

УДК 577.152.1

**ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ОКСИДОРЕДУКТАЗ В ПРОЦЕССАХ
ОБЕЗВРЕЖИВАНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ****Б.Б. Тихонов, П.Ю. Стадольникова, А.И. Сидоров, М.Г. Сульман***Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия*

Ферменты, благодаря своему сложному строению и механизмам действия, обладают уникальными свойствами, отличающими их от традиционных катализаторов. Среди ферментов особое место занимают оксидоредуктазы (К.Ф. – 1), такие как пероксидаза (К.Ф. – 1.11.1.7), тирозиназа (К.Ф. – 1.14.18.1), глюкозооксидаза (К.Ф. 1.1.3.4) и лакказы (1.10.3.2), отличительной особенностью которых является высокая активность, специфичность и стабильность в катализируемых реакциях, а также относительная легкость извлечения из природных источников [1]. Они широко используются в процессах очистки сточных вод от органических загрязнителей и других технологических процессах, успешно заменяя классические каталитические системы [2]. Несмотря на многочисленные достоинства, использование свободных форм оксидоредуктаз в промышленных процессах нецелесообразно, прежде всего, из-за невозможности многократного использования биокатализатора, высокой стоимости очищенных препаратов ферментов и их низкой устойчивости к ингибирующим факторам [3]. Более технологично, экономически и экологически обосновано использование ферментов, иммобилизованных на поверхности нерастворимой твердой фазы, что, во-первых, значительно упрощает отделение биокатализатора от реакционной среды, во-вторых, позволяет четко регулировать параметры катализируемой реакции, в-третьих, стабилизировать сами ферменты с сохранением их активности и субстратной специфичности [4]. Целью данной работы был анализ основных особенностей и закономерностей применения оксидоредуктаз для обезвреживания органических загрязнителей.

Оксидоредуктазы (К.Ф. – 1) – класс ферментов, катализирующих реакции, лежащие в основе биологического окисления, сопровождающиеся переносом электронов с одной молекулы (восстановителя – акцептора протонов или донора электронов) на другую (окислитель – донор протонов или акцептор электронов). Реакции, катализируемые оксидоредуктазами, в общем виде выглядят следующим образом: $A^- + B \rightarrow A + B^-$, где A^- – восстановитель (донор электронов), а B^- – окислитель (акцептор электронов) [5]. Наиболее важными представителями этого класса ферментов, использующимися в процессах обезвреживания органических загрязнителей, являются пероксидаза, тирозиназа и лакказа. Пероксидаза (К.Ф. – 1.11.1.7) – гликопротеин с молекулярным весом около 40 кДа, содержащий феррипорфирин IX в качестве простетической группы гема, катализирующий окисление ароматических доноров перекисью водорода [6]. Тирозиназа (К.Ф. – 1.14.18.1) – медьсодержащий фермент (около 0,2 % меди), который катализирует окисление тирозина и других органических соединений кислородом и широко распространен в бактериях, фруктах, морепродуктах и животных [7]. Лакказы (1.10.3.2) – неспецифичный медьсодержащий гликопротеид, содержит в составе 10–45 % полисахаридов и чаще всего 4 атома меди на одну молекулу, окисляющий органические субстраты с помощью молекулярного кислорода [8].

Пероксидаза хрена широко применяется для окисления и удаления органических компонентов из водных ресурсов, в том числе – с получением полезных целевых продуктов. При этом наиболее распространенными носителями для иммобилизации пероксидазы являются магнитные частицы или модифицированные различными способами биополимеры (хитозан и альгинаты) [9]. В работе Quintanilla и др. пероксидаза из корней репы была модифицирована метоксиполиэтиленгликолем и иммобилизована на альгинатных микросферах, при этом и проверена активность в окислительной полимеризации раствора фенола, при этом за 17 циклов окисления раствора фенола (10 мМ) было утилизировано более 65 % фенола [10]. Karim и др. иммобилизовали пероксидазу хрена на матрице β -циклодекстрин-хитозан для окисления азокрасителей из текстильных стоков [11]. Janovic и др. исследовали эффективность в процессах удаления красителей (антрахинон, трифенилметан, акридин и т. д.) биокатализаторы на основе иммобилизованной пероксидазы хрена, полученные ковалентной иммобилизацией на альгинате и хитозане, адсорбцией и ковалентной сшивкой на неорганических носителях (оксид алюминия), инкапсулированием в альгинат-кальциевые микросферы с помощью полиэтиленгликоля, при этом наиболее эффективными оказались системы «хитозан-пероксидаза» и «альгинат-пероксидаза», полученные ковалентной сшивкой, сохранявшие 78 и 67 % начальной активности после 7 циклов работы, соответственно [12].

