*, 182, 114281. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114281>
7. Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), 249-259. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.10.022>
8. Lopes, G. R., Pinto, D. C., & Silva, A. M. (2014). Horseradish peroxidase (HRP) as a tool in green chemistry. *Rsc Advances*, 4(70), 37244-37265. <https://doi.org/10.1039/C4RA06094F>

-
9. Basumatary, D., Yadav, H. S., & Yadav, M. (2023). The role of peroxidases in the bioremediation of organic pollutants. *The Natural Products Journal*, 13(1), 60-77. <https://doi.org/10.2174/2210315512666220410132847>
10. Ristea, M. E., & Zarnescu, O. (2023). Indigo carmine: Between necessity and concern. *Journal of xenobiotics*, 13(3), 509-528. <https://doi.org/10.3390/jox13030033>.
11. Zosenko, O. O., Kushch, O. V., Kompanets, M. O., Anishchenko, V. M., & Shendrik, A. N. (2022). Aliphatic oxime 3-(hydroxyimino) pentan-2, 4-dione as new potential mediator for laccase-catalyzed decolorization of dyes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(4), 108149. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108149>
12. Hordieieva, I. O., Kushch, O. V., Hordieieva, T. O., Sirobaba, S. I., Kompanets, M. O., Anishchenko, V. M., & Shendrik, A. N. (2023). Eco-friendly TEMPO/laccase/O₂ biocatalytic system for degradation of Indigo Carmine: operative conditions and laccase inactivation. *RSC advances*, 13(30), 20737-20747. <https://doi.org/10.1039/d3ra03107a>.
13. Kettle, A. J., Clark, B. M., & Winterbourn, C. C. (2004). Superoxide converts indigo carmine to isatin sulfonic acid: implications for the hypothesis that neutrophils produce ozone. *Journal of Biological Chemistry*, 279(18), 18521-18525. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400334200>.
14. Manjarrez-Paba, G., Montes-Robledo, A., Cuevas-Menco, H., Baena-Baldiris, D., & Avila, R. B. (2025). Decolorization of methyl orange and aniline red dyes by *Enterococcus hirae* isolated from beach sand. *Scientific Reports*, 15(1), 33341. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-12584-5>.
15. Naikwade, A. G., Jagadale, M. B., Kale, D. P., Gophane, A. D., Garadkar, K. M., & Rashinkar, G. S. (2020). Photocatalytic degradation of methyl orange by magnetically retrievable supported ionic liquid phase photocatalyst. *ACS omega*, 5(1), 131-144. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02040>.
16. Gharavi-Nakhjavani, M. S., Niazi, A., Hosseini, H., Aminzare, M., Dizaji, R., Tajdar-Oranj, B., & Mirza Alizadeh, A. (2023). Malachite green and leucomalachite

green in fish: a global systematic review and meta-analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(17), 48911-48927. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-26372-z>

17. Naikwade, A. G., Jagadale, M. B., Kale, D. P., Gophane, A. D., Garadkar, K. M., & Rashinkar, G. S. (2020). Photocatalytic degradation of methyl orange by magnetically retrievable supported ionic liquid phase photocatalyst. *ACS omega*, 5(1), 131-144. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02040>.

18. Dutta, S., Gupta, B., Srivastava, S. K., & Gupta, A. K. (2021). Recent advances on the removal of dyes from wastewater using various adsorbents: A critical review. *Materials Advances*, 2(14), 4497-4531. <https://doi.org/10.1039/D1MA00354B>

19. Dinakarkumar, Y., Ramakrishnan, G., Gujjula, K. R., Vasu, V., Balamurugan, P., & Murali, G. (2024). Fungal bioremediation: An overview of the mechanisms, applications and future perspectives. *Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, 6, 293-302. <https://www.keaipublishing.com/en/journals/environmental-chemistry-and-ecotoxicology/>

20. Kuppan, N., Padman, M., Mahadeva, M., Srinivasan, S., & Devarajan, R. (2024). A comprehensive review of sustainable bioremediation techniques: Eco friendly solutions for waste and pollution management. *Waste management bulletin*, 2(3), 154-171. <https://doi.org/10.1016/j.wmb.2024.07.005>

21. Adesanmi, B. M., Hung, Y. T., Paul, H., & Huhnke, C. (2022). Comparison of dye wastewater treatment methods: A review. *GSC Advanced Research and Reviews*, 10(2), 10(2), 126. <https://doi.org/10.30574/gscarr.2022.10.2.0054>.

22. Rodrigues, A. F., da Silva, A. F., da Silva, F. L., dos Santos, K. M., de Oliveira, M. P., Nobre, M. M., ... & dos Santos, J. C. (2023). A scientometric analysis of research progress and trends in the design of laccase biocatalysts for the decolorization of synthetic dyes. *Process Biochemistry*, 126, 272-291. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.01.014>

