



## Odbarwianie wodnych roztworów wybranych barwników za pomocą kompleksu enzymatycznego lakazy z *Cerrena unicolor*

Anna Michniewicz<sup>1</sup>, Stanisław Ledakowicz<sup>1</sup>, Teresa Jamroz<sup>1</sup>  
Anna Jarosz-Wilkołazka<sup>2</sup>, Andrzej Leonowicz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska, Politechnika Łódzka, Łódź

<sup>2</sup>Zakład Biochemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

### Decolorization of aqueous solution of dyes by the laccase complex from *Cerrena unicolor*

#### Summary

The biodegradation of dyes in textile wastewater is nowadays a subject of intensive research. In particular, a biotransformation of various dyestuffs by white-rot fungi is the most promising alternative. This study provides the results of decolorization of the aqueous solution of azo- and anthraquinone dyes by the laccase complex from *Cerrena unicolor*. The investigations were carried out using 3 systems: with active biomass, with sterilized biomass (biosorption), and with secretion of enzymatic complex. The enzymatic biotransformation gave to 97% decolorization of Acid Blue 62 and 95% decolorization of Reactive Blue 81 after 15 min. The dye's adsorption on mycelia contributes substantially (30-40%) to decolorization of the textile wastewater.

#### Key words:

dyes, wood rotting fungi, decolorization.

#### Adres do korespondencji

Anna Michniewicz,  
Wydział Inżynierii  
Procesowej i Ochrony  
Środowiska,  
Politechnika Łódzka,  
ul. Wólczańska 213,  
90-924 Łódź.

### 1. Wstęp

Barwniki włókiennicze, powszechnie stosowane i wykorzystywane w wielu procesach przemysłowych, są składnikami szczególnie trudnymi do wyeliminowania ze ścieków przy użyciu metod tradycyjnych (1). Nieefektywność procesu barwienia

włókien powoduje przedostawanie się około 10-15% całości użytych barwników do ścieków, które wymagają oczyszczenia (2). Z analizy chemicznej budowy barwników wynika, że są to głównie związki organiczne o rozbudowanej strukturze, węglowodory z układem chinoidowym i grupami chromoforowymi, takimi jak: azometynowa, karbonylowa, azowa, etylenowa; grupami funkcyjnymi, jak: metylowa, aminowa, sulfonowa, hydroksylowa czy nitrowa. Różnorodność budowy barwników powoduje, że określenie optymalnych warunków ich rozkładu jest zadaniem niezwykle trudnym (1). Barwniki z uwagi na swoją wysoką stabilność chemiczną i fotochemiczną bardzo trudno ulegają degradacji w powszechnie stosowanym oczyszczaniu ścieków metodami biologicznymi, dodatkowo ich częste działanie bakteriostatyczne uniemożliwia ten sposób oczyszczania (3). Zostają one najczęściej zaadsorbowane przez biomasę osadu czynnego i są wraz z nią usuwane. Nie następuje jednak ich rozkład. Z metod fizykochemicznych stosowanych do oczyszczania ścieków włókienniczych należy wymienić: koagulację, flokulację, elektrolizę, flotację, sorpcję i inne. Jednak techniki te są często niewystarczająco wydajne i/lub zbyt kosztowne. Spośród wymienionych za najbardziej efektywny sposób usuwania barwy uważana jest sorpcja (4). Stosuje się także biosorpcję (5) oraz połączenie metod adsorpcyjnych z innymi, np. adsorpcja barwnika na osadzie czynnym z metodą pogłębionego utleniania (6); zwłaszcza ozonowanie jest bardzo skuteczną metodą odbarwiania (7).

Poszukiwania i rozwój nowych metod oczyszczania skłaniają się w kierunku wykorzystywania mikroorganizmów oraz procesów zachodzących samorzutnie w środowisku naturalnym. Istotną grupę organizmów stanowią grzyby białej i brunatnej zgnilizny drewna wytwarzające enzymy zewnątrzkomórkowe, przede wszystkim lakazy i peroksydazy, które katalizują naturalne procesy rozkładu kompleksu ligninocelulozowego, zawierającego układy aromatyczne (8). Szerokie spektrum substratowe tych enzymów powoduje, że są one używane do degradacji i detoksykacji wielu złożonych związków organicznych, w tym także barwników (9,10).

