

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 577.15.08

DOI 10.26456/vtchem2022.2.1

СИНТЕЗ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЕРОКСИДАЗЫ КОРНЯ ХРЕНА

**О.В. Гребенникова, А.М. Сульман,
Е.И. Шиманская, А.Е. Филатова**

Тверской государственной технической университет, г. Тверь

В статье описываются несколько способов синтеза биокатализаторов на основе пероксидазы корня хрена (К.Ф. 1.11.1.7), иммобилизованной на различные носители (магнитные наночастицы Fe_3O_4 , SiO_2 , Al_2O_3 , сверхсшитый полистирол марки MN-100 и Sepabeads EC-NA). Полученные биокаталитические системы могут применяться для экологически безопасного синтеза полупродукта витамина E – 2,3,5-триметилгидрохинона с помощью окисления 2,3,6-триметилфенола пероксидом водорода. В работе использовался ковалентный метод иммобилизации ферментов. В качестве модифицирующего агента использовался хитозан, для активации ферментного носителя использовался глутаровый альдегид и 3-аминопропилтретоксисилан. Для всех биокатализаторов подобраны оптимальные условия окисления субстрата – температура и значение pH. Лучшие результаты по окислению 2,3,6-триметилфенола показал биокатализатор на основе пероксидазы, иммобилизованной на магнитные наночастицы Fe_3O_4 . Такая биокаталитическая система показала хорошие результаты в 5 повторных экспериментах.

Ключевые слова: магнитоотделяемые биокатализаторы, иммобилизация, пероксидаза, окисление 2,3,6-триметилфенола.

В последние годы, в процессах окисления фенольных соединений в качестве эффективных и экологически безопасных катализаторов используют ферменты класса оксидоредуктаз. Так, например, пероксидазу корня хрена (К.Ф. 1.11.1.7) можно использовать в процессах утилизации фенольных соединений водных ресурсов, обесцвечивании синтетических красителей, синтезе полимерных соединений, аналитической химии, целлюлозно-бумажной промышленности, в создании биосенсоров. При использовании ферментов особое значение имеет способ их иммобилизации на различные носители [1-2].

Все чаще, при иммобилизации в качестве ферментной подложки используют магнитные наночастицы. Преимущество использования таких носителей заключается в простоте отделения готового гетерогенного биокатализатора от реакционной смеси [3]. Существуют

различные способы синтеза магнитных наночастиц [4-5]. Чаще всего на практике используются следующие методы: метод соосаждения [6], метод микроэмульсий [7-8], полиольный метод [9-10], золь-гель метод [11], гидротермальный метод [12].

В данной работе представлен одностадийный способ получения 2,3,5-триметилгидрохинона (ТМГХ) путем окисления 2,3,6-триметилфенола (ТМФ) экологически безопасным окислителем – пероксидом водорода в присутствии иммобилизованной пероксидазы корня хрена (HRP). В работе были синтезированы несколько образцов биокатализаторов на основе пероксидазы с использованием различных носителей (магнитные наночастицы Fe_3O_4 , SiO_2 , Al_2O_3 , сверхсшитый полистирол марки MN-100 и Sepabeads EC-NA) и выбран оптимальный. Изучены условия окисления ТМФ в присутствии синтезированных биокатализаторов (pH, температура). Все образцы биокаталитических систем были исследованы в нескольких рециклах.

Материалы и методы

Материалы

Этиленгликоль (99,9 мас.%), хлорид железа (III) 6-водный (99 мас.%), янтарная кислота (99,9 мас.%), мочеви́на (99,8 мас.%), этанол (95 мас. %), 3-аминопропилтриэтоксисилан (>98 мас.%), SiO_2 (99,9 мас.%), Al_2O_3 (99,9 мас.%), сверхсшитый полистирол MACRONET MN-100 (99,9 мас. %, Великобритания), Sepabeads EC-NA (99,9 мас.%, Италия), хитозан (молекулярная масса *3,00000, степень деацетилирования *75–80%), гидроксид натрия (99,5 мас.%), соляная кислота (37 мас.%), раствор глутарового альдегида (25 мас.%), пероксидаза (Великобритания, RZ > 2,0, акт. > 150 ед/мг, деминерализованный, лиофильный порошок). Для испытания полученного биокатализатора использовали 2,3,6,-триметилфенол (95 мас. %), перекись водорода (50 мас. %).

