

УДК 542.943
DOI 10.26456/vtchem2020.3.3

КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ 2,3,6-ТРИМЕТИЛФЕНОЛА

О.В. Гребенникова

Тверской государственный технический университет

Аннотация. В работе приводится расчет кинетических параметров V_{\max} и K_m для реакции окисления 2,3,6-триметилфенола пероксидом водорода в присутствии нативной и иммобилизованной пероксидазы корня хрена. Иммобилизация пероксидазы осуществлялась на магнитные наночастицы Fe_3O_4 и неорганические носители SiO_2 , Al_2O_3 . Образцы SiO_2 и Al_2O_3 были предварительно модифицированы и активированы, с помощью хитозана и глутарового альдегида, соответственно. Магнитные наночастицы предварительно обрабатывались 3-аминопропилтриэтоксисиланом для обеспечения поверхности носителя необходимыми для ковалентной иммобилизации функциональными группами $-NH_2$. Установлено, что магнитные наночастицы являются наиболее подходящим носителем для гетерогенного биокатализатора в реакции окисления 2,3,6-триметилфенола. К тому же, такой катализатор может легко отделяться от реакционной смеси и продуктов реакции с помощью внешнего магнитного поля.

Ключевые слова: пероксидаза, иммобилизация, окисление, 2,3,6-триметилфенол

В настоящее время ферменты широко применяются в различных областях промышленности, как эффективные и экологически безопасные катализаторы. Например, пероксидаза корня хрена (фермент класса оксидоредуктаз, катализирующих окислительно-восстановительные реакции, КФ 1.11.1.7), широко используется в окислении фенольных соединений [1,2]. Однако, ферменты не могут быть использованы многократно из-за трудностей в отделении их от реагентов и продуктов реакции. Решить эти проблемы помогает иммобилизация ферментов на различных носителях. Неорганические носители в качестве адсорбентов для ферментов имеют свои преимущества, такие как, например, невысокая стоимость, устойчивость в водных средах, широкий диапазон морфологических особенностей. При этом иммобилизация, зачастую, осуществляется с помощью образования ковалентных связей между белковой молекулой фермента и носителем и в настоящее время такой способ иммобилизации является одним из доминирующих [3-7]. А исследование кинетических

особенностей различных процессов в присутствии иммобилизованных ферментов является неотъемлемой частью изучения механизмов протекания реакций [8].

В данной работе исследовался процесс окисления 2,3,6-триметилфенола с помощью иммобилизованной пероксидазы корня хрена. В результате такого окисления был получен полупродукт витамина Е (2,3,5-триметилгидрохинон). Иммобилизация фермента проводилась на следующие носители – магнитные наночастицы, SiO_2 , Al_2O_3 . Использование магнитных наночастиц Fe_3O_4 в качестве носителей для ферментных систем обусловлено простотой отделения синтезированного гетерогенного биокатализатора от реакционной смеси с помощью неодимового магнита [9,10]. К дополнительным преимуществам использования наночастиц также можно отнести их наноразмер, благодаря которому гетерогенная система может приближаться к гомогенной [11].

В работе магнитные наночастицы синтезировали полиольным способом. Модификацию их поверхности осуществляли с помощью 3-аминопропилтриэтоксисилана. Модификацию и активацию поверхностей SiO_2 , Al_2O_3 проводили с использованием полистиролсульфоната натрия, хитозана и глутарового диальдегида. По уравнению Михаэлиса – Ментен были определены основные кинетические параметры.

Материалы и методы

Материалы

Этиленгликоль (99,9 %), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (99 %), янтарная кислота (99,9 %), мочевины (99,8 %), этанол (95 %), 3-аминопропилтриэтоксисилан (>98 %), SiO_2 (99,9 %), Al_2O_3 (99,9 %), хитозан (степень деацетилирования 75–80%), глутаровый альдегид (25%), пероксидаза (RZ > 2.0, акт. > 150 ед/мг) были использованы в синтезе биокатализаторов. 2,3,6-триметилфенол (95 %) и пероксид водорода (50 %) использовались для тестирования биокатализаторов.

Методика приготовления биокатализаторов на основе иммобилизованной пероксидазы

Прокаленные образцы Al_2O_3 и SiO_2 массой по 1 г последовательно обрабатывали полистиролсульфонатом натрия (ПСС), хитозаном (Хит.), глутаровым альдегидом (Глут.) и пероксидазой (HRP). Концентрации всех реагентов представлены в Таблице 1.

Т а б л и ц а 1

Концентрации реагентов для иммобилизации HRP на Al_2O_3 и SiO_2

Носитель	Концентрация, г/л			
	ПСС	Хит.	Глут.	HRP
SiO_2	0.25	0.15	0.2	0.15
Al_2O_3	0.25	0.15	0.2	0.15

В результате были получены образцы биокатализаторов: HRP/Глут./Хит./ПСС/ SiO_2 и HRP/Глут./Хит./ПСС/ Al_2O_3 .

