

ОКИСЛЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ МАГНИТНЫМ БИОКАТАЛИЗАТОРОМ

О.В. Гребенникова, А.М. Сульман, С.П. Михайлов,
Е.И. Шиманская, В.Г. Матвеева

ФГБОУ ВО «Тверской государственный технический университет», г. Тверь

В статье описывается синтез магнитного биокатализатора на основе иммобилизованной пероксидазы. Данный биокатализатор тестировался в реакции окисления 2,3,6-триметилфенола с помощью пероксида водорода до 2,3,5-триметилгидрохинона (полупродукта витамина Е). В работе выбран метод синтеза магнитных наночастиц. Подобраны оптимальные условия проведения процесса окисления 2,3,6-триметилфенола в присутствии магнитного биокатализатора (начальная концентрация субстрата, температура, рН).

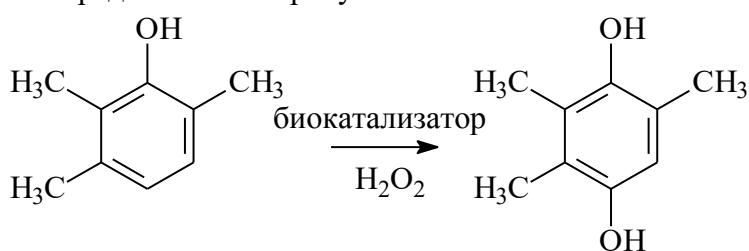
Ключевые слова: пероксидаза, иммобилизация, магнитные наночастицы, 2,3,6-триметилфенол, окисление.

В последние годы магнитные наночастицы все больше применение находят в химии, биомедицине, физике и т.д. Одним из перспективных применений является использование их в качестве носителей для иммобилизованных ферментов. Так например, фермент класса оксидоредуктаз *Horseshoe peroxidase* (HRP) был иммобилизован на магнит-модифицированный полианилин активированный глутаровым диальдегидом [8], на магнитные железотитановые пластинки [1], на магнитные наночастицы с использованием 3-аминопропилтриэтоксисилана (3- и глутарового диальдегида в качестве сшивающего агента [6], на магнитные наночастицы с использованием хитозана и полиэтиленмалеиновой кислоты [9], на магнитные поли(глицидилметакрилат-со-метилметакрилат)ные гранулы активированные с помощью глутарового диальдегида [10], на магнитные наночастицы методом адсорбции [11], на амин функциональные магнитные наночастицы, обработанные тетраэтилортосиликатом, (3-аминопропил)триэтоксисиланом и глутаровым диальдегидом [12].

В данной работе исследуется эффективный способ иммобилизации HRP на функционализированные магнитные наночастицы Fe₃O₄. Полученный биокатализатор использовался в реакции окисления 2,3,6-триметилфенола (ТМФ) до 2,3,5-триметилгидрохинона (ТМГХ), полупродукта витамина Е. Необходимо

отметить, что окисление данного субстрата является актуальной проблемой тонкого органического синтеза. В современных исследованиях по окислению 2,3,6-триметилфенола в присутствии катализаторов неорганической природы, таких как CuCo_2O_4 [13], мезоструктурированного титансиликатного катализатора [14], аморфных смешанных оксидов $\text{TiO}_2 - \text{SiO}_2$ (аэрогели) [15], $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [16-17] и др. отмечается ряд недостатков: таких как длительность реакции около 6-9 часов, вымывание активного металла, использование молекулярного кислорода, повышающее пожароопасность процесса, а также применение органических растворителей или ионных жидкостей.

Схема синтеза 2,3,5-триметилгидрохинона предлагаемого в данной работе представлена на рисунке 1.



2,3,6-триметилфенол 2,3,5-триметилгидрохинон
Рис. 1. Схема реакции процесса окисления 2,3,6-триметилфенола

В работе была выбрана оптимальная методика синтеза и функционализации магнитных наночастиц, а также проведена иммобилизация на них HRP. Подобраны оптимальные параметры окисления ТМФ в присутствии синтезированного биокатализатора, а именно начальная концентрация субстрата, температура и рН.

Материалы и методы

Для синтеза биокатализатора использовались этиленгликоль («Компонент-реактив», ч.д.а.), янтарная кислота («Марбиофарм», ч.д.а.), мочеви́на («Индикатор», ч.д.а.), этанол («Медхимпром», 95 %), 3-аминопропилтретоксисилан («SIGMA-ALDRICH», >98 %), пероксидаза (Великобритания, RZ > 2.0, акт. > 150 ед/мг, обессол., лиофил. порошок). Для тестирования полученного биокатализатора использовались 2,3,6-триметилфенол («SIGMA-ALDRICH», 95 %), пероксид водорода («Купавнареактив», 50 %). Для хроматографического анализа применялись 2,3,5-триметилгидрохинон («SIGMA-ALDRICH», 97 %), ацетонитрил («Panreac», E.U.).