В статье Ху и др. разработан метод иммобилизации тирозиназы грибов для ферментативной обработки фенольных сточных вод – получение поперечно сшитых агрегатов фермента (CLEA), в присутствии которых фенол, п-крезол, п-хлорфенол и бисфенол А в концентрациях до 2,5 мМ, могут быть эффективно утилизированы с полной конверсией в течение 0,5–3 ч, при этом активность фермента схожа с активностью свободного фермента, а при многократном использовании CLEA сохраняют около 80 % начальной активности к десятому циклу [13]. Liu и др. иммобилизовали лакказы на мезопористом магнитном композите для удаления фенола и п-хлорфенола из воды [14]. Jia и др. удаляли 2,4 – дихлорфенол комбинированным фотокаталитическим методом с иммобилизацией лакказы на TiO_2 и стекле с достижением 78 %-ной конверсии [15]. В последние годы широко используется обесцвечивание промышленных красителей лакказами, иммобилизованными на таких носителях, как керамические материалы, монтморрилонит, модифицированный SiO_2 , альгинатные и другие гели, при этом чаще всего обесцвечивающий эффект достигается за счет совмещения ферментативного катализа и адсорбции красителя носителем [16, 17].

Коллективом Тверского государственного технического университета были синтезированы биокатализаторы, на основе иммобилизованной пероксидазы хрена на модифицированных хитозаном, глутаровымдиальдегидом и карбодимидом ионообменных смолах [18], модифицированном соляной кислотой, 3-аминопропилтриэтоксисиланом, хитозаном и глутаровымдиальдегидом TiO_2 [19], сохраняющие до 75 % активности при 10-кратном использовании в процессах очистки воды от фенольных загрязнений. Иммобилизованная на Al_2O_3 и SiO_2 , обработанных полистиролсульфокислотой, хитозаном и глутаровымдиальдегидом и на магнитных наночастицах Fe_3O_4 пероксидаза хрена сохранила до 65 % исходной активности после 10 циклов использования в процессе синтеза полупродуктов витамина Е из 2,3,6 – триметилфенола [20, 21]. Кроме того, исследована иммобилизация тирозиназы на модифицированных хитозаном, глутаровымдиальдегидом и карбодимидом ионообменных смолах ионообменных смолах [22]. Биокатализатор обеспечивает более 95 % конверсии пирокатехина в хиноны с потерей не более 30 % активности в 10 циклах использования. Также был разработан эффективный биокатализатор окисления органических соединений на основе иммобилизованной на микросферах из альгината натрия пероксидазы хрена [23]. Для синтеза микросфер могут быть использованы как капельный метод, так и метод внутреннего гелеобразования.

Таким образом, очевидно, что ферменты класса оксидоредуктаз (прежде всего – пероксидаза, тирозиназа, лакказа) могут быть эффективно использованы в процессах обезвреживания органических загрязнителей. При выполнении лабораторных исследований нами были выявлены основные особенности и закономерности данного процесса:

1) Ферментативная обработка загрязненных органическими загрязнителями сточных вод должна использоваться в качестве одного из завершающих этапов очистки, которому должно предшествовать удаление механических примесей и каталитическая обработка сточных вод металлическими катализаторами для получения концентрации загрязнителей в воде не более 20 ммоль/л. При невыполнении этого условия возможно необратимое ингибирование синтезированных биокатализаторов на основе оксидоредуктаз высокими концентрациями субстратов и продуктов реакции, а также повреждение нативной конформации ферментов и их активных центров, что существенно снижает эффективность их использования.

2) Для достижения максимальной эффективности работы ферментативных систем на основе оксидоредуктаз в процессах обезвреживания органических загрязнителей целесообразно использовать иммобилизованные препараты ферментов, причем иммобилизация должна быть ковалентной, с использованием модификаций ферментов и носителей функциональными группами с высокой реакционной способностью, прежде всего – $COOH$ и $-NH_2$, что, во-первых, увеличивает прочность закрепления фермента на носителе, во-вторых, снижает вероятность попадания фермента в очищенную воду.

3) При использовании в качестве активных компонентов ферментативных систем пероксидазы и тирозиназы продуктами реакции являются хиноновые радикалы, которые далее спонтанно олигомеризуются в реакционной смеси с образованием нерастворимых или слаборастворимых в воде компонентов, которые могут быть отделены от реакционной смеси механическими методами (например, фильтрованием).

Кроме того, продукты реакции могут в значительном количестве адсорбироваться на поверхности и в порах пористых носителей. Таким образом, данные биокатализаторы совмещают в себе 2 функции – каталитическую и адсорбционную, что позволяет существенно повысить эффективность утилизации токсичных загрязнителей водных ресурсов.

