

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 542.943-92

DOI 10.26456/vtchem2022.4.1

БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ МЕТИЛНАФТОЛА

О.В. Гребенникова, А.Е. Филатова, Е.И. Шиманская

Тверской государственный технический университет, г. Тверь

В работе исследована активность биокатализаторов на основе иммобилизованной пероксидазы на носителях Al_2O_3 и SiO_2 . Активность полученных биокатализаторов изучалась в каталитическом процессе окисления метилнафтола до витамина К. В работе показаны преимущества использования ферментных носителей Al_2O_3 , SiO_2 для иммобилизации пероксидазы в каталитическом синтезе метилнафтола. Подобраны оптимальные условия проведения процесса окисления метилнафтола: рН 7.2, температура 35-40 °С. Доказано, что катализатор, содержащий иммобилизованный фермент, проявляет большую активность, чем катализаторы с нативными ферментами.

Ключевые слова: пероксидаза корня хрена, окисление, метилнафол, биокатализатор, иммобилизация.

Хиноны, благодаря своей универсальной окислительно-восстановительной способности участвуют в многих биологических процессах (например, фотосинтез и дыхание). К тому же, витамины на основе хинонов являются важнейшими биологически-активными пищевыми добавками. Например, 2-метил-1,4-нафтохинон (витамин группы К) обладает антигеморрагическим действием и применяется в качестве кормовой добавки для животных. Недостаток витамина К может привести к уменьшению прочности костей. Потребность в этом продукте составляет до 10 000 тон в год [1-4].

В классическом производственном процессе витамин К получают путем окисления 2-метилнафталина бихроматом натрия в серной кислоте. Очевидно, что данный способ синтеза имеет ряд технологических и экологических недостатков, а именно: сложность отделения гомогенного катализатора от реакционной массы; проблемы с повторным применением гомофазного катализатора; очистка получаемых продуктов от токсичных примесей хрома; большое количество токсичных сточных вод [5, 6].

Авторы [7] предлагают совершенствование способа окисления 2-метилнафталина шестивалентным хромом с целью получения 2-метил-1,4-нафтохинона. Ими установлено, что максимальный выход целевого продукта достигается при дозировании серной кислоты в реакционную смесь. Однако данный способ не может быть рекомендован для реализации, поскольку целевой продукт все же содержит небольшие

примеси хрома. Другой способ жидкофазного окисления 2-метилнафталина был предложен Zi G. и др. [8] с помощью окислителя пероксида водорода (30%) и легированного лантана МСМ-41, как катализатора. В качестве растворителя была использована уксусная кислота. Катализатор показал высокую конверсию субстрата (95,8 %) и 69,3 % селективность по продукту в мягких условиях. Эксперимент по быстрой фильтрации горячего катализатора показал, что он действует как гетерогенный и его можно повторно использовать два раза, практически, не теряя, его активности. Другой способ синтеза 2-метил-1,4-нафтохинона путем окисления 2-метилфенола и 2-метиланилина в атмосфере 1,3-бутадиена был предложен учеными [9] с помощью Mo-V-P гетерополикислот. Выход целевого продукта менее 33 %, однако исследователи полагают, что такой способ синтеза витамина К имеет место быть, поскольку в процессе используется доступное сырье и весь синтез протекает за одну стадию.

Несмотря на большое количество исследований на эту тему, альтернативного способа синтеза витамина К, позволяющего осуществить его практическую реализацию до сих пор не найдено. Поэтому тема разработки селективного и активного катализатора синтеза биологически активных соединений остается до сих пор открытой.

В данной работе предлагается окисление 2-метил-1-нафтола пероксидом водорода в присутствии биокатализатора пероксидазы корня хрена (КФ 1.11.1.7). Имобилизованные формы ферментов имеют определенные преимущества. К ним относятся: высокая стабильность иммобилизованного фермента, возможность его повторного неоднократного использования, возможность регулирования скорости реакции, простота отделения биокатализатора от реакционной смеси, возможность изменения температурного режима работы фермента и увеличение скорости реакции [10-12]. В связи с этим пероксидаза была нанесена на неорганические носители SiO_2 и Al_2O_3 . Имобилизация осуществлялась путем химической сшивки белковой молекулы фермента с поверхностью носителя. Для этого поверхности SiO_2 и Al_2O_3 последовательно обрабатывались полистиролсульфонатом натрия, хитозаном, глутаровым альдегидом и пероксидазой.