Синтез магнитных наночастиц

Синтез магнитных наночастиц осуществлялся полиольным методом по известной методике [20]. В 30 мл этиленгликоля были

полностью растворены: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3 ммоль), янтарная кислота (1 ммоль) и мочеви́на (30 ммоль) при энергичном перемешивании магнитной мешалкой в течение 30 мин. Полученный раствор переносился в тефлоновый стакан (объемом 50 мл) автоклава из нержавеющей стали (Parr Instr.) и выдерживался при $200\text{ }^\circ\text{C}$ 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 $60\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 6 часов.

Обработка магнитных наночастиц APTS

Для модификации магнитных наночастиц 3-аминопропилтриэтоксисилан к их 25 мл коллоидного этанольного раствора приливали 150 мл этанола и 1 мл воды [22]. К полученной смеси добавляли APTS разной концентрации. Раствор перемешивали в течение 5 часов магнитной мешалкой. Затем раствор промывался 5 раз этанолом и 5 раз дистиллированной водой. Обработанные APTS наночастицы хранились для дальнейшего использования в воде.

Иммобилизация пероксидазы на магнитные наночастицы Fe_3O_4

HRP была ковалентно иммобилизована на предварительно модифицированные магнитные наночастицы Fe_3O_4 . Отмытые дистиллированной водой магнитные наночастицы $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTS}$ обрабатывались водным раствором HRP 0.15 мг/мл. Смесь перемешивали при температуре $4\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 6 часов. В результате такого способа иммобилизации был получен следующий биокатализатор: $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTS}/\text{HRP}$. Синтезированный катализатор тестировался в реакции окисления 2,3,6-триметилфенола с помощью пероксида водорода. Окисление 2,3,6-триметилфенола проводили в стеклянном реакторе, снабженном мешалкой и рубашкой для обогрева.

Результаты и обсуждения

Выбор оптимальной концентрации APTS

На рисунке 2 представлены кинетические кривые зависимости концентрации ТМГХ от времени для разных образцов биокатализаторов, отличающихся друг от друга разными концентрациями APTS (1 мкл/мл, 2 мкл/мл, 3 мкл/мл).

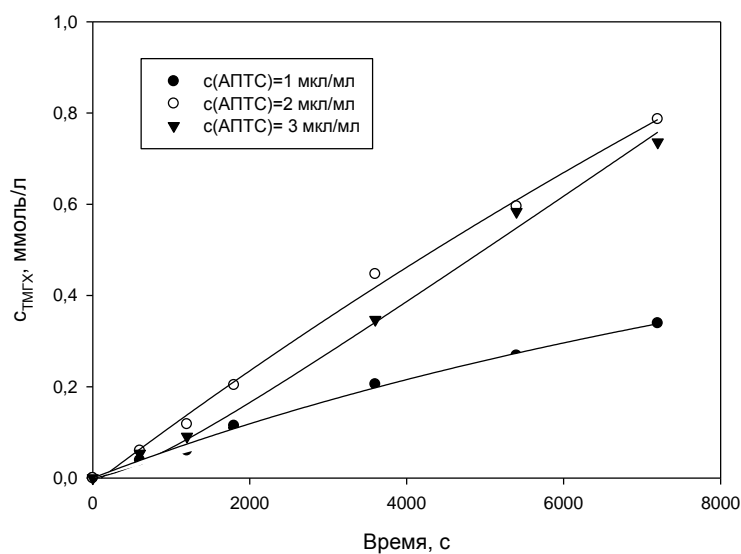


Рис. 2. Кинетические кривые зависимости выхода ТМГХ (ммоль/л) при модификации магнитных наночастиц Fe_3O_4 различной концентрации АПТС ($c_0^{ТМФ} = 1.5$ ммоль/л, $c_0(H_2O_2) = 1.5$ моль/л, $T = 40$ °С, $c_{кат} = 0.2$ г/л)

Рисунок 2 показывает, что максимальное насыщение поверхности магнитных наночастиц АПТС достигается при концентрации модифицирующего агента 2 мкл/мл. При больших концентрациях АПТС особых изменений в работе катализатора не наблюдается.

