

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 544.47:544.344

DOI 10.26456/vtchem2020.4.1

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ОКИСЛЕНИЯ 2,3,6-ТРИМЕТИЛФЕНОЛА В ПРИСУТСТВИИ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ПЕРОКСИДАЗЫ

О.В. Гребенникова¹, А.М. Сульман^{1,2}, В.П. Молчанов¹,
Е.М. Михайлова¹, И.П. Шкилева¹, В.Г. Матвеева^{1,2}

¹ – Тверской государственный технический университет, Тверь

² – Тверской государственный университет, Тверь

В работе изучался процесс окисления 2,3,6-триметилфенола в присутствии иммобилизованной пероксидазы корня хрена. В результате такого окисления был получен полупродукт витамина Е (2,3,5-триметилгидрохинон). Иммобилизация фермента проводилась на магнитные наночастицы, на SiO₂ и Al₂O₃. Все исследованные биокатализаторы показали стабильную работу в процессе окисления 2,3,6-триметилфенола с помощью пероксида водорода. Таким образом, синтезированные биокаталитические ферментные системы могут успешно применяться в качестве альтернативных катализаторов окисления замещенных фенолов с целью получения биологически активных соединений класса витаминов.

Ключевые слова: полупродукт витамина Е, фермент, иммобилизация, магнитные наночастицы, биокатализ, пероксид водорода, каталитическое окисление, пероксидаза.

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. Преимущества иммобилизованных ферментов перед нативными формами очевидны: простота отделения гетерогенного катализатора от реакционной среды и возможность его повторного использования; изменение каталитической активности фермента путем изменения свойств носителя под действием физических факторов; возникновение стабильности белковой молекулы

к денатурирующим воздействиям; возможность регулирования скорости каталитической реакции [3].

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 [4]. А исследование кинетических особенностей различных процессов в присутствии иммобилизованных ферментов является неотъемлемой частью изучения механизмов протекания реакций [5].

В данной работе изучался 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 в качестве носителей для ферментных систем обусловлено простотой отделения синтезированного гетерогенного биокатализатора от реакционной смеси с помощью неодимового магнита [6]. К дополнительным преимуществам использования наночастиц также можно отнести их наноразмер, благодаря которому гетерогенная система может приближаться к гомогенной [7].

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

Методика приготовления биокатализаторов на основе пероксидазы, иммобилизованной на SiO_2 и Al_2O_3

Образцы носителя (Al_2O_3 или SiO_2) массой по 1 г прокаливали при 300 °С в течение 3 ч, после чего проводили модификацию их поверхности. Для этого Al_2O_3 или SiO_2 вводили в раствор полистиролсульфонат натрия (ПСС) (объем – 10 мл, концентрация – 0.25 г/л), перемешивали в течение 60 мин, отфильтровывали, промывали дистиллированной водой до pH=7 и сушили под вакуумом при 60 °С (24 ч). Следующий этап модификации – обработка образцов раствором хитозана (Chit, 0.15 г/л) в 50 мл 0.01 М уксусной кислоты при

перемешивании в течение 60 мин с последующим фильтрованием, отмывкой дистиллированной водой и высушиванием под вакуумом при 60 °С. Для прочного связывания фермента с носителем полученные образцы (1 г) обрабатывали раствором глутарового диальдегида (GA, объем – 50 мл, концентрация – 0.2 г/л) при перемешивании в течение 60 мин. Подготовленный таким образом носитель помещали в раствор HRP (10 мл, 0.15 мг/мл), перемешивали, как и ранее, в течение 60 мин, полученный образец биокатализатора отфильтровывали, промывали и сушили при 25 °С под вакуумом. В результате такого способа иммобилизации HRP были получены биокатализаторы $Al_2O_3/PSS/Chit/GA/HRP$ и $SiO_2/PSS/Chit/GA/HRP$.