Материалы и методы

Материалы

В работе использовались следующие материалы: SiO_2 (99.9 wt. %), Al_2O_3 (99.9 wt. %), гидроксид натрия (99,9 %), хитозан (степень деацетилирования 75–80 %), глутаровый альдегид (~25% водн.), H_2O_2 (35 %), пероксидаза ($RZ > 2.0$, 150 ед./мг), 2-метил-1-нафтол, 2-метил-1,4-нафтохинон (Sigma Aldrich).

Синтез биокатализаторов

Образцы Al_2O_3 (1 г) и SiO_2 (1 г) в течение 3 часов прокаливались при 300 °С. Затем неорганические носители обрабатывались 0.1 М NaOH (10 мл) в течение 60 минут. После чего образцы перемешивались с 10 мл полистиролсульфонатом натрия (PSS, 0.5 г/л) в течение 60 минут. Затем навеска промывалась дистиллированной водой до pH=7 и высушивалась под вакуумом при 60 °С в течение 24 часов. Высушенные образцы Al_2O_3 и SiO_2 в течении 60 минут обрабатывались раствором хитозана в уксусной кислоте (0.2 г/л, 50 мл). После фильтровались, промывались дистиллированной водой и высушивались при 60 °С под вакуумом. Затем модифицированные навески носителей активировались глутаровым альдегидом, который широко используется для иммобилизации ферментов. Альдегидные группы, находящиеся на концах глутарового альдегида образуют азометиновые связи между ферментом и сшивающим агентом, обеспечивая тем самым прочное ковалентное связывание пероксидазы с поверхностью носителя [13,14]. Для этого Al_2O_3 и SiO_2 в течении 60 минут обрабатывались водным раствором глутарового альдегида (0.3 г/л). Модифицированные и активированные образцы перемешивались в течение 60 минут с 10 мл раствора пероксидазы (0.15 мг/мл). Приготовленные образцы отфильтровывались, промывались и высушивались под вакуумом при 25 °С.

Окисление 2-метил-1-нафтола

В термостатируемый стеклянный реактор загружались 0.1 г навески биокатализатора, 30 мл субстрата и пероксид водорода, скорость подачи которого регулировалась насосом. pH системы регулировалось фосфатным буфером. Периодически из реакционной смеси отбирались образцы для анализа. В конце каждого эксперимента биокатализатор отделяли фильтрованием.

Анализ реакционной смеси проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (Ultimate 3000 (Dionex)). Высокая специфичность пероксидазы объясняется отсутствием дополнительных и промежуточных продуктов.

По конверсии 2-метил-1-нафтола оценивали активность биокатализаторов (ммоль/л единицу времени (с), отнесенной к массе катализатора (г)).

Результаты исследования

При использовании ферментных систем немаловажную роль на ход реакции играет значение pH реакционной среды, так как существует некоторое оптимальное состояние ионизации фермента, которое обеспечивает эффективное связывание белковой молекулы и субстрата, улучшая тем самым катализ реакции [15,16].

Для определения оптимального значения рН на скорость окисления 2-метил-1-нафтола, реакция проводилась при различных рН от 4.2 до 9.2. На рисунке 1 представлена зависимость скорости окисления при 20 % конверсии 2-метил-1-нафтола от значений рН.

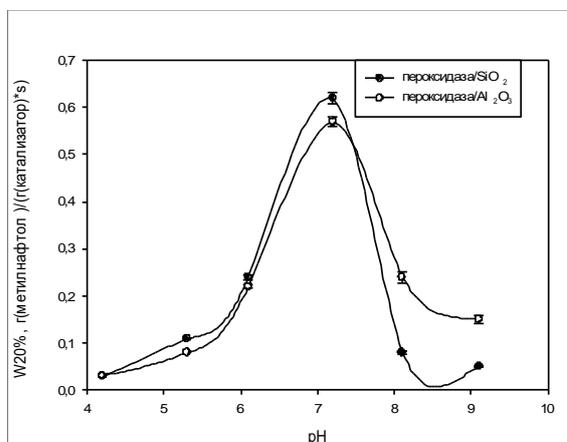


Рис. 1. Влияние рН на скорость окисления при 20% конверсии 2-метил-1-нафтола

Из рисунка 1 видно, что максимальная селективность наблюдается, когда реакция проводилась при рН 6.5 – 7.2. При рН ниже, чем 6 и выше, чем 8, сильно уменьшается скорость окисления. При значении рН 7.2 наблюдается самая высокая активность биокатализатора. Поэтому это значение рН поддерживалось во всех последующих экспериментах.