Методика приготовления биокатализаторов на основе пероксидазы иммобилизованной на SiO_2 , Al_2O_3

Перед модификацией поверхности образцы SiO_2 и Al_2O_3 (1 г) в течение 3 ч прокаливали (300 °C). Затем носители 60 мин перемешивались с 10 мл раствора полистиролсульфоната натрия (PSS, 0.25 г/л), отфильтровывались, промывались и сушились под вакуумом. После образцы 60 мин обрабатывали уксусным раствором хитозана (50 мл, Chit, 0.15 г/л). Затем модифицированные образцы активировали с помощью глутарового альдегида (GA, 50 мл, 0.2 г/л). На заключительной стадии модифицированный и активированный носитель 60 мин обрабатывали раствором HRP (10 мл, 0.15 мг/мл). В результате были

получены образцы биокаталитических систем: $\text{SiO}_2/\text{PSS}/\text{Chit}/\text{GA}/\text{HRP}$ и $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{PSS}/\text{Chit}/\text{GA}/\text{HRP}$.

Методика приготовления биокатализаторов на основе пероксидазы иммобилизованной на полимерных носителях сверхсшитый полистирол марки MN-100 и Sepabeads EC-NA

Коммерческие носители сверхсшитый полистирол марки MN-100 (SPS) и Sepabeads EC-NA (Sep) массой 1 г перемешивали с 50 мл GA (0.2 г/л). Затем активированные носители перемешивали с 0.15 г HRP в 10 мл фосфатного буфера. Готовые образцы SPS/GA/HRP и Sep/GA/HRP отфильтровывали, промывали и высушивали под вакуумом при 25 °С.

Методика приготовления биокатализатора на основе пероксидазы иммобилизованной на Fe_3O_4

Магнитные наночастицы были синтезированы полиольным методом [13]. Наночастицы Fe_3O_4 обрабатывались раствором 3-аминопропилтриоксисилана (APTS, 2 мкл/мл). Раствор перемешивали на магнитной мешалке в течение 5 ч. Затем образец промывали дистиллированной водой и наносили на него HRP, концентрацией 0.15 мг/мл. Смесь перемешивали при температуре 4 °С в течение 6 часов. Полученный биокатализатор $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTS}/\text{HRP}$ отделяли с помощью неодимового магнита и хранили в фосфатном буфере.

Окисление 2,3,6-триметилфенола в присутствии синтезированных биокатализаторов

Окисление 2,3,6-триметилфенола проводили в стеклянном реакторе, снабженном магнитной мешалкой и терморубашкой, необходимой для поддержания нужного температурного режима. Значение pH поддерживалось с помощью фосфатного буфера. В начале эксперимента 0.1 г катализатора и 30 мл субстрата погружали в ячейку. В ходе реакции дискретно добавляли пероксид водорода в количестве, эквивалентном содержанию субстрата, для предотвращения субстратного ингибирования. Через определенные промежутки времени отбирались пробы для анализа. Анализ реакционной смеси осуществляли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (на установке Ultimate 3000).

Результаты и обсуждения

Температура является важным параметром ферментативной реакции, поскольку при увеличении температуры скорость реакции в присутствии фермента увеличивается в результате ускорения движения молекул, приводящего к повышению вероятности взаимодействия реагирующих веществ, доходя до определенного предела, а затем

постепенно снижается из-за инактивации фермента, происходящей вследствие тепловой денатурации белковой молекулы [1].

Для определения оптимальной температуры проведения процесса окисления ТМФ в присутствии синтезированных биокатализаторов была проведена реакция окисления ТМФ при температурах 30 °С, 40 °С, 45 °С, 50 °С. Результаты экспериментов приведены в таблице 1. Эксперименты проводились при первоначальном реакционном объеме 30 мл, концентрации биокатализатора 0.2 мг/мл, концентрации ТМФ 1.5 ммоль/л, рН 6.5, концентрации H₂O₂ 1.5 моль/л.

