

## ОКИСНЕННЯ ФЕНОЛУ КОВАЛЕНТНО ІММОБІЛІЗОВАНОЮ ПЕРОКСИДАЗОЮ ХРОНУ

І. І. Романовська<sup>1</sup>

О. В. Осійчук<sup>3</sup>

С. С. Декіна<sup>1</sup>

Ю. А. Шестеренко<sup>1</sup>

О. В. Севастьянов<sup>1</sup>

Т. Ю. Громовий<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України, Одеса

<sup>2</sup>Інститут хімії поверхні ім. О. О. Чуйка НАН України, Київ

<sup>3</sup>Одеський національний медичний університет

E-mail: romairina@gmail.com

Отримано 26.07.2011

За модифікованим методом Баха виділено частково очищений препарат пероксидази хрону ( $RZ = 1,0$ ; активність 100 Од/мг протеїну). Молекулярну масу виділеної пероксидази хрону (42 972 Да) підтверджено методом мас-спектрометрії — матрично активованої лазерної десорбції/іонізації. Одержаний препарат був ковалентно іммобілізований шляхом періодатного окиснення полісахаридної мембрани «Діацел» з наступним відновленням боргідридом натрію у масовому відношенні ензим:носії 0,2:1. Отримано біокатализатор з кількісним зв'язуванням протеїну, зі збереженням 88% активності (масове відношення ензим:носії 0,2:1), розширеними значеннями рН- і термооптимумів активності, збільшеною термостабільністю, стійкістю під час зберігання (8 міс). Кінетичні дослідження показали збільшення значень  $K_m$  за пероксидом водню і пірогалолом, зменшення значень  $V_{max}$  реакції, яка каталізується іммобілізованою пероксидазою хрону. Розроблений біокатализатор у реакторі періодичної дії сприяв кількісному окисненню фенолу (1 мМ) упродовж 7 циклів використання та високому рівню його біоконверсії (95–50%) у наступні 15 циклів. Методом лазерної десорбції/іонізації вперше визначено молекулярну масу (близько 2 021 Да) нерозчинного у воді і більшості органічних розчинників полімерного продукту пероксидазного окиснення фенолу — поліоксифенілену (розмір частинок 15–75 мкм), що складається з 21 залишку.

**Ключові слова:** пероксидаза хрону, мембрана «Діацел», ковалентна іммобілізація, окиснення фенолу, поліоксифенілен.

Проблема очищення стічних вод від фенолу, одного з найпоширеніших поллютантів, що надходять у поверхневі води зі стоками підприємств нафтопереробної, лісохімічної, сланцепереробної, коксохімічної, анілінофарбової, фармацевтичної промисловості, є надзвичайно важливою і важко вирішуваною. Різноманіття систем очищення за хімічним складом, умовами утворення й існування, використання дефіцитних і дорогих реагентів призводять до істотних економічних і ресурсних затрат, тому пошук нових ефективних методів очищення стічних вод від фенолів залишається актуальним. На особливу увагу заслуговує використання ензиматичних методів із застосуванням окиснювально-відновлювальних ензимів, у тому числі пероксидази хрону (ПОХ) (КФ 1.11.1.7), завдяки утворенню нерозчинних продуктів окиснення, що легко відокремлю-

ються, можливістю функціонування ензиму в широких інтервалах рН, температури і концентрації фенольних субстратів [1, 2]. Проте недоліком методу є висока вартість комерційної ПОХ і одноразовість використання ензиму.

З огляду на це важливим є закріплення ПОХ на носіях, пошук яких триває. При цьому слід враховувати можливість одержання біокатализаторів з новими функціональними властивостями, багаторазового використання та підвищену стабільність під час зберігання.

Відомі методи іммобілізації пероксидази на носіях природного і синтетичного походження (адсорбція, включення в гелі, ковалентне зв'язування та ін.) [3–7] часто не дозволяють одержувати високоактивні, стабільні, з можливістю багаторазового використання препарати ензимів, нерідко є багатостадійними

і високовартісними у зв'язку з використанням комерційних препаратів ензиму. Перспективним носієм для іммобілізації ПОХ є гідратцелюозна мембрана «Діацелл», яка характеризується відсутністю токсичності, можливістю модифікації, має механічну міцність у водних середовищах, стійкість до різних значень рН.