Температура проведения реакции так же является важным параметром в ферментативном катализе, так как для ферментов характерен «температурный оптимум». Изначально при увеличении температуры будет повышаться вероятность взаимодействия реагирующих веществ из-за увеличения скорости движения молекул. Этот факт приводит к ускорению ферментативной реакции до определенного предела. Затем происходит инактивация ферментной молекулы, что приводит к снижению скорости реакции [17,18]. Известны случаи, когда в процессе иммобилизации фермент становится термостабилен и температурный оптимум может увеличиться [10].

Для определения влияния температуры на скорость окисления 2-метил-1-нафтола проводились эксперименты в диапазоне температур от 20 до 50 °С. На рисунке 1 представлена зависимость скорости окисления при 20 % конверсии 2-метил-1-нафтола от температуры.

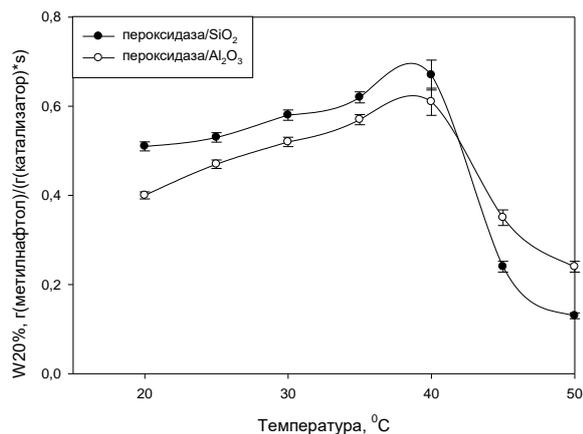


Рис. 2. Влияние температуры на скорость окисления при 20% конверсии 2-метил-1-нафтола

Рисунок 2 показывает, что наибольшая активность биокатализатора проявляется при температуре 35-40⁰С. При проведении экспериментов выше или ниже этих значений наблюдается дезактивация биокаталитических систем. Температура 40 °С была выбрана оптимальной для процесса окисления 2-метил-1-нафтола в присутствии иммобилизованной пероксидазы.

Так же, из представленных результатов видно, что пероксидаза, иммобилизованная на SiO₂ проявляет большую активность по сравнению с биокатализатором на основе Al₂O₃. Это может быть объяснено большим количеством OH- групп на поверхности SiO₂, чем на поверхности Al₂O₃ и, как следствие, наибольшим количеством прикрепленного к поверхности носителя фермента.

Выводы

Выбор оптимального носителя и способа иммобилизации фермента является неотъемлемой частью успешного применения иммобилизованных ферментов. В работе была исследована активность биокатализаторов на основе пероксидазы, иммобилизованной на Al₂O₃ и SiO₂. Подобраны оптимальные значение pH и температуры, 7,2 и 40 °С. Установлено, что наилучшие значения по выходу целевого продукта достигаются при использовании SiO₂ в качестве носителя для ферментной системы. Представленные результаты могут с успехом быть использованы в синтезе биологически активных соединений класса витаминов.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 21-19-00192).