-
23. Kushch, O. V., O, I., Hordieieva, Zosenko, O. O., & Shendrik, A. N. (2019). Comparison of N-Hydroxy Compounds as Mediators in Laccase-Catalysed Decolorization of Indigo Carmine. *ChemistrySelect*, 4(13), 3905-3913. <https://doi.org/10.1002/slct.201803811>
24. Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M. J., & Martínez, A. T. (2005). Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and environmental microbiology*, 71(4), 1775-1784. <https://doi.org/10.1128/aem.71.4.1775-1784.2005>.
25. Ragnar, M., Lindgren, C. T., & Nilvebrant, N. O. (2000). pKa-values of guaiacyl and syringyl phenols related to lignin. *Journal of wood chemistry and technology*, 20(3), 277-305. <https://doi.org/10.1080/02773810009349637>
26. Saoudi O., Ghaouar N., Salah S.B., Othman T. Denaturation process of laccase in various media by refractive index measurements. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2017. Vol. 11. P. 19–26. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.05.005>.
27. Chattopadhyay, K., & Mazumdar, S. (2000). Structural and conformational stability of horseradish peroxidase: effect of temperature and pH. *Biochemistry*, 39(1), 263-270. <https://doi.org/10.1021/bi990729o>.
28. Debina, B., Eric, S. N., Fotio, D., Arnaud, K. T., Lemankreo, D. Y., & Rahman, A. N. (2020). Adsorption of indigo carmine dye by composite activated carbons prepared from plastic waste (PET) and banana pseudo stem. *J. Mater. Sci. Chem. Eng*, 8(12), 39-55. <https://doi.org/10.4236/msce.2020.812004>.
29. Nindjio, G. F. K., Tagne, R. F. T., Jiokeng, S. L. Z., Fotsop, C. G., Bopda, A., Doungmo, G., ... & Tonle, I. K. (2022). Lignocellulosic-based materials from bean and pistachio pod wastes for dye-contaminated water treatment: optimization and modeling of indigo carmine sorption. *Polymers*, 14(18), 3776. <https://doi.org/10.3390/polym14183776>.
30. Terres, J., Battisti, R., Andreus, J., & de Jesus, P. C. (2014). Decolorization and degradation of Indigo Carmine dye from aqueous solution catalyzed by horseradish

-
- peroxidase. *Biocatalysis and Biotransformation*, 32(1), 64-73. <https://doi.org/10.3109/10242422.2013.873416> .
31. Zhang, X., Lou, J., Yuan, J., Xu, J., & Fan, X. (2023). Style decolorization treatment of denim fabric: decomposition of indigo dyes via horseradish peroxidase/H₂O₂ system at room temperature. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 35, 101233. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101233> .
32. Chen, Z. X., Jin, X. Y., Chen, Z., Megharaj, M., & Naidu, R. (2011). Removal of methyl orange from aqueous solution using bentonite-supported nanoscale zero-valent iron. *Journal of colloid and interface science*, 363(2), 601-607. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.07.057> .
33. de Campos Ventura-Camargo, B., & Marin-Morales, M. A. (2013). Azo dyes: characterization and toxicity-a review. *Textiles and Light Industrial Science and Technology*, 2(2), 85-103.
34. Gómez-Obando, V. A., García-Mora, A. M., Basante, J. S., Hidalgo, A., & Galeano, L. A. (2019). CWPO degradation of methyl orange at circumneutral pH: multi-response statistical optimization, main intermediates and by-products. *Frontiers in Chemistry*, 7, 772. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00772> (.
35. Xu, J., Ma, Q., Feng, W., Zhang, X., Lin, Q., You, C., & Wang, X. (2022). Removal of methyl orange from water by Fenton oxidation of magnetic coconut-clothed biochar. *RSC advances*, 12(38), 24439-24446. <https://doi.org/10.1039/D2RA03630D> .
36. Haque, M. M., Haque, M. A., Mosharaf, M. K., & Marcus, P. K. (2021). Decolorization, degradation and detoxification of carcinogenic sulfonated azo dye methyl orange by newly developed biofilm consortia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 793-804. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.012> .
37. Silveira, T. R., Ebling, C. D., Dal Magro, L., Rodrigues, R. C., Schneider, W. D. H., Camassola, M., ... & Klein, M. P. (2020). An efficient decolorization of methyl orange dye by laccase from *Marasmiellus palmivorus* immobilized on chitosan-coated magnetic particles. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 30, 101859. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101859> .

-
38. Lu, T., Dai, Y., Shi, Y., Wang, X., Hong, Y., Pan, H., & Wu, Z. (2025). Preparation of Magnetic Dendrimer and Immobilization of Laccase for Methyl Orange Dye Removal. *BioNanoScience*, 15(3), 435. <https://doi.org/10.1007/s12668-025-02057-4> .
39. Ambatkar, M., & Mukundan, U. (2015). Enzymatic decolourisation of Methyl Orange and Bismarck Brown using crude peroxidase from *Armoracia rusticana*. *Applied Water Science*, 5(4), 397-406. <https://doi.org/10.1007/s13201-014-0197-3> .
40. Almulaiky, Y. Q., & Al-Harbi, S. A. (2025). A sustainable approach to dye degradation: Horseradish peroxidase immobilization on hybrid chitosan-coated magnesium manganese oxide materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 314, 144277. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.144277> .
41. Srivastava, S., Sinha, R., & Roy, D. (2004). Toxicological effects of malachite green. *Aquatic toxicology*, 66(3), 319-329. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.09.008> .
42. Kalaiarasan, E., & Palvannan, T. (2015). Efficiency of Carbohydrate Additives on the Stability of Horseradish Peroxidase (HRP): HRP-Catalyzed Removal of Phenol and Malachite Green Decolorization from Wastewater. *CLEAN–Soil, Air, Water*, 43(6), 846-856. <https://doi.org/10.1002/clen.201400125> .
43. Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, Á. T., Romero, J., Gutiérrez, A., & del Río, J. C. (2007). Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1264-1271. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.09.016> .
44. d'Acunzo, F., & Galli, C. (2003). First evidence of catalytic mediation by phenolic compounds in the laccase-induced oxidation of lignin models. *European Journal of Biochemistry*, 270(17), 3634-3640. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03752.x> .
45. Silva, D., Sousa, A. C., Robalo, M. P., & Martins, L. O. (2023). A wide array of lignin-related phenolics are oxidized by an evolved bacterial dye-decolourising peroxidase. *New Biotechnology*, 77, 176-184. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2022.12.003>