Методика приготовления биокатализатора на основе HRP, иммобилизованной на магнитные наночастицы

Для синтеза магнитных наночастиц был выбран полиольный метод, преимущество которого заключается в легкости исполнения и высокой намагниченностью полученных частиц Fe_3O_4 [8]. Для этого в химическом стакане были полностью растворены в 30 мл этиленгликоля $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (3 ммоль), янтарная кислота (1 ммоль) и мочевины (30 ммоль) при энергичном перемешивании. Полученный раствор переносился в тefлоновый стакан (объемом 50 мл) автоклава из нержавеющей стали (Parr Instr.) и выдерживался при 200 °С от 2 до 4 часов. После охлаждения до комнатной температуры магнитом отделялся черный осадок, который промывался этанолом несколько раз до прозрачного раствора. Затем высушивался под вакуумом при 60 °С в течение 6 часов. Для модификации магнитных наночастиц 3-аминопропилтриэтоксисиланом (APTS) к их 25 мл коллоидного этанольного раствора приливали 150 мл этанола, 1 мл воды и АПТС (2 мкл/мл). Раствор перемешивали в течение 5 часов магнитной мешалкой. Затем к промытой суспензии добавляли HRP (0.15 мг/мл) и перемешивали полученную смесь в течение 6 часов. В результате такого способа иммобилизации был получен биокатализатор $Fe_3O_4/APTS/HRP$.

Кинетические исследования синтезированных биокатализаторов

Окисление 2,3,6-триметилфенола (TMP) проводили в стеклянном реакторе, снабженном мешалкой и рубашкой для обогрева. В ходе проведения реакции контролировали температуру и концентрации субстрата и пероксида водорода. Суспензию катализатора (0.1 г) и раствор субстрата (30 мл) помещали в реактор. В ходе реакции дискретно добавляли пероксид водорода в количестве, эквивалентном содержанию субстрата, для предотвращения субстратного

ингибирования. Для поддержания постоянного значения pH среды в реакционную смесь добавляли фосфатный буфер. Через определенные промежутки времени отбирали пробы реакционной смеси. После проведения эксперимента биокатализатор отделяли фильтрацией (для $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ПСС}/\text{Хит}/\text{Глут}/\text{HRP}$ и $\text{SiO}_2/\text{ПСС}/\text{Хит}/\text{Глут}/\text{HRP}$). При использовании $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{АПТС}/\text{HRP}$ биокатализатор отделяли неодимовым магнитом. Анализ реакционной смеси проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (на установке Ultimate 3000).

Кинетические параметры, такие как максимальная скорость V_{\max} и константа Михаэлиса K_m определяли, используя различные начальные концентрации субстрата, поскольку ферментативная реакция наиболее полно характеризуется в начальный момент времени, пока не происходит ингибирование продуктом реакции [9]. Уравнение Михаэлиса-Ментен (1) преобразовывалось в такую форму, что графически оно выражалось прямой (2):

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (1)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} \quad (2)$$

где V – начальная скорость реакции, V_{\max} – максимальная скорость реакции при бесконечно большой концентрации субстрата; K_m – константа Михаэлиса; $[S]$ – начальная концентрация субстрата.

Строился график зависимости $1/V$ от $1/[S]$. Полученная прямая на пересечении с осью ординат дает $1/V_{\max}$. А с осью абсцисс – минус $1/K_m$. Угол наклона – K_m / V_{\max} .

За единицу активности биокатализатора принимали количество биокатализатора, которое катализирует 1 мг ТМГХ из ТМФ в течение 20 секунд при 40 °С.

Расчет термодинамических параметров осуществлялся с помощью теории активированного комплекса, которая детально рассматривает процесс химического превращения [10]. Особое внимание уделяется состоянию реагирующих молекул, которые являются промежуточными в ходе такого превращения. В теории активированного комплекса вводятся величины энтропии и энтальпии активации – ΔS^\ddagger и ΔH^\ddagger , которые равны энтропии и энтальпии перехода реагентов к активному комплексу. Эти величины можно определить, используя уравнение Эйринга:

$$\ln \left(\frac{k}{T} \right) = \ln \left(\frac{k_B}{h} \right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \Delta H^\ddagger / RT \quad (3)$$

где k – константа скорости, k_B – постоянная Больцмана, h – постоянная Планка.