Тестирование полученного биокатализатора и подбор оптимальных условий проведения процесса окисления 2,3,6-триметилфенола

На рис. 3 представлены зависимости выхода продукта от начальной концентрации субстрата. Для изучения кинетики проводились эксперименты в присутствии нативной HRP и $Fe_3O_4/APTS/HRP$.

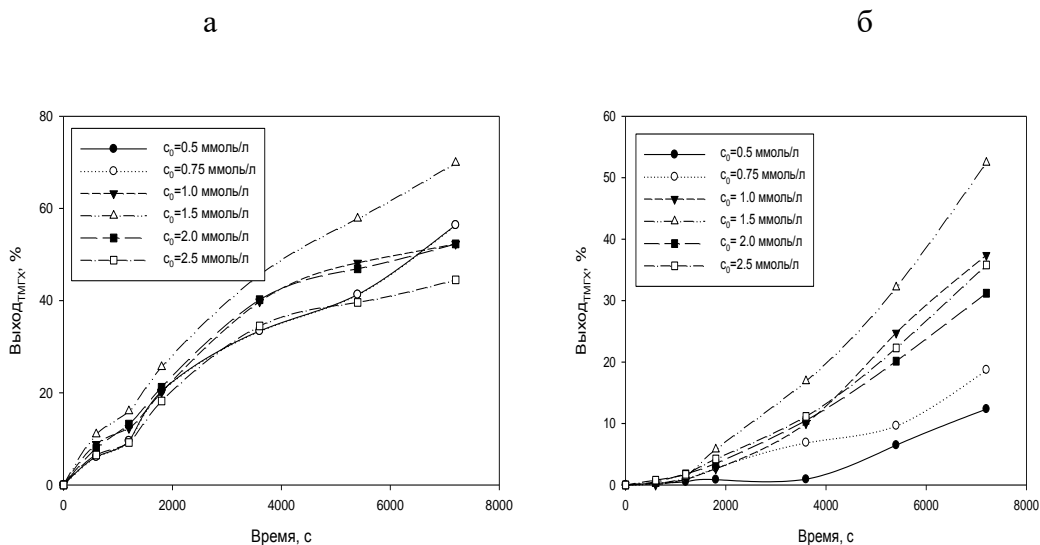


Рис. 3. Кинетические кривые зависимости выхода ТМГХ а) нативная HRP; б) Fe₃O₄/APTS/HRP

Из рис. 3 видно, что максимальный выход ТМГХ достигается при концентрации ТМФ 1.5 ммоль/л. Это может быть связано с тем, что ферментативная реакция способна ингибироваться при большей концентрации субстрата [26-29].

Подбор оптимальной температуры

При определении оптимальной температуры были проведены эксперименты по окислению ТМФ при 30 °С, 40 °С, 45 °С и 50 °С (Рис. 6).

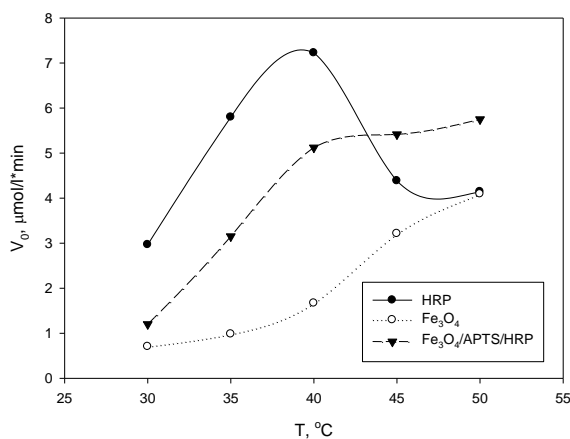


Рис. 4. Начальная скорость реакции окисления 2,3,6-триметилфенола при различных температурах ($c_0^{ТМФ} = 1.5$ ммоль/л, $c_0(H_2O_2) = 1.5$ моль/л, pH 6.5, $c_{kat} = 0.2$ г/л)

Из рисунка 4 видно, что активность нативной HRP снижается при увеличении температуры, в то время как активность HRP/APTS/Fe₃O₄ увеличивается. Это говорит о том, что иммобилизованный фермент приобрел термостабильность. Возможно это происходит вследствие прикрепления молекулы фермента к носителю, из-за чего нативная конформация HRP не претерпевает сильных изменений и денатурация белка затрудняется. Тем не менее, оптимальная температура проведения процесса была выбрана 40 °С. Так как выше этой температуры большее влияние на процесс окисления оказывают наночастицы Fe₃O₄, а не фермент.

На рис. 5 представлена зависимость начальной скорости реакции окисления ТМФ от различных значений рН.