Przedmiotem obecnej pracy było określenie możliwości odbarwiania modelowych wodnych roztworów barwników za pomocą grzybnia *Cerrena unicolor* i kompleksu enzymatycznego lakazy wytwarzanego przez tę grzybnię.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Obiekt badań (substrat)

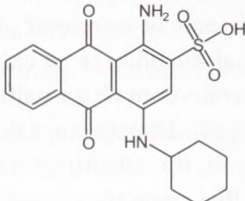
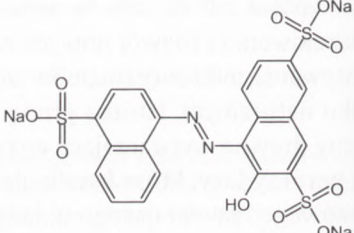
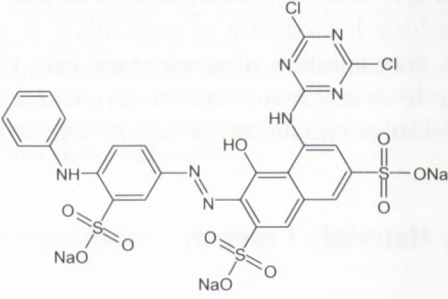
Wybrano trzy wodne roztwory barwników stosowanych w polskim przemyśle włókienniczym (tab. 1). Były to: dwa barwniki azowe Acid Red 27 (AR 27) i Reactive Blue 81 (RB 81) i jeden barwnik antrachinonowy Acid Blue 62 (AB 62). Barwniki azowe są największą i najpopularniejszą grupą barwników syntetycznych, stanowią 65%



wszystkich barwników (11). Należą do niej barwniki wielu klas użytkowych – bezpośrednie, kwasowe, metalokompleksowe, reaktywne, zawieszinowe, chromowe, zaprawowe oraz pigmenty. Podstawowym wyróżnikiem wszystkich barwników azowych jest występowanie w nich jednej lub więcej grup azowych  $-N=N-$ , które najczęściej są połączone z pierścieniami aromatycznymi (12). Drugą bardzo ważną grupą barwników są barwniki antrachinonowe. Zaletą ich jest niezwykła odporność na czynniki zewnętrzne (temperatura, promieniowanie UV) oraz możliwość uzyskania czystych głębokich barw, których nie można uzyskać z barwników azowych.

Tabela 1

## Charakterystyka barwników użytych w pracy

<p>Acid Blue 62 (AB 62) Barwnik kwasowy antrachinonowy w postaci oczyszczonej handlowa nazwa: błękit alizarynowy (C.I.62 045)</p>	
<p>Acid Red 27 (AR 27) Barwnik kwasowy azowy na bazie R-soli (C.I.16 185)</p>	
<p>Reactive Blue 81 (RB 81) Barwnik reaktywny azowy (C.I.18 245)</p>	

W doświadczeniach dekoloryzacyjnych stosowano następujące stężenia barwników: AB 62 – 100 mg/l, AR 27 i RB 81 – 200 mg/l.

## 2.2. Materiał biologiczny

Do badań procesu odbarwiania użyto lakazy wytwarzanej przez szczep *Cerrena unicolor* pochodzący z kolekcji Zakładu Biochemii UMCS w Lublinie, należący do grzybów białej zgnilizny drewna. Wydziela on lakazę zewnątrzkomórkowo z dużą wydajnością jako enzym konstytucyjny, bez użycia dodatkowych induktorów.

Hodowlę lakazy prowadzono w wytrząsarce przez 2 tygodnie na podłożu z glukozą jako głównym źródłem węgla oraz asparaginą jako głównym źródłem azotu.

## 2.3. Proces odbarwiania

Na całość przeprowadzonych eksperymentów składały się następujące procesy:

- biosorpcja na nieaktywnej biomase grzyba,
- odbarwianie poprzez aktywny płyn pochodowlany,
- biosorpcja poprzez aktywną biomasę grzyba.

Badanie procesu biosorpcji prowadzono przy użyciu 1,5 g mokrej biomasy (odpowiadało to 0,032 g suchej biomasy) i 30 ml roztworu barwnika o stężeniu od 10 do 100 mg/l dla AB 62 i od 10 do 200 mg/l dla AR 27 i RB 81. Biomasa w celu pozbycia się aktywnego enzymu była sterylizowana w autoklawie przez 30 minut, w temperaturze 121°C, pod ciśnieniem 0,1 MPa. Wcześniejsze próby ze sterylizacją radiacyjną (maksymalna dawka promieniowania  $\gamma = 25$  kGY) nie przyniosły pozytywnego wyniku, gdyż obserwowano zmianę badanego roztworu, co było skutkiem biotransformacji barwnika.