Определение кинетических параметров синтезированных биокатализаторов

Кинетические параметры реакции окисления ТМФ, определенные по графику в координатах Лайнувера-Берка, приведены в таблице 1.

Таблица 1

Кинетические параметры синтезированных биокатализаторов

№	Катализатор	K_m , ммоль/л	V_{max} , ммоль/л×мин	Активность, ед.акт./г(кат)
1	HRP	1.78	0.024	0.346
2	Fe ₃ O ₄ /АПТС/HRP	4.15	0.014	0.237
3	SiO ₂ /ПСС/Хит/Глут/HRP	5.02	0.009	0.218
4	Al ₂ O ₃ /ПСС/Хит/Глут/HRP	9.19	0.009	0.180

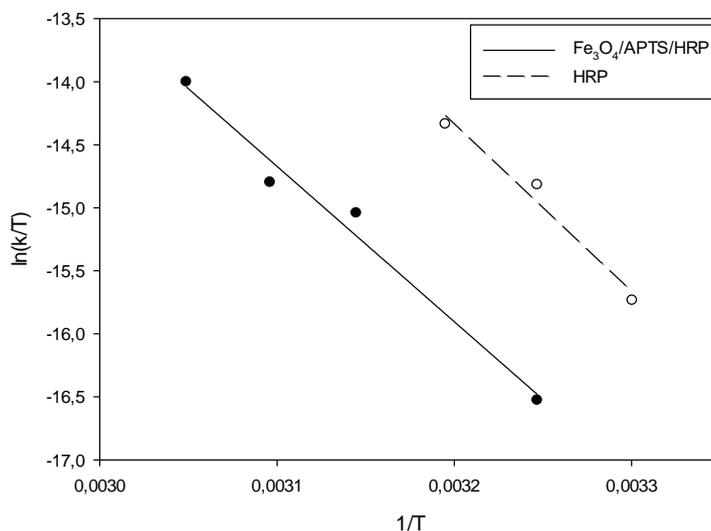
Из таблицы 1 видно, что нативная HRP имеет самую маленькую K_m 1.78 ммоль/л и самую большую V_{max} 0.024 ммоль/л×мин и активность 0.346 ед.акт./г(кат.). Следующим по эффективности биокатализатором является биокатализатор на основе HRP, иммобилизованной на магнитные наночастицы Fe₃O₄, для которого K_m 4.15 ммоль/л, V_{max} 0.014 ммоль/л×мин и активность 0.237 ед.акт./г(кат.). Фермент, иммобилизованный на SiO₂ и Al₂O₃, имеет сравнительно высокие значения K_m 5.02 и 9.19 ммоль/л и невысокие значения V_{max} 0.009 и 0.009 ммоль/л×мин и активность 0.218 и 0.180 ед.акт./г(кат.) соответственно. Невысокие значения активностей для биокатализаторов на основе SiO₂ и Al₂O₃ по сравнению с биокатализатором на основе Fe₃O₄ могут быть связаны с меньшим количеством пришитого фермента, а также изменением его конформации вследствие иммобилизации.

Снижение активности для иммобилизованной HRP по сравнению с нативной HRP можно объяснить изменением термодинамических параметров [11,12]. Для нахождения этих параметров проводилась серия экспериментов по определению зависимости константы скорости данной реакции от температуры для нативного фермента и HRP, иммобилизованной на Fe₃O₄ (Рисунок 1).