4) Благодаря легкости извлечения пероксидазы и тирозиназы из природных источников, а также высокой активности и устойчивости к ингибирующим воздействиям получаемых ферментативных экстрактов, на основе них могут быть созданы достаточно дешевые и доступные биокатализаторы, синтез которых не требует использования дорогостоящих стадий и реагентов. Все стадии синтеза биокатализаторов проводятся 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.

5) Целесообразно применение в процессах очистки воды от органических загрязнителей экологически безопасных и биodeградируемых материалов и реагентов. В частности, для этой цели в качестве носителей могут использоваться биополимеры (хитозан, альгинаты, целлюлоза, пектины) или природные материалы (глины, органические отходы), в качестве сшивающих реагентов и модификаторов поверхности носителей – такие реагенты как карбодиимиды, N-гидроксисукцинимид, глутатион, цистеин и т. д.

6) Диапазон температур, который является оптимальным для проведения процесса утилизации токсичных органических соединений в лабораторных условиях, обусловлен прежде всего свойствами ферментов класса оксидоредуктаз (пероксидазы хрена, тирозиназы, лакказы). Вследствие белковой природы ферментов, наибольшую активность они проявляют 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 (на ионообменных смолах, диоксиде титана, биополимерах) препаратов оксидоредуктаз, 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.

7) Диапазон pH, который является оптимальным для проведения процесса утилизации токсичных органических соединений в лабораторных условиях, также обусловлен свойствами оксидоредуктаз. В каталитической активности данного класса ферментов 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. Иммобилизация вызывает некоторое смещение «колоколообразной» зависимости активности фермента от pH. Как показали эксперименты, пероксидаза хрена, тирозиназа и лакказа как в растворимой, так и в иммобилизованной формах имеют оптимум pH 6,0–7,0. Кроме того, выявлено, что диапазон pH, в которых синтезированные иммобилизованные препараты оксидоредуктаз проявляют свою активность, на 15–20 % расширился, по сравнению с растворимыми формами ферментов, что также связано со стабилизацией структуры фермента и его активного центра на твердых носителях.

8) Так как процесс, протекающий при катализе иммобилизованными ферментами, является гетерогенным, то существенное влияние на скорость процесса оказывает массоперенос. Диффузия субстратов и продуктов реакции в процессе может быть сильно затруднена. Для избавления от внешнедиффузионного торможения целесообразно использовать увеличение интенсивности перемешивания, что приводит к уменьшению неперемешиваемого 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.

Заключение. В статье проведен анализ успешного опыта использования иммобилизованных ферментов класса оксидоредуктаз (пероксидазы, тирозиназы, лакказы) в процессах очистки воды от токсичных органических загрязнителей и выявлены основные особенности и закономерности, которые необходимо учитывать при реализации данных процессов в промышленных масштабах для достижения максимальной эффективности очистки. В целом не вызывает сомнений, что ферменты класса оксидоредуктаз могут быть эффективно использованы в процессах обезвреживания органических загрязнителей, что подтверждается множеством публикаций в ведущих международных рецензируемых научных изданиях. Так как на ферментативные процессы влияет целый ряд факторов, то при разработке процессов должны быть выявлены наиболее значимые из них и оценено их влияние на стабильность достижения запланированных показателей эффективности процессов.

