

УДК 577.151.4
DOI 10.26456/vtchem2020.3.2

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ПЕРОКСИДАЗЫ ДЛЯ ОКИСЛЕНИЯ ФЕНОЛА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ

Б.Б. Тихонов, П.Ю. Стадольникова, А.И. Сидоров, В.Г. Матвеева

Тверской государственной технической университет

Аннотация. В статье проведен синтез и исследование активности и стабильности биокатализаторов на основе пероксидазы хрена, иммобилизованной на различных носителях – ионообменной смоле Amberlite IR-120, диоксиде титана и микросферах из альгината натрия. Доказана эффективность синтезированных биокатализаторов в реакциях окисления фенола и 4-хлорфенола в концентрациях до 2 ммоль/л. Выявлены основные закономерности, позволяющие максимально повысить эффективность иммобилизации пероксидазы хрена на исследованных носителях.

Ключевые слова: пероксидаза хрена, фенол и его производные, иммобилизация

Фенол и его производные – наиболее распространенная и опасная группа органических загрязнителей водных ресурсов [1, с. 347]. Основное количество фенолов, содержащихся в сточных водах, составляет фенол (до 50% общего количества), крезолы - от 30 до 60%, содержание же многоатомных фенолов может достигать 15%. Практически все эти компоненты являются высокотоксичными, некоторые из них - канцерогены [2, с. 422]. При хлорировании фенолсодержащей воды образуются хлорфенолы, которые при окислении могут преобразовываться в диоксины – наиболее опасные канцерогены [3, с. 661]. Фенольные сточные воды образуются при термической переработке твердого топлива (коксохимические, сланцеперерабатывающие предприятия, газогенераторные станции), производстве пластмасс, синтетических тканей, красителей, бумаги, ароматических соединений, пестицидов, дезинфекции, пропитке древесины [1, с. 348].

В последние десятилетия было разработано несколько десятков методов деструкции фенола и его производных (химические, физические, каталитические, электрокаталитические и т.д.), однако большая их часть имеет существенные недостатки - высокая стоимость,

невысокая эффективность деструкции, образование широкого диапазона побочных продуктов [2, с. 422; 3, с. 663; 4, с. 2024]. Одним из наиболее эффективных методов утилизации фенольных загрязнителей считается биокаталитическая деструкция с использованием иммобилизованных ферментов, в частности – пероксидазы хрена [5, с.4; 6, с. 261]. Пероксидаза хрена (молекулярный вес ~ 40 кДа, К.Ф. 1.11.1.7) – фермент класса оксидоредуктаз, окисляющий органические субстраты с помощью пероксида водорода [7, с. 250]. Широкое практическое использование ферментов требует работы в денатурирующих условиях (при повышенной температуре, низких или высоких значениях pH, высоких концентрациях ингибиторов, субстратов и продуктов реакции). В связи с этим, стабилизация фермента иммобилизацией на носителе имеет большое значение в прикладном биокатализе, позволяя многократно использовать его практически без потери активности.

При целенаправленном синтезе биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов для выполнения конкретных практических задач важно наиболее полно исследовать физико-химические свойства синтезируемых систем, что позволяет при необходимости вносить изменения в компонентный состав, условия синтеза, а также проводить более точную и эффективную оптимизацию биокатализаторов. В связи с этим, целью данной работы было изучение основных физико-химических и практических закономерностей использования иммобилизованной пероксидазы для окисления фенола и его производных.

Экспериментальная часть

Для получения ферментативного экстракта, обладающего пероксидазной активностью, 5 г свежей сердцевинки корня *Armoracia rusticana* измельчали, смешивали с 50 мл фосфатного буферного раствора с pH = 7,0, выдерживали при постоянном перемешивании в течение 1 ч. Затем полученную смесь центрифугировали при 5000 об/мин в течение 20 мин, центрифугат фильтровали на микропористом фильтре, после чего оставляли для хранения в холодильнике при температуре $3 \pm 1^\circ\text{C}$.