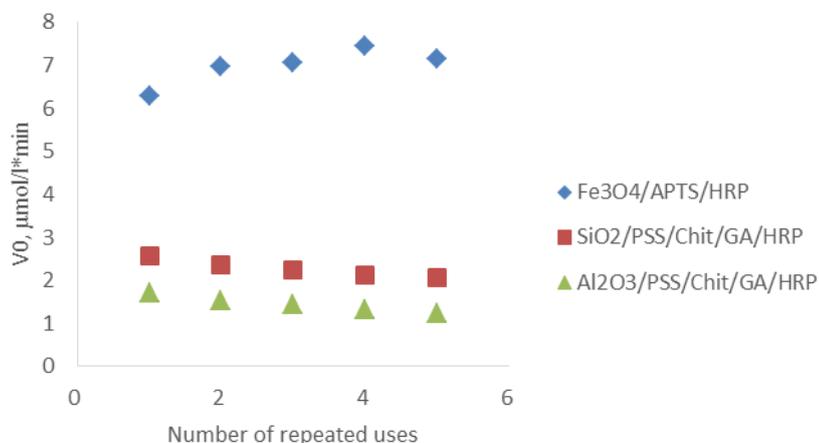
В работе также были определены термодинамические параметры ΔS^\ddagger и ΔH^\ddagger . Для нативной HRP $\Delta S^\ddagger = 36.4$ Дж/моль×К и $\Delta H^\ddagger = 110,5$ кДж/моль. Для HRP, иммобилизованной на Fe₃O₄, $\Delta S^\ddagger = 2.38$ Дж/моль×К и $\Delta H^\ddagger = 102,45$ кДж/моль. Уменьшение ΔS^\ddagger для HRP, иммобилизованной на Fe₃O₄, может быть связано с потерей степеней

свободы вследствие иммобилизации и, соответственно, с потерей доступности каталитического центра и снижением активности иммобилизованной HRP.

Стабильность синтезированных биокатализаторов оценивалась в пяти последовательных экспериментах (Рис. 2).



Р и с . 1 . Определение параметров температурной зависимости для нативной HRP и HRP, иммобилизованной на Fe₃O₄ (T = 40 °C, C_o^{TMФ} = 0.5 мг/мл, C^{HRP} = 0.01 мг/мл, pH = 6.5)



Р и с . 2 . Стабильность синтезированных биокатализаторов (T = 40 °C, C_o^{TMФ} = 0.5 мг/мл, C^{HRP} = 0.01 мг/мл, pH = 6.5)

В результате стабилизации активных центров фермента иммобилизованная HRP становится наиболее стабильной. Кинетические данные показывают, что активность биокатализаторов на основе HRP, иммобилизованной на SiO_2 и Al_2O_3 , снижается незначительно. Снижение активности может быть объяснено вымыванием фермента с поверхности носителя.

В случае HRP, иммобилизованной на Fe_3O_4 , начальная скорость реакции сначала немного увеличивается, а затем уменьшается. Увеличение активности биокатализатора может быть вызвано увеличением количества активных центров фермента.

Заключение

Все синтезированные биокатализаторы показали стабильную работу в процессе окисления 2,3,6-триметилфенола с помощью пероксида водорода. Количество повторяющихся экспериментов с каждым образцом биокатализатора было равно пяти (без необходимости регенерации). Однако пероксидаза, иммобилизованная на магнитные наночастицы Fe_3O_4 , проявила большую активность (0.237 ед.акт./г(кат.)) по сравнению с образцами, в которых в качестве носителя использовались SiO_2 и Al_2O_3 (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 пероксидаза легко отделялась от продуктов реакции с помощью неодимового магнита, что является несомненным преимуществом такого типа биокатализатора. Рассчитанные термодинамические параметры ΔS^\ddagger и ΔH^\ddagger позволили объяснить снижение активности для иммобилизованного фермента по сравнению с его нативной формой.

Синтезированные биокаталитические ферментные системы могут успешно применяться в качестве альтернативных катализаторов окисления замещенных фенолов с целью получения биологически активных соединений класса витаминов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-08-00468).