Badania enzymatycznego odbarwiania prowadzono w 500 ml kolbach okrągłodennych umieszczonych w wytrząsarce w 25°C. Stosowano następujące 3 układy:

- z kompleksem enzymatycznym (75 ml roztworu pochodowlanego lakazy + 75 ml barwnika),
- z aktywną biomasą (7,5 g biomasy + 150 ml barwnika),
- z kompleksem enzymatycznym i aktywną biomasą (5 g biomasy + 75 ml roztworu lakazy + 75 ml barwnika).

Do oceny stopnia dekoloryzacji barwników wykorzystano metodę spektrofotometryczną z użyciem spektrofotometru firmy UNICAM współpracującego z komputerem PC, w którym zainstalowane było oprogramowanie VISION 32 pozwalające na szybkie analizowanie próbek. Oznaczeń dokonywano w maksimum absorpcji dla poszczególnych barwników: AB 62 – 638 nm, AR 27 – 520 nm, RB 81 – 584 nm.



### 3. Wyniki i dyskusja

#### 3.1. Badanie procesu biosorpcji

Średni stopień zatrzymania barwnika na sorbencie (grzybni) wynosi odpowiednio 46% dla AB 62, 30% dla RB 81 oraz 15% dla AR 27.

Otrzymane wyniki świadczą o tym, że proces biosorpcji zachodzi najefektywniej dla barwnika AB 62, następnie dla barwnika RB 81 i najgorzej proces zachodzi z barwnikiem AR 27.

Szybkość procesu kształtowała się różnie w zależności od typu badanego barwnika. AB 62 adsorbował się najszybciej (24 h) i spadek stężenia był największy już na początku procesu. Najbardziej znaczący spadek stężenia nastąpił już w pierwszych paru godzinach we wszystkich próbach. W przypadku barwnika RB 81 najistotniejszy spadek stężenia miał także miejsce w pierwszych 24 h procesu, ale zmiany te były wolniejsze niż dla barwnika AB 62, cały proces trwał 72 h. Barwnik AR 27 adsorbował się najslabiej, a zmiany stężenia tego barwnika w poszczególnych próbach zachodziły nierównomiernie.

Proces biosorpcji opisano równaniem izotermy adsorpcji Freundlicha:

$$a = K \cdot C_k^n$$

gdzie:

$$a = \frac{(C_p - C_k) \cdot V_{\text{rozp}}}{m_b} \text{ - stopień adsorpcji [mg/g]}$$

$C_p$  - stężenia początkowe barwnika [mg/l]

$C_k$  - stężenie równowagowe barwnika [mg/l]

$V_{\text{rozp}}$  - objętość roztworu barwnika [l]

$m_b$  - masa biomasy [g]

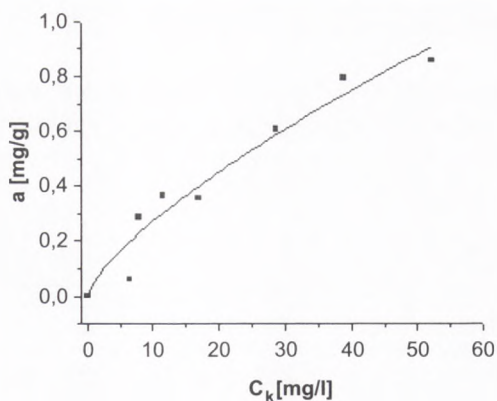
$K, n$  - stałe charakterystyczne dla danego układu

Przeprowadzony eksperyment umożliwił wyznaczenie izoterm sorpcji określających zależność równowagowego stopnia adsorpcji na grzybni *C. unicolor* od stężenia barwnika w kolejnych próbach (wykresy 1,2,3) oraz wyliczenie na podstawie danych doświadczalnych stałych wielkości  $K$  i  $n$  występujących w równaniu Freundlicha (tab. 2).