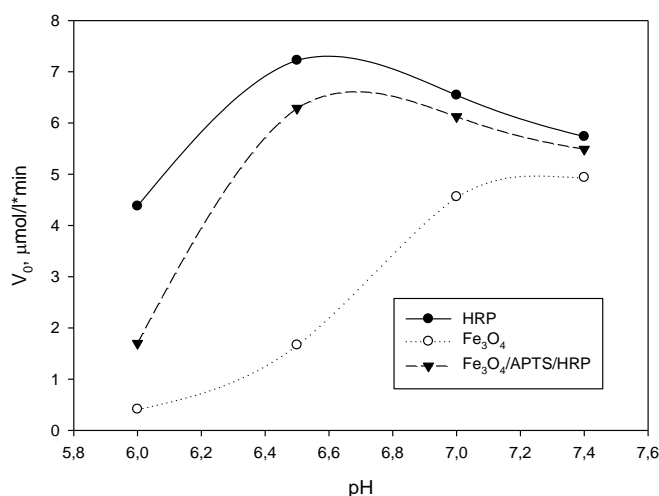


Рис. 5. Начальная скорость реакции окисления 2,3,6-триметилфенола при различных значениях рН ($c_0^{\text{ТМФ}} = 1.5$ ммоль/л, $c_0(\text{H}_2\text{O}_2) = 1.5$ моль/л, $T = 40$ °С, $c_{\text{кат}} = 0.2$ г/л)

Оптимальным значением рН для нативной HRP и HRP/APTS/Fe₃O₄ является 6,5, что говорит о том что иммобилизация фермента не оказывает действия на сдвиг оптимального значения рН. При использовании свободного Fe₃O₄ происходит увеличение значения рН.

Выводы

Магнитные наночастицы Fe₃O₄ могут успешно применяться для иммобилизации ферментов. Иммобилизация пероксидазы на Fe₃O₄ обеспечивает стабильную и эффективную работу фермента, а также его устойчивость к воздействию условий проведения процесса окисления. Таким образом, используя недорогие исходные материалы можно легко получать биокатализатор для окисления ТМФ. Одним из главных

преимуществ использования такого биокатализатора является простота его отделения от реакционной среды.

Исследование кинетических закономерностей выполнено при финансовой поддержке РФФ 19-79-00134. Синтез биокаталитических систем выполнен при финансовой поддержке РФФИ 18-38-00159.

Список литературы

1. Nobuaki Soh, Shunsuke Kaneko Kazuhiro Uozumi, Toshihisa Ueda, Kai Kamada // *J Mater Sci*. 2014. V. 49, P.8010–8015.
2. By Bi, Sai; Cui, Yangyang; Dong, Ying; Zhang, Ningbo // *Biosensors & Bioelectronics* 2014, V. 53, P. 207-213.
3. By Garcia, Josep; Zhang, Yue; Taylor, Hannah; Cespedes, Oscar; Webb, Michael E.; Zhou, Dejian // *Nanoscale* 2011, V. 3(9), P. 3721-3730.
4. Golami-Borujeni F, Faramarzi M.A, Nejatizadeh-Barandozi F, Mahvi A.H. // *Fresenius Environ Bull* 2013 V. 22, P. 739–744.
5. F. Xu, S. Salmon // *Eng. Life Sci*. 2008. No. 3. P. 331–337
6. Yi Zheng, Shulin Zhaob and Yi-Ming Liu // *Analyst*, 2011, V. 136, P. 2890–2892
7. Zhou Y, Zhou T, Zhou R, Hu Y // *Luminescence* 2014. V. 29, P. 338–343.
8. Eduardo Fernandes Barbosa, Fernando Javier Molina, FlavioMarques Lopes, Pedro Antonio Garc.1a-Ru.1z, Samantha Salomao Caramori, and K.atia Fl .avia Fernandes // *ScientificWorld Journal Volume* 2012, 5 pages.
9. Nadezhda Samoilova, Vladimir Tikhonov, Maria Krayukhina, Igor Yamskov // *J. APPL. POLYM. SCI*. 2014 P.39663 – 39663.
10. Bayramoglu G., Arica M. Y. // *Journal of Hazardous Materials*. 2008. № 156. P. 148-155.
11. Corgie S.C., Kahawong P., Duan X. et al. // *Adv.Funct. Mater*. 2012. № 22. P. 1940–1951.
12. Deepthi S.S., Prasadl E., Reddy B. V. S. et al. // *Green and Sustainable Chemistry*. 2014. № 4. P. 15-19.
13. Li Y., Liu W., Wu M., Yi Z., Zhang J. // *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 2007. 261. P. 73–78.
14. Trukhan N.N., Romannikov V.N., Paukshtis E.A, Shmakov A.N., Kholdeeva O.A. // *Journal of Catalysis*. 2001. № 202. P. 110 – 117.
15. Kholdeeva O.A., Ivanchikova I. D., Guidotti M., Ravasio N. // *Green Chemistry*. 2007. № 9. P. 731-733.
16. Türk H. // *Appl Catal A*. 2008. Vol. 340 P.52-58.
17. Sun H., Harms K., Sundermeyer J. // *J. Am. Chem. Soc*. 2004.V. 126. № 31, P. 9550-9551.
18. Laurent S., Forge D., Port M. et al. // *Chem. Rev*. 2008. № 108. P. 2064–2110.
19. Jadhav S.A., Bongiovanni R. Synthesis and organic functionalization approaches for magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles // *Adv. Mat. Lett*. 2012. № 3(5). P. 356-361.