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.*, vol. 11, pp. 251–263, 2019.
4. Sulman E.M., Matveeva V.G., Bronstein L.M., Design of biocatalysts for efficient catalytic processes, *Current Opinion in Chemical Engineering*, vol. 26, p. 1–8, 2019
5. T.Jeoh, M.J. Cardona, N. Karuna, A.R. Mudinoor Mechanistic kinetic models of enzymatic cellulose hydrolysis - A review *Biotechnology and Bioengineering* 114(7), 2017, 1369-1385.
6. 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.
7. Polshettiwar V., Luque R., Fihri A., Zhu H., Bouhrara M., Basset J., Magnetically Recoverable Nanocatalysts, *Am. Chem. Soc. Chem. Rev*, vol. 111, pp 3036–3075, 2011.
8. Cheng C., Xuw F., Gu H., Facile synthesis and morphology evolution of magnetic iron oxide nanoparticles in different polyol processes, *NewJ. Chem.*, vol. 35, pp 1072–1079, 2011.
9. 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.
10. Шмид Р., Сапунов В.Н. Неформальная кинетика. В поисках путей химических реакций: Пер. с англ. – М.: Мир, 1985. – 264 с.
11. Анализ поверхности методами Оже- и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии / под ред. Д. Бриггса и М.П. Сиха. – М.: Мир, 1987. – 598 с;
12. M.I. Savenkova, Sh. L. Newmyer, and P. R. Ortiz de Montellano, Rescue of His-42 3 Ala Horseradish Peroxidase by a Phe-41 3 His Mutation, *J. Biol. Chem.*, Vol. 271, No. 40, Issue of October 4, pp. 24598–24603, 1996.

Об авторах:

ГРЕБЕННИКОВА Ольга Валентиновна – кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии, химии и стандартизации Тверского государственного технического университета, e-mail: olechkamatveeva@mail.ru

СУЛЬМАН Александрина Михайловна – преподаватель кафедры биотехнологии, химии и стандартизации Тверского государственного технического университета, e-mail: alexsulman@mail.ru

МОЛЧАНОВ Владимир Петрович – доктор технических наук, профессор кафедры биотехнологии, химии и стандартизации Тверского государственного технического университета, e-mail: molchanov@science.tver.ru

МИХАЙЛОВА Елена Михайловна – студент магистратуры Тверского государственного технического университета, e-mail: mikhaylovaem87@gmail.com

ШКИЛЕВА Ирина Павловна – кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии, химии и стандартизации Тверского государственного технического университета, e-mail: science@science.tver.ru

МАТВЕЕВА Валентина Геннадьевна – доктор химических наук, профессор кафедры биотехнологии, химии и стандартизации Тверского государственного технического университета, e-mail: matveeva@science.tver.ru

STUDY OF THE KINETICS OF ENZYMATIC OXIDATION OF 2,3,6-TRIMETHYLPHENOL IN THE PRESENCE OF IMMOBILIZED PEROXIDASE

O.V. Grebennikova¹, A.M. Sulman^{1,2}, V.P. Molchanov¹,
E.M. Mikhailova¹, I.P. Shkileva¹, V.G. Matveeva^{1,2}

1 – Tver State Technical University, Tver

2 – Tver State Technical University, Tver

We studied the oxidation of 2,3,6-trimethylphenol in the presence of immobilized horseradish root peroxidase. As a result of this oxidation, a semi-product of vitamin E (2,3,5-trimethylhydroquinone) was obtained. The enzyme was immobilized on magnetic nanoparticles, on SiO₂ and Al₂O₃. All the studied biocatalysts showed stable operation during the oxidation of 2,3,6-trimethylphenol using hydrogen peroxide. Thus, the synthesized biocatalytic enzyme systems can be successfully used as alternative catalysts for the oxidation of substituted phenols in order to obtain biologically active compounds of the vitamin class.

Keywords: *vitamin E semi-product, enzyme, immobilization, magnetic nanoparticles, biocatalysis, hydrogen peroxide, catalytic oxidation, peroxidase.*