Для изучения закономерностей использования иммобилизованной пероксидазы были созданы иммобилизованные биокатализаторы на основе 3 типов носителей:

1) Катионит Amberlite IR-120. Катионит предварительно выдерживали в 1 н. растворе HCl для перевода его в H⁺-форму, после чего выдерживали его последовательно в 0,1 %-ном растворе хитозана в 0,005 н. HCl (1 час), 2,5 %-ном растворе глутарового диальдегида (24 часа) и в ферментативном экстракте (1 час) с промежуточной отмывкой дистиллированной водой на фильтре Шотта от неспецифически

связанных компонентов. Иммуобилизация основана на взаимодействии SO_3^- групп носителя с аминогруппами хитозана, при этом далее свободные аминогруппы хитозана на поверхности носителя сшиваются с аминогруппами пероксидазы хрена с помощью глутарового диальдегида, альдегидные группы которого образуют с аминогруппами основания Шиффа (азотметиновую связь).

2) Диоксид титана. Навеску диоксида титана последовательно выдерживали при постоянном перемешивании в 0,1 н. растворе соляной кислоты (1 час), растворе хитозана (1 час), растворе 3-аминопропилтриэтоксисилана (1 час), растворе глутарового диальдегида (24 часа) и ферментативном экстракте (1 час) с промежуточной промывкой дистиллированной водой и фильтрованием на фильтре Шотта. Иммуобилизация основана на сшивке аминогрупп на поверхности носителя, наличие которых обусловлено присутствием в составе биокатализатора 3-аминопропилтриэтоксисилана и хитозана, с аминогруппами пероксидазы хрена с помощью глутарового диальдегида, альдегидные группы которого образуют с аминогруппами основания Шиффа.

3) Альгинатные микросферы. 5 мл раствора альгината натрия (0,075 г альгината натрия в 5 мл дистиллированной воды) по капле через шприц вводили в раствор хлорида кальция (0,99 г $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в 50 мл дистиллированной воды), в результате чего образовывались микросферы диаметром 2,5-3 мм, которые выдерживались в растворе 2 минуты, после чего промывались дистиллированной водой. Полученные микросферы были выдержаны в течение 12 часов в 50 мл раствора, содержащего карбодииимид и N-гидроксисукцинимид, промыты дистиллированной водой, затем выдержаны в течение 6 часов в ферментативном экстракте, обладающем пероксидазной активностью, снова промыты дистиллированной водой и хранились до проведения экспериментов в холодильнике при температуре $3 \pm 1^\circ\text{C}$. Иммуобилизация основана на образовании амидной связи между активированными N-гидроксисукцинимидом и карбодииимидом карбоксильными группами альгината натрия и аминогруппами пероксидазы хрена.

Определение активности синтезированных биокатализаторов осуществлялось в реакции окисления фенола и 4-хлорфенола в термостатируемом стеклянном реакторе в присутствии пероксида водорода и 4-аминоантипирина по увеличению оптической плотности реакционной смеси при длине волны 506 нм. Оптическая плотность реакционной смеси пересчитывалась в концентрации реагентов и конверсию по заранее определенным молярным коэффициентам поглощения. Кинетические параметры синтезированных биокатализаторов - константу Михаэлиса, предельную скорость реакции

окисления, активность фермента (ммоль субстрата в минуту на 1 г биокатализатора) определяли линеаризацией уравнения Михаэлиса-Ментен методом двойных обратных координат (координат Лайнуивера-Берка) при варьировании начальной концентрации фенола и 4-хлорфенола по начальной скорости реакции (V_0). Кроме того, для каждого биокатализатора рассчитывался процент сохранения активности нативного фермента (отношение активности растворимой формы фермента к активности иммобилизованного фермента в процентах). Для исследования операционной стабильности синтезированных биокатализаторов проводилось их 10-кратное повторное использование в реакции окисления фенола и 4-хлорфенола в термостатируемом стеклянном реакторе в присутствии пероксида водорода и 4-аминоантипиринна с промежуточной промывкой биокатализаторов дистиллированной водой.

Результаты и обсуждение

В ходе проведенных экспериментов были выявлены следующие оптимальные соотношения компонентов биокатализаторов:

а) биокатализатор на основе ионообменной смолы: 1 г катионита Amberlite IR-120, 50 мл 1 н. раствора HCl, 30 мл 0,1 %-ного раствора хитозана в 0,005 н. HCl, 10 мл 2,5 %-ного раствора глутарового диальдегида, 25 мл ферментативного экстракта.