Синтезированные полиольным методом наночастицы Fe_3O_4 [9] сначала обрабатывались 3-аминопропилтриэтоксисиланом (АПТС, 2 мкл/мл). Затем на подготовленную поверхность была иммобилизована HRP. Для этого раствор фермента перемешивали с суспензией подготовленных наночастиц в течение 6 часов. Полученный биокатализатор HRP/АПТС/ Fe_3O_4 промывался несколько раз водой и высушивался под вакуумом.

Кинетические исследования синтезированных биокатализаторов

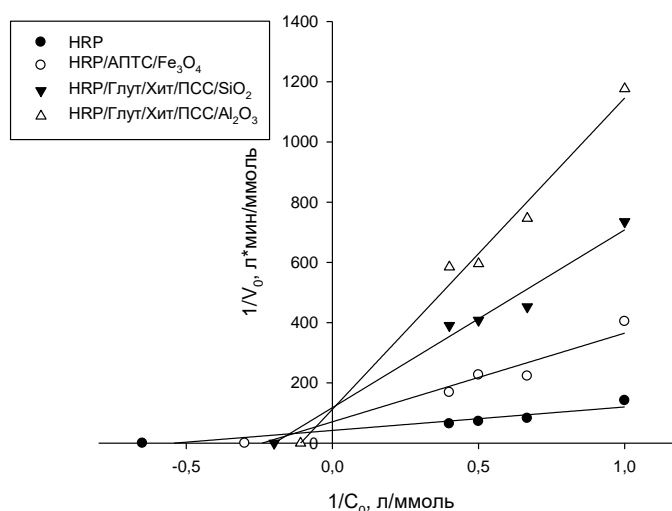
Реакция окисления ТМФ проводилась в термостатируемом стеклянном реакторе с перемешивающим устройством при следующих условиях: $c_0(H_2O_2) = 1.5$ моль/л, $t = 40$ °С, pH 6.5, $c_{кат} = 0.2$ г/л.

Кинетические параметры такие как максимальная скорость V_{max} и константа Михаэлиса K_m определяли, используя различные начальные концентрации субстрата и фиксированные концентрации фермента и пероксида водорода, поскольку ферментативная реакция наиболее полно характеризуется в начальный момент времени, пока не происходит ингибирование продуктом реакции [12]. Для нахождения кинетических параметров был использован метод Лайнуивера –Берка, согласно которому строится график зависимости $1/V$ от $1/[S]$. Полученная прямая пересекает ось ординат в точке $1/V_{max}$ и ось абсцисс в точке $-1/K_m$. По углу наклона полученной прямой определяется K_m/V_{max} .

Количество катализатора, которое идет на получение 1 мг целевого продукта за 20 с было взято за единицу активности.

Результаты и обсуждения

График в координатах Лайнуивера-Берка для всех образцов синтезированных биокатализаторов, включая нативную пероксидазу представлен на Рис. 1.



Р и с . 1 - Зависимость $1/V_0$ от $1/C_0$ в реакции окисления ТМФ

Из Рис. 1 видно, что нативная HRP имеет наибольшее сродство с субстратом, поскольку с ней достигается наименьшее значение K_m (1.78 ммоль/л). Также, с использованием свободного фермента достигается максимальная скорость реакции 0.024 ммоль/л·мин. При использовании HRP/APTC/ Fe_3O_4 в качестве катализатора для реакции окисления ТМФ значение K_m увеличивается до 4.15 ммоль/л. Самое низкое сродство с субстратом показал биокатализатор HRP/Глут./Хит./ПСС/ Al_2O_3 , для него значение K_m составило 9.19 ммоль/л, при этом $V_{max} = 0.009$ ммоль/л·мин.

Значения активностей всех исследуемых биокатализаторов представлены в таблице 1.

Таблица 2

Значения активностей биокатализаторов

Биокатализатор	HRP	HRP/APTC/ Fe_3O_4	HRP/Глут./Хит./ПСС/ SiO_2	HRP/Глут./Хит./ПСС/ Al_2O_3
Активность, ед.акт./г(кат)	0.346	0.237	0.218	0.180

Из Табл. 2 видно, что наибольшую активность имеет нативная HRP – 0.346 ед.акт./г(кат). Далее, по эффективности следует HRP/APTC/ Fe_3O_4 . Невысокие значения кинетических параметров и активности биокатализаторов на основе SiO_2 и Al_2O_3 по сравнению с биокатализатором на основе магнитных наночастиц вероятно связаны с

конформационными изменениями белковой молекулы фермента и меньшим количеством иммобилизованной пероксидазы на носителях.