Метою дослідження було розроблення способу окиснення фенолу з водних розчинів за допомогою виділеної ПОХ, ковалентно іммобілізованої на гідратцелюозній мембрані «Діацелл».

Завдання дослідження: отримання частково очищеного препарату ПОХ, ковалентна іммобілізація препарату на полісахаридній мембрані з детальним вивченням фізико-хімічних характеристик зразків, розроблення способу окиснення фенолу та дослідження продуктів його біоконверсії.

### Матеріали і методи

Пероксидазу виділяли з коренів хрону за модифікованим методом Баха [8]. В отриманому ензимному препараті визначали спектральний показник чистоти ( $RZ = A_{403}/A_{278}$ ) та активність за пірогалолом [2].

Концентрацію пероксидази і пероксиду водню вираховували спектрофотометрично, використовуючи молярні коефіцієнти поглинання  $\epsilon = 102\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  при 403 нм і  $\epsilon = 72,4\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  при 230 нм, відповідно.

За одиницю пероксидазної активності приймали кількість ензиму, що каталізував утворення 1 мг пурпурогаліну з пірогалолу за 1 хв при рН 7,0 і 20 °С.

Як носій використовували гідратцелюозну мембрану «Діацелл» з розміром пор 0,04 мкм виробництва ВАТ «Гемопласт» (Україна). В основу іммобілізації пероксидази на гідратцелюозній мембрані покладено метод [9]: у ємність, що містила 200 см<sup>3</sup> 0,25 М періодату натрію, вносили 2 г гідратцелюозної мембрани і перемішували за кімнатної температури впродовж 2 год, після чого мембрану відокремлювали, промивали 500 см<sup>3</sup> дистильованої води та інкубували в 200 см<sup>3</sup> 0,016 М Na-фосфатного буферного розчину (рН 7,0), що містив пероксидазу заданої активності. Після 20 год інкубації у колбу вносили 0,2 г боргідриду натрію і залишали на 12 год при 4 °С. Гідратцелюозну мембрану з іммобілізованою на ній пероксидазою промивали дистильованою водою, висушували до постійної маси і зберігали при 4 °С.

Ступінь зв'язування пероксидази з носієм оцінювали за різницею вмісту протеїну у вільному та іммобілізованому ензимі, зас-

тосовуючи метод Лоурі в модифікації Хартрі [10]. Кількість вільних альдегідних груп носія визначали згідно з [9].

У діапазоні значень рН 3,0–12,0 з використанням відповідних буферних розчинів встановлювали рН-оптимум активності іммобілізованої пероксидази; термооптимум — в інтервалі температур 10–70 °С при рН 7,0 і концентраціях пірогалолу та пероксиду водню 1,0 мМ.

Кінетику окиснення пірогалолу (0,075–2,4 мМ) вільною та іммобілізованою ПОХ (0,003 мМ) у присутності пероксиду водню (0,01–0,3 мМ) при 20 °С у середовищі 0,016 М Na-фосфатного буферного розчину (рН 7,0) визначали за початковою швидкістю окиснення субстратів (фенольна сполука, пероксид водню) [11, 12].

Ступінь окиснення фенолу контролювали за його залишковою кількістю після проведення реакції 4-аміноантипіриновим методом [13] і виражали в %.

Кратність використання іммобілізованої пероксидази вивчали за реакцією окиснення фенолу, для цього іммобілізований препарат вносили в колбу, що містила 10 см<sup>3</sup> буферного розчину з 1 мМ фенолу і 1 мМ пероксиду водню. Через 30 хв мембрану з препаратом ПОХ переносили у колбу з аналогічними розчинами. Кратність використання ензиму досліджували до моменту досягнення 50% -ї конверсії фенолу.

Мас-спектрометричні дослідження було виконано на приладі Autoflex II (Bruker Daltonics Inc). Застосовували методику матрично активованої лазерної десорбції/іонізації (MALDI), а також лазерної десорбції/іонізації (LDI). Зразок, розчинений у метанолі, наносили на стандартну сталеву мішень та висушували за кімнатної температури. Отриманий мас-спектр є сумою окремих 100 спектрів. Спектри одержано в режимі рефлектрону.