б) биокатализатор на основе диоксида титана: 0,5 г диоксида титана, 25 мл 0,1 н раствора HCl, 50 мл 0,2 %-ного раствора хитозана в 0,005 н HCl, 4 мл 5 %-ного раствора 3-аминопропилтриэтоксисилана, 50 мл 2 %-ного раствора глутарового диальдегида, 25 мл ферментативного экстракта.

в) биокатализаторы на основе альгинатных микросфер: 10 г альгината натрия; 0,394 г карбодиимида и 0,144 г N-гидроксисукцинимиды в 50 мл дистиллированной воды; 50 мл ферментативного экстракта, полученного из 5 г сердцевинны корня *Artemisia rusticana*.

Для синтезированных биокатализаторов были определены кинетические параметры, приведенные в таблице 1.

Таблица 1

Кинетические параметры синтезированных биокатализаторов

Носитель	Субстрат	Константа Михаэлиса, ммоль/л	Предельная скорость реакции, ммоль/л·с	Активность, ед./г	Сохране- ние актив- ности, %
Amberlite IR-120	Фенол	2,89	0,11	0,980	39,1
	4-ХФ*	3,54	0,08	0,74	34,2
Диоксид титана	Фенол	0,12	0,38	0,26	48,1
	4-ХФ	0,14	0,32	0,23	42,5
Альгинат натрия	Фенол	1,98	0,74	0,61	51,2
	4-ХФ	2,14	0,67	0,58	46,4

* 4-ХФ – 4-хлорфенол

Эксперименты показали, что использование природных полиэлектролитов (хитозана и альгината натрия) является эффективной возможностью повышения активности и стабильности синтезируемых биокатализаторов. Модифицированная поверхность носителя приобретает благодаря этому способность к ковалентной сшивке с ферментом, что существенно повышает стабильность фермента, кроме того, увеличивается сорбционная емкость носителя.

Также выявлено, что активность биокатализаторов несущественно снижается за 10 циклов. Биокатализаторы на основе альгинатных микросфер сохранили 70 % исходной активности к последнему циклу использования по фенолу, 75 % - по хлорфенолу, на основе диоксида титана – 74% по фенолу, 79% - по хлорфенолу, на основе катионита – 72% по фенол, 80% - по хлорфенолу. Скорость реакции также несколько уменьшается от цикла к циклу, что связано как со смывом фермента с поверхности носителя, так и с частичным блокированием активных центров фермента во время процесса окисления. Однако выбранные методы иммобилизации пероксидазы хрена следует признать эффективными, так как они позволяют достаточно прочно закрепить фермент на поверхности носителя и минимизировать необратимую инактивацию активных центров пероксидазы. Это дает возможность использовать синтезированные биокатализаторы как в непрерывных, так и периодических процессах окисления фенола и его производных.

Было выявлено, что при синтезе иммобилизованных биокатализаторов с использованием в качестве сшивающего агента глутарового диальдегида (биокатализаторы на основе диоксида титана и ионообменных смол) очень важно выдерживать частицы модифицированных носителей в растворе глутарового диальдегида не менее 24 часов для максимально полного взаимодействия альдегидных

групп с аминогруппами на поверхности носителя. Кроме того, необходимым условием для успешной иммобилизации является обеспечение минимум 20-кратного избытка альдегидных групп глутарового диальдегида по отношению к аминогруппам на поверхности носителя, чтобы избежать поперечной сшивки аминогрупп между собой и обеспечить наличие на поверхности носителя свободных альдегидных групп для последующей пришивки к ним аминогрупп пероксидазы хрена.

При использовании в качестве активаторов карбоксильных групп носителей карбодиимида и N-гидроксисукцинимидом необходимо также достаточно продолжительно (не менее 12 часов) выдерживать частицы носителя в растворе активаторов с целью наиболее полного перехода карбоксильных групп носителя в реакционноспособную форму.