Заключение

Все образцы биокатализаторов проявили хорошую работу в процессе окисления ТМФ, что может быть использовано в синтезе полупродукта витамина Е. HRP, иммобилизованная на магнитные наночастицы Fe₃O₄ проявила большую активность (0.237 ед.акт./г(кат.)), по сравнению с образцами в которых в качестве носителя использовались SiO₂ и Al₂O₃ (0.218 и 0.180 ед.акт./г(кат.)), соответственно). Активность HRP иммобилизованной на неорганические носители стала ниже, по сравнению с нативной пероксидазой (0.346 ед.акт./г(кат.)). Однако, фермент после иммобилизации становится гетерогенным, что позволяет отделять его от реакционной смеси и повторно использовать в последующих экспериментах практически без потери активности. В случае использования магнитных наночастиц в качестве носителя HRP легко отделялась от продуктов реакции с помощью неодимового магнита, что является несомненным преимуществом, такого типа биокатализатора.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ 19-79-00134.

Список литературы

1. Grosu E.F., Carja G., Froidevaux R. Development of horseradish peroxidase/layered double hydroxide hybrid catalysis for phenol degradation // *Chem Intermed.* 2018. 44: 7731.
2. Matthew P. Thompson, Itziar Peñafiel, Sebastian C. Cosgrove, and Nicholas J. Turner Biocatalysis Using Immobilized Enzymes in Continuous Flow for the Synthesis of Fine Chemicals // *Organic Process Research & Development.* **2019.** **23** (1), 9-18 DOI: 10.1021/acs.oprd.8b00305
3. Tikhonov, B.B., Sulman, E.M., Stadol'nikova, P.Y. et al. Immobilized Enzymes from the Class of Oxidoreductases in Technological Processes: A Review // *Catal. Ind.* 2019. vol. 11, pp. 251–263.
4. Sulman E.M., Matveeva V.G., Bronstein L.M., Design of biocatalysts for efficient catalytic processes // *Current Opinion in Chemical Engineering.* 2019. vol. 26. p. 1–8.
5. Nguyen H.H., Lee S.H., Lee UJ, Fermin C.D., Kim M., Immobilized Enzymes in Biosensor Applications // *Materials (Basel).* 2019. 12(1):121.
6. Al-Qodah Z., Al-Shannag M., Al-Busoul M., Penchev I., Orfali W., Immobilized enzymes bioreactors utilizing a magnetic field: A review, // *Biochemical Engineering Journal.* 2017. vol. 121. pp. 94–106.
7. Sirisha V.L., Jain A., Jain A., Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes // *Adv Food Nutr Res.* 2016. vol. 79. pp 179–211.

8. T.Jeoh, M.J. Cardona, N. Karuna, A.R. Mudinoor Mechanistic kinetic models of enzymatic cellulose hydrolysis - A review // Biotechnology and Bioengineering. 2017. 114(7). pp 1369-1385.
9. Grebennikova O., Sulman A., Matveeva V. et al., Physical–chemical analysis and kinetics of the magnetic biocatalyst for 2,3,6-trimethylphenol oxidation // Reac Kinet Mech Cat. 2020.
10. Cheng C., Xu F., Gu H., Facile synthesis and morphology evolution of magnetic iron oxide nanoparticles in different polyol processes // NewJ. Chem. 2011. vol. 35. pp 1072–1079.
11. Polshettiwar V., Luque R., Fihri A., Zhu H., Bouhrara M., Basset J., Magnetically Recoverable Nanocatalysts, Am. Chem. Soc. Chem. Rev. 2011. vol. 111. pp 3036–3075.
12. Ферментативная кинетика: учебное пособие. В 2 ч. Ч. 1 / М.Э. Ламберова; Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. – Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2013. – 76 с.

Об авторах:

ГРЕБЕННИКОВА Ольга Валентиновна – кандидат химических наук, доцент кафедры Биотехнологии химии и стандартизации, ФГБОУ ВО Тверской государственный технический университет, e-mail: omatveevatstu@mail.ru

KINETIC PARAMETERS OF THE ENZYMATIC REACTION OF OXIDATION OF 2,3,6-TRIMETHYLPHENOL

O.V. Grebennikova

Tver State Technical University

In the work the calculation of the kinetic parameters V_{max} and K_m for the oxidation of 2,3,6-trimethylphenol with hydrogen peroxide in the presence of native and immobilized horseradish root peroxidase was presented. Peroxidase was immobilized on magnetic Fe_3O_4 nanoparticles and inorganic carriers SiO_2 , Al_2O_3 . Samples of SiO_2 and Al_2O_3 were previously modified and activated by chitosan and glutaraldehyde, respectively. Magnetic nanoparticles were pretreated with 3-aminopropyltriethoxysilane to provide the functional groups $-NH_2$ required for covalent immobilization on the support surface. It has been established that magnetic nanoparticles are the most suitable carrier for a heterogeneous biocatalyst for the oxidation reaction of 2,3,6-trimethylphenol. Besides, such a catalyst can be easily separated from the reaction mixture and reaction products using an external magnetic field.

Keywords: peroxidase, immobilization, oxidation, 2,3,6-trimethylphenol