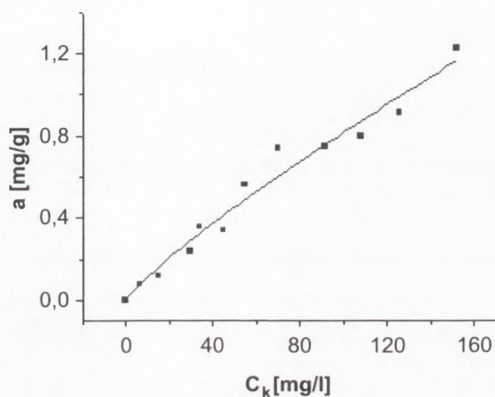
Tabela 2

Parametry izotermy Freundlicha dla biosorpcji barwników na biomase *C. unicolor*

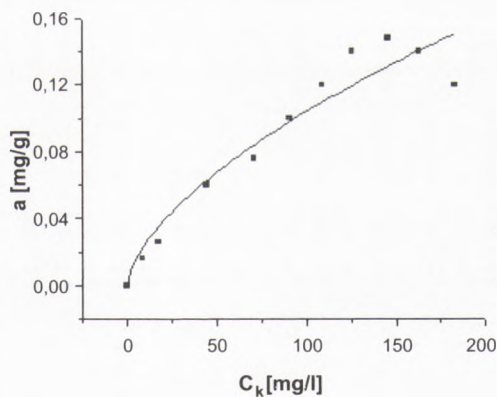
Barwnik	K	n
AB 62	0,051	0,73
RB 81	0,016	0,85
AR 27	0,006	0,62



Wykres 1. Izoterma adsorpcji dla procesu odbarwiania AB 62.



Wykres 2. Izoterma adsorpcji dla procesu odbarwiania RB 81.



Wykres 3. Izoterma adsorpcji dla procesu odbarwiania AR 27.

### 3.2. Badanie procesu enzymatycznej biotransformacji

Na podstawie otrzymanych wyników (tab. 3, 4) można stwierdzić, że na wydajność procesu enzymatycznego odbarwienia ma wpływ zarówno zastosowany układ odbarwiający jak i rodzaj barwnika.

Tabela 3

#### Wydajność procesu odbarwienia

Materiał biologiczny	Uzyskane odbarwienie [%]		
	AB 62	RB 81	AR 27
roztwór pochodowlany	95,4	94,2	88,7
aktywna grzybnia	97	93,5	15
roztwór pochodowlany + aktywna grzybnia	97,7	96,7	79

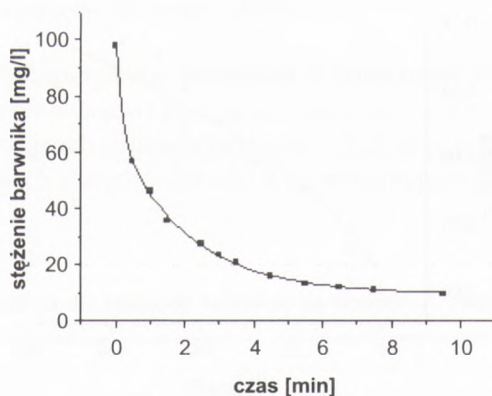
Tabela 4

#### Czas, po którym uzyskano wydajność 90%

Materiał biologiczny	Czas uzyskania 90% odbarwienia [min]		
	AB 62	RB 81	AR 27
roztwór pochodowlany	5	9	BO
aktywna grzybnia	100	1200	BO
roztwór pochodowlany + aktywna grzybnia	7	10	BO

BO – brak odbarwienia.

Generalnie zaobserwowano, że barwniki AB 62 i RB 81 ulegają biotransformacji szybciej i efektywniej niż barwnik AR 27 we wszystkich trzech układach. W próbach z roztworem pochodowlanym lakazy spadek stężenia w przypadku dwóch pierwszych barwników następuje prawie natychmiast po połączeniu barwników z roztworem lakazy – 8 minut (wykres 4). Nieco lepsze rezultaty odbarwienia dla AB 62



Wykres 4. Spadek stężenia barwnika RB 81 w czasie, dla układu plyn pochodowlany – barwnik.