Все стадии синтеза биокатализаторов целесообразно проводить при комнатной температуре, так как повышение температуры может привести к необратимым изменениям в структуре биополимеров и ферментов, являющихся компонентами биокатализаторов, что отрицательно скажется на активности и стабильности синтезируемых биокатализаторов. Также, во избежание необратимого ингибирования биокатализаторов ионами металлов и органическими соединениями, при синтезе биокатализаторов важно использовать чистую посуду и инструменты.

Диапазон температур, который является оптимальным для проведения процесса утилизации токсичных хлорорганических соединений в лабораторных условиях, обусловлен прежде всего свойствами пероксидазы хрена – активного компонента биокатализатора. Вследствие белковой природы фермента, он активен только при температурах не выше 40 °С, далее происходят необратимые изменения в структуре белковой молекулы, приводящие к потере каталитической активности. Этот диапазон, согласно проведенным экспериментам, является оптимальным и для иммобилизованных препаратов пероксидазы, при этом температурная устойчивость всех синтезированных иммобилизованных препаратов к температурам от 30 до 40 °С на 25-30 % выше, чем у растворимого фермента за счет стабилизации структуры фермента и его активного центра на твердых носителях.

Диапазон pH, который является оптимальным для проведения процесса утилизации токсичных фенольных и хлорорганических соединений в лабораторных условиях, также обусловлен свойствами пероксидазы хрена. В каталитической активности пероксидазы участвуют функциональные группы белка, способные протонироваться или депротонироваться в зависимости от pH в растворе, а

реакционноспособной является, как правило, только одна из форм. Ионы H^+ и OH^- относятся к числу наиболее общих эффекторов ферментативной активности, поэтому их концентрация оказывает существенное влияние на кинетику действия гетерогенных биокатализаторов. Имобилизация вызывает некоторое смещение «колоколообразной» зависимости активности фермента от рН, особенно при использовании полиэлектролитных носителей. Минимизация этого смещения позволит избежать трудно прогнозируемого действия фермента в различных средах. Пероксидаза хрена в растворимой форме имеет оптимум рН 6,0-7,0. Для определения оптимума рН синтезированных иммобилизованных препаратов пероксидазы хрена реакция окисления хлорфенолов проводилась в буферных растворах с различными значениями рН. В результате были выявлены следующие оптимальные значения рН, при которых достигается наибольшая скорость окисления фенола и 4-хлорфенола:

- а) биокатализатор на основе ионообменной смолы: 6,0;
- б) биокатализатор на основе диоксида титана: 6,0;
- в) биокатализаторы на основе альгинатных микросфер: 6,5.

Кроме того, было выявлено, что диапазон рН, в которых всех 4 синтезированные иммобилизованные препарата пероксидазы хрена проявляют свою активность, на 15-20% расширился, по сравнению с растворимой формой фермента, что также связано со стабилизацией структуры фермента и его активного центра на твердых носителях.

Одним из способов снижения стоимости биокатализаторов на основе иммобилизованной на твердом носителе пероксидазы хрена является использование неочищенных или слабоочищенных ферментативных экстрактов из дешевого доступного растительного сырья (прежде всего - корня хрена или редьки). Эксперименты по сравнению эффективности дорогих очищенных и дешевых неочищенных экстрактов показали, что меньшая активность последних компенсируется невысокой стоимостью получения биокатализатора.

Так как процесс, протекающий при катализе иммобилизованными ферментами, является гетерогенным, то существенное влияние на скорость процесса оказывает массоперенос. Диффузия субстратов и продуктов реакции может быть сильно затруднена. Для избавления от внешнедиффузионного торможения целесообразно использовать увеличение интенсивности перемешивания (более 300 мин^{-1}), что приводит к уменьшению неподмешиваемого слоя вблизи частиц катализатора и тем самым способствует облегчению диффузии субстрата к активным центрам фермента и продуктов реакции от активных центров. Для уменьшения влияния внутридиффузионного торможения целесообразно постоянно

поддерживать насыщение фермента субстратом, так как при достаточно высоких концентрациях субстрата реакция переходит в кинетический режим, что существенно облегчает регулирование процесса и увеличивает эффективность биокатализаторов. Однако следует учитывать, что при значительном увеличении концентрации субстрата может происходить ингибирование активных центров фермента как избытком субстрата, так и избытком продукта реакции.