Литература

- Martínez A.T., Ruiz-Dueñas F.J., Camarero S., Serrano A., Linde D., Lund H., Vind J., Tovborg M., Herold-Majumdar O.M., Hofrichter M., Liersch, Ullrich R., Scheibner K., Sanna G., Piscitelli A., Pezzella C., Sener M.E., Kılıç S., Alcalde M. Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations // *Biotechnology Advances*. 2017. Vol. 35, Iss. 6, pp. 815–831.
- Guzik U., Hupert-Kocurek K., Wojcieszynska D. Immobilization as a strategy for improving enzyme properties – Application to oxidoreductases // *Molecules*. 2014. Vol. 19. pp. 8995–9018.
- Schmidt A., Dordick J.S., Hauer B., Kiener A., Wubbolts M., Witholt B. Industrial biocatalysis today and tomorrow // *Nature*. 2001. Vol. 409. pp. 258–268.
- Hanefeld U., Gardossi L., Magner E. Understanding Enzyme Immobilisation // *Chem. Soc. Rev.* 2009. Vol. 38. pp. 453–468.
- Price N.C. *Fundamentals of enzymology: the cell and molecular biology of catalytic proteins*. – 3rd ed. – Oxford: Oxford University Press, 1999. – 478 p.
- Veitch N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme // *Phytochem.* 2004. Vol. 65. pp. 249–259.
- Solano O., Solano F. New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins // *Pigm. Cell Melanoma Res.* 2009. Vol. 27. P. 750–760.
- Durán N., Rosa M.A., D’Annibale A., Gianfreda L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review // *Enzyme and Microbial Technology*. 2002. Vol. 31. P. 907–931.
- Тихонов Б.Б., Сульман Э.М., Стадольникова П.Ю., Сульман А.М., Голикова Е.П., Сидоров А.И., Матвеева В.Г. Иммобилизованные ферменты класса оксидоредуктаз в технологических процессах: обзор // *Катализ в промышленности*. 2019. № 19(1). стр. 59–72.
- Quintanilla-Guerrero F., Duarte-Vazquez M.A., Tinoco R., Gomez-Suarez M., Garcia-Almendarez B.E., Vazquez-Duhalt R., Regalado C. Chemical Modification of Turnip Peroxidase with Methoxypolyethylene Glycol Enhances Activity and Stability for Phenol Removal Using the Immobilized Enzyme // *J. Agric. Food Chem.* 2008. Vol. 56. P. 8058–8065.
- Karim Z., et al. β -cyclodextrin-chitosan complex as the immobilization matrix for horseradish peroxidase and its application for the removal of azo dyes from textile effluent // *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2012. Vol. 72. P. 10–17.
- Janović B.S., Micić Vičovac M.L., Vujčić Z.M., Vujčić M.T. Tailor-made biocatalysts based on scarcely studied acid horseradish peroxidase for biodegradation of reactive dyes // *Environmental Science and Pollution Research*. 2017. Vol. 24. Iss. 4, pp. 3923–3933.
- Xu D. – Y., Yang Z. Cross-linked tyrosinase aggregates for elimination of phenolic compounds from wastewater // *Chemosphere*. 2013. Vol. 92. P. 391–398.
- Liu Y., Zeng Z., Zeng G.; Tang L., Pang Y., Li Z., Liu C., Lei X., Wu M., Ren P. Immobilization of laccase on magnetic bimodal mesoporous carbon and the application in the removal of phenolic compounds // *Bioresour. Technol.* 2012, Vol. 115. P. 21–26.
- Jia J., Zhang S., Wang P., Wang H. Degradation of high concentration 2,4-dichlorophenol by simultaneous photocatalytic-enzymatic process using TiO_2/UV and laccase // *Journal of Hazardous Materials* 205 – 206 (2012) 150–155.
- Jořenek M., Zajoncová L. Immobilization of Laccase on Magnetic Carriers and Its Use in Decolorization of Dyes // *Chem. Biochem. Eng. Q.* 2015. Vol. 29 (3). P. 457–466.
- Chao C., Guan H., Zhang J., Liu Y., Zhao Y., Zhang B. Immobilization of laccase onto porous polyvinyl alcohol/halloysite hybrid beads for dye removal // *Water Sci. Technol.* 2018. Vol. 77(3). P. 809–818.
- Тихонов Б.Б., Сидоров А.И., Сульман Э.М. Биокатализатор для очистки сточных вод от фенолов на основе иммобилизованной пероксидазы хрена // *Катализ в промышленности*. 2007. № 3. С. 48–50.
- Тихонов Б.Б., Стадольникова П.Ю., Сидоров А.И., Сульман Э.М. Физико-химические исследования биокатализатора на основе иммобилизованной на модифицированном диоксиде титана пероксидазы хрена // *Бюллетень науки и практики*. 2017. № 12 (25). С. 98–104.
- Матвеева О.В., Лакина Н.В., Долуда В.Ю., Шкилева И.П., Матвеева В.Г., Сульман Э.М. Влияние способа иммобилизации пероксидазы на активность биокатализатора в процессе окисления триметилфенола // *Катализ в промышленности*. 2015. № 1. С. 70–78ю
- Matveeva O., et al. Biocatalytic Oxidation of 2,3,6-Trimethylphenol Over Immobilized Horseradish Peroxidase in Nonaqueous Media // *Topics in Catalysis*, 2011, Vol. 54, pp. 1309–1317.
- Сидоров А.И., Тихонов Б.Б., Стадольникова П.Ю., Сульман Э.М. Перспективы использования оксидоредуктаз для обезвреживания фенольных загрязнений // *Актуальная биотехнология*. 2017. № 2 (21). С. 104–108.
- Тихонов, Б.Б., Матвеева, В.Г., Стадольникова, П.Ю., Сидоров, А.И. «Утилизация фенола и его производных с использованием иммобилизованной на природных полимерах пероксидазы хрена», *Химическая безопасность*, 2019, № 3(2), с. 194–203.