20. Cheng C., Xuw F., Gu H. // NewJ. Chem. 2011. № 35. P. 1072–1079.
21. Baranov D. A., Gubin S.P. // Nanosystems. 2009. V. 1. №1-2. P. 129 – 147.
22. M. Ma, Y. Zhang, W. Yu, H. Shen, H. Zhang, N. Gu // Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. 2003. V. 212 (2-3) P. 219 -226.
23. Silverstein R.M., Webster F.X., Kiemle D.J., Bryce D.L. Spectrometric Identification of Organic Compounds – Wiley, 2014. 453 p.
24. NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database, Version 3.5 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, 2003) [Электронный ресурс] / Электрон. дан. – [Б.м. 2003]. – Режим доступа: <http://srdata.nist.gov/xps>.
25. Shaofeng Zhang, Wei Wu, Xiangheng Xiao, Juan Zhou, Feng Ren, Changzhong Jiang // Nanoscale Research Letters 2011, V. 6:89. DOI: [10.1186/1556-276X-6-89](https://doi.org/10.1186/1556-276X-6-89).
26. Sylvia O. Malomo, Raphael I. Adeoye, Lateef Babatunde, Ibraheem A. Saheed, Martin O. Iniaghe, and Femi J. Olorunniyi // Biokemistri, V. 23, No. 3, Dec, 2011, P. 124-128.
27. Ran Xu,*Jianmei Yuan, Yifang Si, Fengting Li and Bingru Zhang // RSC Advances. 2016. V. 6(5) P. 3927-3933.
28. Lee J., Saha B., Vlachos D. G. , // Green Chemistry. 2016. V. 18 (13), P. 3815-3822.
29. Parimal P., Ramesh K., Subhamay B., // Chemical Engineering, and Processing - 2016, V. 104, P. 160-171.

Об авторах:

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

Сульман Александрина Михайловна – аспирант кафедры Биотехнологии, химии и стандартизации, ФГБОУ ВО Тверской государственный технический университет, e-mail: alexsulman@mail.ru.

Михайлов Степан Петрович – аспирант регионального технологического центра, ФГБОУ ВО Тверской государственный университет, e-mail: stefan.oblivion@mail.ru.

Шиманская Елена Игоревна к.х.н., доцент кафедры Биотехнологии химии и стандартизации, ФГБОУ ВО Тверской государственный технический университет, e-mail: sulman@online.tver.ru.

Матвеева Валентина Геннадьевна – д.х.н., профессор кафедры Биотехнологии химии и стандартизации, ФГБОУ ВО Тверской государственный технический университет, e-mail: valen-matveeva@yandex.ru.

OXIDATION OF ORGANIC COMPOUNDS BY MAGNETIC BIOCATALYST

**O.V. Grebennikova, A.M. Sulman, S.P. Mikhailov, E.I. Shimansky,
V.G. Matveeva**

Tver State Technical University, Tver

The article describes the synthesis of a magnetic biocatalyst based on immobilized peroxidase. This biocatalyst was tested in the oxidation reaction of 2,3,6-trimethylphenol with hydrogen peroxide to 2,3,5-trimethylhydroquinone (an intermediate of vitamin E). In the work, the method of synthesis of magnetic nanoparticles is selected. The optimal conditions for the process of oxidation of 2,3,6-trimethylphenol in the presence of a magnetic bio-catalyst are selected (initial substrate concentration, temperature, pH).

Keywords: *peroxidase, immobilization, magnetic nanoparticles, 2,3,6-trimethylphenol, oxidation.*