Получение в результате реакции окисления полимеризованных продуктов позволяет легко их удалить из реакционной среды, кроме того, в исследуемом процессе часть продуктов адсорбируется на поверхности частиц катализатора, тем самым уменьшая ингибирующее действие на активные центры. Однако процесс удаления полимеризованных продуктов также требует оптимизации, так как некоторые из продуктов окисления замещенных фенолов высокотоксичны, следовательно, их присутствие в очищенной воде недопустимо.

Выводы

Результаты исследований доказывают эффективность разработанных биокатализаторов на основе иммобилизованной пероксидазы хрена в реакциях окисления фенола и 4-хлорфенола в концентрациях до 2 ммоль/л. Выявлено влияние pH, температуры, концентрации субстратов фенола, природы носителей и сшивающих агентов на активность и стабильность синтезированных биокатализаторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-08-00424).

Список литературы

1. Michałowicz J., Duda W. Phenols – Sources and Toxicity // Polish Journal of Environmental Studies. 2007. Vol. 16(3). P. 347-362.
2. Anku W.W., Mamo M., Govender P., 2017, Phenolic compounds in water: sources, reactivity, toxicity and treatment methods. In: M. Soto-Hernandez, M. Palma-Tenango, M. del Rosario Garcia-Mateos (Eds.) Phenolic Compounds-Natural Sources, Importance and Applications. Chapter 17. 2017. InTechOpen. P. 420-443.
3. Al Hashemi W., Maraqa M.A., Rao M.V., Hossain M. M. Characterization and removal of phenolic compounds from condensate-oil refinery wastewater // Desalination and water treatment. 2015. Vol. 54(3). P. 660-671.
4. Al-Obaidi M.A., Kara-Zaitri C., Mujtaba I.M. Statistical-based modeling and optimization of chlorophenol removal from wastewater using reverse osmosis process // Chemical Engineering Transactions. 2018. Vol. 70. P. 2023-2028.

5. Wilberg K.Q., Nunes D.G., Rubio J. Removal of phenol by enzymatic oxidation and flotation // Braz. J. of Chem. Eng. 2000. Vol. 17. P. 4-7.

6. Tikhonov B., Sulman E., Stadol'nikova P., Sulman A., Golikova E., Sidorov A., Matveeva V. Immobilized enzymes from the class of oxidoreductases in technological processes: a review // Calalysis in Industry. 2019. Vol. 11. P. 251-263.

7. Veitch N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme // Phytochemistry. 2004. Vol. 65. P. 249–259.

Об авторах:

ТИХОНОВ Борис Борисович – доцент, кандидат химических наук, доцент кафедры Стандартизации, сертификации и управления качеством ФГБОУ ВО «Тверской государственной технической университет», tboris@yandex.ru

СТАДОЛЬНИКОВА Полина Юрьевна – аспирант ФГБОУ ВО «Тверской государственной технической университет», p.stadolnikova@mail.ru

СИДОРОВ Александр Иванович - профессор, кандидат химических наук, профессор кафедры Биотехнологии и химии ФГБОУ ВО «Тверской государственной технической университет», sidorov@science.tver.ru

МАТВЕЕВА Валентина Геннадьевна - профессор, доктор химических наук, профессор кафедры Биотехнологии и химии ФГБОУ ВО «Тверской государственной технической университет», valen-matveeva@yandex.ru

INVESTIGATION OF REGULARITY OF USING IMMOBILIZED PEROXIDASE FOR OXIDATION OF PHENOL AND ITS DERIVATIVES

B.B. Tikhonov, P.Yu. Stadol'nikova, A.I. Sidorov, V.G. Matveeva

Tver State Technical University

Summary. In the article the synthesis and investigation of activity and stability of biocatalysts based on horseradish peroxidase immobilized on various carriers - ion-exchange resin Amberlite IR-120, titanium dioxide and microspheres from sodium alginate were carried out. The effectiveness of synthesized biocatalysts in the oxidation reactions of phenol and 4-chlorophenol in concentrations up to 2 mmol/l has been proven. The main regularity allowing to maximize efficiency of horseradish peroxidase immobilization on the investigated carriers are revealed.

Keywords: horseradish peroxidase, phenol and its derivatives, immobilization