Таблица 1
Начальная скорость реакции окисления ТМФ при различных температурах

Т, °С	V ₀ , мкмоль/л·мин					
	HRP	Fe ₃ O ₄ /APTS/ HRP	SiO ₂ /PSS/Chit/GA/ HRP	Al ₂ O ₃ /PSS/Chit/ GA/HRP	SPS/GA/ HRP	Sep/G A/HRP
30	2,96	1,19	2,12	1,52	0,34	0,31
40	7,22	5,12	2,56	1,71	0,49	0,39
45	4,38	5,42	2,72	1,98	0,46	0,35
50	4,14	5,75	2,34	2,12	0,35	0,32

Из таблицы 1 видно, что самая высокая начальная скорость окисления ТМФ наблюдается при использовании нативной HRP. В присутствии иммобилизованных форм фермента скорость окисления субстрата снижается. Это связано с потерей пероксидазной активности в процессе иммобилизации. Так же, необходимо отметить, что в присутствии образцов SPS/GA/HRP и Sep/GA/HRP активность фермента не претерпевает сильных изменений. Вероятно, это связано со структурой полимерных систем и различной конфигурацией фермента на их поверхности.

Начальная скорость окисления ТМФ при использовании биокатализатора Fe₃O₄/APTS/HRP с увеличением температуры не снижается, а наоборот немного увеличивается. Это указывает на то, что фермент становится термостабильным. Вероятно, это происходит в результате прочного связывания белковой молекулы с носителем, вследствие чего нативная конформация фермента не претерпевает сильных изменений и денатурация белковой молекулы затрудняется. При температуре выше 40 °С происходит дезактивация фермента, поэтому оптимальной температурой для проведения процесса окисления ТМФ в присутствии биокатализатора на основе HRP иммобилизованной на Fe₃O₄ будет 40 °С. Поскольку, при более высокой температуре в процессе окисления ТМФ в большей степени участвуют наночастицы, а не фермент [14].

Для остальных образцов биокатализаторов оптимальная температура процесса окисления ТМФ так же 40 °С. Поэтому все дальнейшие эксперименты проводились при данной температуре.

Другим не маловажным параметром в реакциях с участием ферментов является значение рН, так как существует некоторое

оптимальное состояние ионизации фермента, которое обеспечивает эффективное связывание белковой молекулы и субстрата, улучшая тем самым катализ реакции.

Для оценки влияния pH на начальную скорость окисления ТМФ проводилась серия экспериментов в присутствии всех синтезированных биокатализаторов с различными значениями pH реакционной среды (таблица 2). Эксперименты проводились при первоначальном реакционном объеме 30 мл, концентрации биокатализатора 0.2 мг/мл, концентрации ТМФ 1.5 ммоль/л, температура 40 °С, концентрации H₂O₂ 1.5 моль/л.

Таблица 2

Начальная скорость реакции окисления ТМФ при различных значениях pH

pH	V ₀ , мкмоль/л·мин					
	HRP	Fe ₃ O ₄ /APTS/HRP	SiO ₂ /PSS/Chit/GA/HRP	Al ₂ O ₃ /PSS/Chit/GA/HRP	SPS/GA/HRP	Sep/GA/HRP
6.0	4,37	1,7	1,24	1,22	0,35	0,31
6.5	7,22	6,28	2,56	1,71	0,49	0,39
7.0	6,54	6,12	1,21	1,11	0,55	0,37
7.4	5,73	5,48	0,99	0,67	0,64	0,31

Кинетические параметры, приведенные в таблице 2, указывают, что оптимальное значение pH для нативной HRP, Fe₃O₄/APTS/HRP, SiO₂/PSS/Chit/GA/HRP и Al₂O₃/PSS/Chit/GA/HRP будет 6.5. В случае экспериментов в присутствии SPS/GA/HRP и Sep/GA/HRP оптимум pH смещается до 7.0. Так же, необходимо отметить, что биокатализаторы Fe₃O₄/APTS/HRP, SiO₂/PSS/Chit/GA/HRP и Al₂O₃/PSS/Chit/GA/HRP проявляют большую чувствительность к изменениям pH, чем SPS/GA/HRP и Sep/GA/HRP. Это можно объяснить лучшей иммобилизацией HRP на Fe₃O₄, SiO₂ и Al₂O₃ из-за большего количества аминогрупп на поверхности носителей, вследствие их предварительной модификации аминофункциональными агентами APTS и Chit. Среди всех образцов биокатализаторов наблюдалось некое оптимальное значение pH, при котором биокатализаторы проявляли максимальную активность. Это связано с тем, что ферменты очень чувствительны к изменению концентрации водородных ионов. Поскольку максимальная скорость ферментативной реакции будет достигаться при оптимальной степени ионизации, обусловленной соответствующим значением pH [1]. В присутствии Fe₃O₄/APTS/HRP наблюдалась наибольшая начальная скорость реакции окисления ТМФ (6,28 мкмоль/л·мин) по сравнению с нативной формой фермента (7,22 мкмоль/л·мин).