Список литературы

1. Moller K., Wienhofer G., Westerhaus F., Junge K., Beller M. Oxidation of 1,2,4-trimethylbenzene (TMB), 2,3,6-trimethylphenol (TMP) and 2-methylnaphthalene to 2,3,5-trimethylbenzoquinone (TMBQ) and menadione (vitamin K3) // *Catalysis Today*. 2011. V. 173. P. 68–75.
2. Zi G., Chen D., Li B., Li Z., Luo X., Zhang J., Li L., Wang J. Liquid phase oxidation of 2-methylnaphthalene to 2-methyl-1,4-naphthoquinone over lanthanum doped MCM-41 // *Catalysis Communications*. 2014. V. 49. P. 10–14
3. Bouhadir K., Atallah H., Mezher R., Fatfat M., Gali-Muhtasib H., Elaridi J. Synthesis and biological assessment of novel acylhydrazone derivatives of 2-methyl-1,4-naphthoquinone // *Org. Commun*. 2017. 10:4. P. 259-272
4. Shimanskaya E., Doluda V., Sulman M., Matveeva V., Sulman E. Catalytic syntheses of 2-methyl-1,4-naphthoquinone in conventional solvents and supercritical carbon dioxide // *Chemical Engineering Journal*. 2014. V. 238. p. 206-209.
5. Заломаява О. В., Иванчикова И. Д., Холдеева О. А., Сорокин А. Б. Экологически чистые методы получения витаминов и функционализированных хинонов // *Российский химический журнал*. 2008. Т. 52. № 1. С. 57-67
6. Yerramreddy T. R., Pelton E., Dawson K. A, Yiannikouris A. An efficient synthesis of 2,3,5-trimethylbenzoquinone by metal-free oxidation of 1,2,4-trimethylbenzene // *Journal of Chemical Research*. 2019. V. 43.
7. Антипов А.С., Низов В.А. Синтез менадиона (2-метил-1,4-нафтохинона) с использованием соединений Cr+6 // *Башкирский химический журнал*. 2019. Том 26. № 2, с. 100-105.
8. Zi G., Chen D., Li B., Li Z., Luo X., Zhang J., Li L., Wang J. Liquid phase oxidation of 2-methylnaphthalene to 2-methyl-1,4-naphthoquinone over lanthanum doped MCM-41 // *Catalysis Communications*. 2014. V. 49. P. 10-14
9. Gogin, L.L., Zhizhina, E.G. Preparation of Vitamin K3 in Mo–V–P Heteropoly Acid Solutions by Diene Synthesis // *Kinet Catal*. 2020. V. 61. P. 276–282
10. Sulman E.M., Matveeva V.G., Bronstein L.M. Design of biocatalysts for efficient catalytic processes // *Current Opinion in Chemical Engineering*. 2019. V. 26. P. 1–8.
11. Sulman A., Matveeva V., Golikova E., Grebennikova O., Lakina N., Doluda V., Karpenkov A.Y., Sulman E. Oxidoreductase Immobilization on Magnetic Nanoparticles // *Chemical Engineering Transactions*. 2019.
12. Матвеева О.В., Лакина Н.В., Долуда В.Ю., Сульман Э.М. Современные тенденции применения оксидоредуктаз в промышленности // *Известия высших учебных заведений. Серия «Химия и химическая технология»*. 2013. Т.56. № 11. С. 13 – 18.

13. Šekuljica N.Ž., Prlainović N.Ž., Jovanović J.R., Stefanović A.B., Grbavčić S.Ž., Mijin D.Ž., Knežević-Jugović Z.D. Immobilization of horseradish peroxidase onto kaolin by glutaraldehyde method and its application in decolorization of anthraquinone dye // *Hem. ind.* 2015. V. 70.
14. Gür S.D., İdil N., Aksöz N. Optimization of Enzyme Co-Immobilization with Sodium Alginate and Glutaraldehyde-Activated Chitosan Beads // *Appl Biochem Biotechnol* 2018. V.184. P. 538–552
15. Ламберова М.Э. Ферментативная кинетика: учебное пособие. В 2 ч. Ч. 1; Алт. гос. техн. ун-т, БТИ. Бийск: Изд-во Алт. гос. техн. ун-та, 2013. 76 с.
16. Рогожин В.В., Перетолчин Д.В. Кинетика оксидазного окисления аскорбиновой кислоты пероксидом водорода в присутствии пероксидазы хрена // *Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Химия.* 2010. Т. 11 (187). с. 61 – 65.
17. Tikhonov, V.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. V. 11, P. 251–263.
18. 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. V. 130 (9), P. 317–329.

Об авторах:

ГРЕБЕННИКОВА Ольга Валентиновна – кандидат химических наук, доцент кафедры Биотехнологии химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, г. Тверь, наб. А. Никитина, 22); e-mail: omatveevatstu@mail.ru

ФИЛАТОВА Анастасия Евгеньевна – кандидат химических наук, доцент кафедры Биотехнологии химии и стандартизации, ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, г. Тверь, наб. А. Никитина, 22); e-mail: afilatowa@mail.ru

ШИМАНСКАЯ Елена Игоревна – кандидат химических наук, доцент кафедры Биотехнологии химии и стандартизации ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет» (170026, г. Тверь, наб. А. Никитина, 22); e-mail: shimanskaya-tstu@yandex.ru

BIOCATALYTIC OXIDATION OF METHYLNAPHTHOL

O.V. Grebennikova, A.M. Sulman, E.I. Shimanskaya

Tver State Technical University, Tver

The activity of biocatalysts based on immobilized peroxidase on Al₂O₃ and SiO₂ supports was studied. The activity of the obtained biocatalysts was studied in the catalytic process of methylnaphthol oxidation to vitamin K. The paper shows the advantages of using enzyme carriers Al₂O₃, SiO₂ for peroxidase immobilization in the catalytic synthesis of methylnaphthol. The optimal conditions for carrying out the process of methylnaphthol oxidation were selected: pH 7.2, temperature 35-40 °C. It has been proven that a catalyst containing an immobilized enzyme exhibits the highest activity than catalysts with native enzymes.

Keywords: *horseradish root peroxidase, oxidation, methylnafol, biocatalyst, immobilization.*