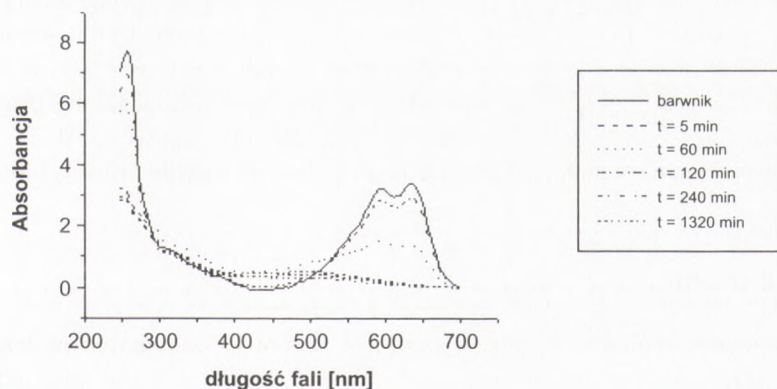


względem RB 81 wynikają z niższego o połowę stężenia pierwszego barwnika. Barwnik AR 27 ulega odbarwianiu znacznie wolniej, jednak ostatecznie osiąga zbliżony stopień odbarwienia. Podobnie w próbach z biomasą grzybni dla AB 62 i RB 81 otrzymano dobre rezultaty odbarwienia (około 95%) podczas gdy barwnik AR 27 ulega odbarwianiu znacznie wolniej i znacznie mniej efektywnie. Po długim czasie AR 27 osiąga stopień odbarwienia równy 15% i dalej już nie ulega biotransformacji.

Dla barwników AB 62 i RB 81 wszystkie trzy układy zastosowane do odbarwiania doprowadziły do bardzo zbliżonych rezultatów końcowych. Kolejne próby różniły się jednak od siebie szybkością procesu. Największą szybkość zaobserwowano dla układu z roztworem pochodzonym kompleksu enzymatycznego lakazy, gdzie końcowe stężenie barwnika zostało osiągnięte już po około 8 minutach. Najpóźniej końcowe stężenie roztworu odbarwianego zostało osiągnięte dla układu z odfiltrowaną samą biomasą, trwało to około 120 minut dla AB 62 i 1200 minut dla RB 81. Taki rezultat odbarwiania wynika stąd, że lakaza jest enzymem zewnątrzkomórkowym i jej aktywność jest największa w roztworze. W próbach z biomasą na proces biotransformacji aktywną lakazą nałożył się także proces biosorpcji fizycznej, który zwiększył ubytek stężenia barwnika w roztworze.

W przypadku barwnika AR 27 stwierdzono, że efekt końcowy odbarwiania zależy od zastosowanego układu odbarwiającego. Najlepsze rezultaty uzyskano w procesie z roztworem pochodzonym lakazy. Szybkość zajścia reakcji była w tym przypadku największa. Układ z roztworem lakazy i biomasą odbarwiał nieco wolniej, ale końcowy stopień odbarwienia był zbliżony do poprzedniego. Zdecydowanie najgorzej proces zachodził w układzie z samą biomasą, gdzie stopień odbarwienia wynosił zaledwie 15%. Czyli tyle samo ile wynosi względne odbarwienie w wyniku sorpcji na grzybni.

W wyniku biotransformacji pod wpływem aktywnej lakazy niektóre barwniki zmieniają swoje pierwotne zabarwienie. W przeprowadzonych badaniach jest to widoczne w przypadku barwnika AB 62, który zmienia swoje zabarwienie z niebieskiego na czerwonawy (wykres 5). Informuje o tym przesunięcie się maksimum absor-



Wykres 5. Widma barwnika AB 62 podczas procesu odbarwiania w układzie biomasa aktywnej grzybni - barwnik.



bancji na widmach w miarę przebiegu procesu z długości fali rzędu 638 nm na 470 nm. W przypadku barwników RB81 i AR 27 nie zaobserwowano tego zjawiska.

### 3.3. Uwzględnienie procesu adsorpcji barwnika w procesie z aktywną biomasą

W celu zmierzenia wpływu procesu sorpcji na odbarwienie dokonano zestawienia procentowych wartości ubytku barwy w procesie z nieaktywną biomasą (sama biosorpcja) i z biomasą zawierającą aktywny enzym. Obliczono także procentowe udziały biosorpcji i biotransformacji przyjmując wartość odbarwienia biomasą aktywną za 100% (tab. 5).