Изучение стабильности проводилось со всеми 5 синтезированными образцами – образцы (Рис. 1).

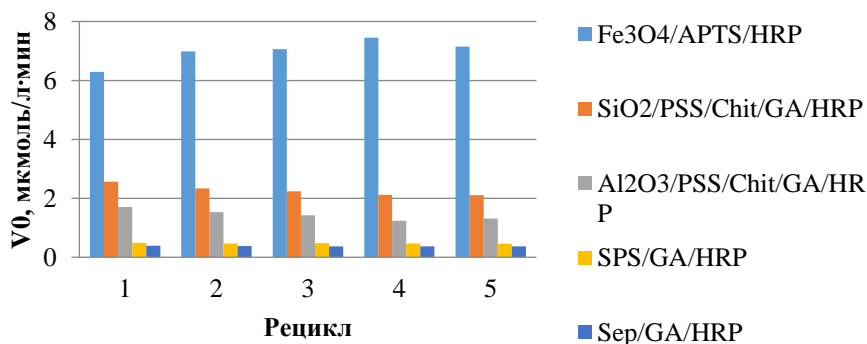


Рис. 1 – Оценка стабильности синтезированных биокатализаторов ($c_{\text{ТМР}}^0 = 1.5 \text{ ммоль/л}$, $c_0(\text{H}_2\text{O}_2) = 1.5 \text{ моль/л}$, 40°C , $c_{\text{кат}} = 0.2 \text{ г/л}$)

В результате стабилизации активных центров фермента иммобилизованная HRP становится наиболее выносливой. Кинетические кривые показывают, активность биокатализаторов SiO₂/PSS/Chit/GA/HRP и Al₂O₃/PSS/Chit/GA/HRP, снижается незначительно. Снижение активности может быть объяснено вымыванием фермента с поверхности носителя. Снижение активности на коммерческих носителях SPS/GA/HRP и Sep/GA/HRP практически не происходит, что может быть связано с устойчивостью ковалентной связи фермента с коммерческими носителями MN-100 и Sepabeads EC HA. В случае Fe₃O₄/APTS/HRP сначала происходит ускорение реакции, а через несколько рециклов начальная скорость реакции немного снижается. Данное явление может быть объяснено увеличением активных центров фермента, что приводит к увеличению активности биокатализатора.

Заключение

В работе описываются различные способы ковалентной иммобилизации HRP на различных носителях. Все синтезированные биокаталитические системы показали успешные результаты в процессе окисления ТМФ с помощью пероксида водорода. Среди всех биокатализаторов можно отметить образец Fe₃O₄/APTS/HRP, который показал лучшие результаты по сравнению с нативной формой фермента. Установлено, что HRP, иммобилизованная на магнитных наночастицах обладает повышенной термостабильностью по сравнению с нативной HRP. Многократное использование фермента может быть заметно улучшено путем иммобилизации его на магнитных наночастицах. К тому же данная система является магнитоотделяемой, что позволяет легко и быстро отделять ее от реакционной смеси. Предложенный способ получения ТМГХ может быть применен в экологически чистом получении витамина Е с помощью недорогого и экологически безопасного окислителя пероксида водорода.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ 22-24-20027.

Список литературы:

1. 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. V. 11, P. 251–263,
2. Matveeva O. V., Lakina N. V., Doluda V. Yu., Sulman E. M. Current trends of application of oxyreductases in industry. // [Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedeniy](#) Seriya "Khimiya I Khimicheskaya Tekhnologiya". 2013. V.56. N 11. P. 13 – 18
3. Mohamed S.A., Al-Harbi M.H., Almulaiky Y.Q., Ibrahim I.H., El-Shishtawy R.M. Immobilization of horseradish peroxidase on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles // *Electronic Journal of Biotechnology* 2017. V. 27. P. 84–90
4. Chen Z, Wu C, Zhang Z, Wu W, Wang X, Zhiqiang Y, Synthesis, functionalization, and nanomedical applications of functional magnetic nanoparticles // *Chinese Chemical Letters* 2018 <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2018.08.007> .
5. Majidi S., Sehrig F. Z., Farkhani S. M., Goloujeh M. S., Akbarzadeh A. Current methods for synthesis of magnetic nanoparticles // *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2016. V. 44:2, P. 722-734, DOI: 10.3109/21691401.2014.982802.
6. Palacio M., Villabrille P., Palermo V., Romanelli G. Titania-heteropolyacid composites (TiO₂-HPA) as catalyst for the green oxidation of trimethylphenol to 2,3,5-trimethyl-p-benzoquinone // *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. 2020. V. 95. P.321–331
7. Sanchez-Dominguez M., Aubery C., Solans C. New Trends on the Synthesis of Inorganic Nanoparticles Using Microemulsions as Confined Reaction Media. 2012. DOI: 10.5772/33010
8. Asgari S., Saberi A.H., McClements D.J., Lin M. Microemulsions as nanoreactors for synthesis of biopolymer nanoparticles // [Trends in Food Science & Technology](#). 2019. V. 86. P. 118-130.
9. Alves T.E.P., Kolodziej C., Burda C., Franco Jr A. Effect of particle shape and size on the morphology and optical properties of zinc oxide synthesized by the polyol method // [Materials & Design](#). 2018. V. 146. P. 125-133.
10. Reddy L.H., Arias J.L., Nicolas J.A. Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications // *Chem. Rev.* 2012. № 112. P. 5818-5878. doi: 10.1021/cr300068p
11. Saini M.K., Raza S.K. Synthesis and surface engineering of magnetic nanoparticles for environmental cleanup and pesticide residue analysis: A review // *J. Sep. Sci.* 2014. № 37. P. 1805-1825.
12. Elst L.V., Muller R.N. Synthesis and processing of magnetic nanoparticles // *Curr. Opin. Chem. Eng.* 2015. V. 8. P. 7-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coche.2015.01.003>
13. Grebennikova O., Sulman A., Matveeva V., Sulman E. Physical–chemical analysis and kinetics of the magnetic biocatalyst for 2,3,6,-trimethylphenol oxidation, // *Reac Kinet Mech Cat*, 2020. V. 130. P317 –329

14. Yu F., Huang Y., Cole A. J., Yang C. The artificial peroxidase activity of magnetic iron oxide nanoparticles and its application to glucose detection// *Biomaterials* 2009. V. 30. P. 4716 – 4722

Об авторах:

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

СУЛЬМАН Александрина Михайловна-кандидат химических наук, доцент кафедры Биотехнологии химии и стандартизации, ФГБОУ ВО Тверской государственный технический университет г. Тверь,, e-mail: alexsulman@mail.ru

ШИМАНСКАЯ Елена Игоревна - кандидат химических наук, доцент кафедры Биотехнологии химии и стандартизации, ФГБОУ ВО Тверской государственный технический университет г. Тверь,, e-mail: shimanskaya-tstu@yandex.ru

ФИЛАТОВА Анастасия Евгеньевна - кандидат химических наук, доцент кафедры Биотехнологии химии и стандартизации, ФГБОУ ВО Тверской государственный технический университет, г. Тверь, e-mail: afilatowa@mail.ru

SYNTHESIS OF BIOCATALYTIC SYSTEMS USING HORSERADISE ROOT PEROXIDASE

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

Tver State Technical University, Tver

The article describes several methods for the synthesis of biocatalysts based on horseradish root peroxidase (EC 1.11.1.7) immobilized on various supports (Fe₃O₄, SiO₂, Al₂O₃ magnetic nanoparticles, MN-100 hypercrosslinked polystyrene and Sepabeads EC-HA). The resulting biocatalytic systems can be used for the environmentally safe synthesis of vitamin E intermediate 2,3,5-trimethylhydroquinone via the oxidation of 2,3,6-trimethylphenol with hydrogen peroxide. We used the covalent method of enzyme immobilization. Chitosan was used as a modifying agent, and glutaraldehyde and 3-aminopropyltriethoxysilane were used to activate the enzyme carrier. For all biocatalysts, the optimal conditions for the oxidation of the substrate, i.e., temperature and pH value, were selected. The best results in the oxidation of 2,3,6-trimethylphenol were shown by a biocatalyst based on peroxidase

immobilized on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. This biocatalytic system showed good results in 5 repeated experiments.

Keywords: *magnetically detachable biocatalysts, immobilization, peroxidase, oxidation of 2,3,6-trimethylphenol.*