Tabela 5

Udziały sorpcji i biotransformacji w procesie odbarwiania

	Sorpcja + biotransformacja (biomasa aktywna)	Sorpcja (biomasa nieaktywna)	Biotransformacja	Udział procentowy sorpcji	Udział procentowy biotransformacji
<b>AB 62</b>	96,5	46	50,5	47,7	52,3
<b>AR 27</b>	15	15	0	100	0
<b>RB 81</b>	93,5	30	63,5	32,1	67,9

Dla barwników AB 62 i RB 81 obserwujemy zarówno udział biosorpcji jak i biotransformacji w procesie odbarwiania. Udział procentowy biotransformacji enzymatycznej jest w obu przypadkach większy niż biosorpcji. Dla barwnika AB 62 różnice te są niewielkie natomiast dla RB 81 udział biotransformacji dwukrotnie przewyższa udział biosorpcji. W obu doświadczeniach zostały zachowane te same proporcje ilości biomasy do objętości roztworu barwnika. Proces biotransformacji zaczynał się z pewnym opóźnieniem w stosunku do biosorpcji, gdyż wymagał on uwolnienia enzymu do roztworu. Początkowo zachodził zatem sam proces biosorpcji, a następnie w miarę wzrostu aktywności enzymu lakazy w roztworze dołączał się proces biotransformacji. Inną sytuację zaobserwowano dla barwnika azowego AR 27. Z przeprowadzonych badań wynika, że odbarwienie jest efektem jedynie procesu biosorpcji.

## 4. Podsumowanie

Uzyskane wyniki badań świadczą o tym, że kompleks enzymatyczny lakazy wytwarzany przez grzyby „białej zgnilizny” drewna *Cerrena unicolor* jest aktywnym czynnikiem dekoloryzacji barwników włókienniczych i może być wykorzystany do oczyszczania ścieków zawierających barwniki. W przypadku zastosowania biomasy

grzybni proces enzymatyczny wspomagany jest fizyczną sorpcją barwnika na powierzchni biomasy. Otrzymane wyniki są zgodne z rezultatami otrzymywanymi także przez inne zespoły badawcze zajmujące się tym tematem (13,14). Wyniki pracy mogą posłużyć jako punkt wyjścia do dalszych kompleksowych badań nad opracowaniem nowoczesnej metody oczyszczania biologicznego barwnych ścieków włókienniczych.

## Literatura

1. Anielak A. M., (1998), *Chemiczne i fizykochemiczne oczyszczanie ścieków*, Wyd. Uczelniane Politechniki Koszalińskiej, Koszalin.
2. Kochmańska-Rdest J., Jarosz-Wilkołaska A., Malarczyk E., Wardas W., Dołowy M., Leonowicz A., (2001), *Dekoloryzacja i biodegradacja barwników stosowanych w przemyśle przy udziale materiału grzybowego*, Materiały Sympozjum Naukowo-Techniczne „Biotechnologia Środowiska”, Wisła-Jarzębata, 427-434.
3. Bogusz Z., (1990), *Woda i ścieki w procesach chemicznej obróbki włókna*, Technik Włókienniczy, 4, 120-126.
4. Kapdan I. K., Kargı F., McMullan G., Marchant R., (2000), *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 381-387.
5. Walker G. M., Weatherley L. R., (2000), *Environmental Pollution*, 108, 219-223.
6. Ledakowicz S., Solecka M., Zylła R., (2001), *Journal of Biotechnology*, 89, 175-184.
7. Mascolo G., Lopez A., Bozzi A., Tiravanti G., (2002), *Ozone Science and Engineering*, 24, 439-446.
8. Leonowicz A., Wojtaś-Wasilewska M., Rogalski J., Luterek J., (1991), *Biotechnologia*, 1 (11), 39-59.
9. Mayer A. M., Staples R. C., (2002), *Phytochemistry*, 60, 551-565.
10. Swamy J., Ramsay J. A., (1999), *Enzyme and Microbial Technology*, 24, 130-137.
11. Krauze S., (1998), *Przegląd Włókienniczy*, 4, 23-25.
12. Wesenberg D., Kyriakides I., Buchon F., Gerin P. A., Agathos S. N., (2002), *Dye-containing textile effluents – effects on and decolorization by ligninolytic basidiomycetous strains*, 29<sup>th</sup> Conference SSCHE.
13. Jarosz-Wilkołaska A., Malarczyk E., Jamroz T., Ledakowicz S., (2002), *Inżynieria i Aparatura Chemiczna*, 3, 59-60.
14. Nyanhongo G. S., Gomes J., Gübitz G. M., Zvauya R., Read J., Steiner W., (2002), *Water Research*, 36, 1449-1456.