### Результати та обговорення

За модифікованим методом Баха отримали гетерогенний (SDS-електрофорез) зразок ПОХ ( $RZ = 1,0$ ; активність 100 Од/мг протеїну), строк зберігання 5 міс [8]. Молекулярна маса виділеної ПОХ 42 972 Да підтверджена методом MALDI (рис. 1) і узгоджується з даними літератури [14].

Методом періодатного окиснення гідратцелюозної мембрани і подальшої взаємодії альдегідних груп, що утворилися (кількісний вміст їх становив 36%, тобто 100% від теоретичного), з аміногрупами пероксидази і відновленням боргідридом натрію, було одержано іммобілізований зразок ПОХ (рис. 2).

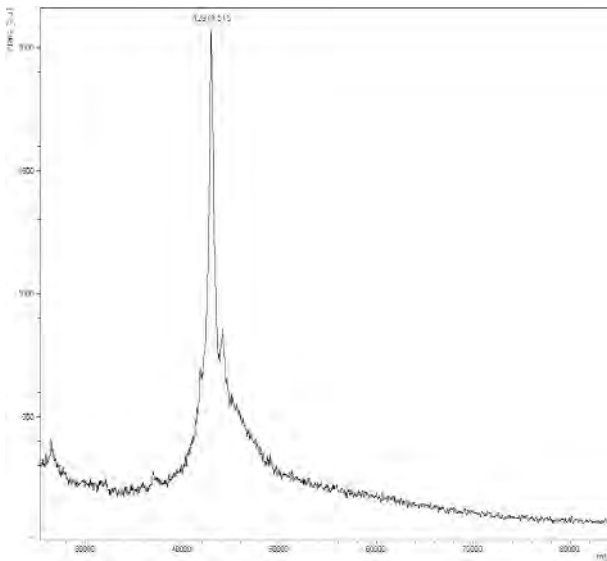


Рис. 1. Фрагмент MALDI-спектра виділеної ПОХ у діапазоні 3 000–8 000 маса/заряд

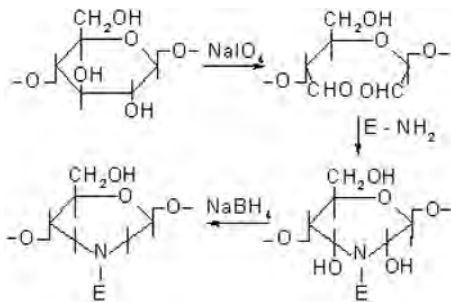


Рис. 2. Схема процесу ковалентної іммобілізації виділеної ПОХ з використанням мембрани «Діацел» (E — ензим)

У результаті ковалентної іммобілізації ПОХ отримано біокатализатор з кількісним зв'язуванням протеїну, зі збереженням 88% активності (масове відношення ензим:носії 0,2:1), розширеними значеннями рН- і термооптимумів активності, збільшеною термостабільністю, стійкістю під час зберігання (8 міс) (таблиця).

Стабілізаційні ефекти зумовлено утворенням міцного зв'язку ПОХ з мембраною, що зменшує конформаційну рухливість протеїну.

Проведені кінетичні дослідження показали збільшення значень  $K_M$  іммобілізованої ПОХ за перексидом водню і пірогалолом; зменшення значень  $V_{max}$  реакції, яка каталізується іммобілізованим ензимом, що, можливо, зумовлено зменшенням спорідненості ензиму до субстрату, а також конформаційними змінами протеїнової молекули.

Розроблені умови (концентрація біокатализатора 0,1 Од/см<sup>3</sup>, рН 7,0, 37 °С,  $\tau$  1 год,

Характеристики вільного та іммобілізованого зразків ПОХ

Властивості ензиму	Вільна ПОХ	Іммобілізована ПОХ
Активність, Од/мг протеїну	100	88
рН-оптимум	6,0–7,0	4,5–7,5
Термооптимум, °С	40	30–55
Термостабільність, $K_{1/2}$ , с <sup>-1</sup>	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$9,1 \cdot 10^{-6}$
$K_M$ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , ммоль	0,43	0,64
$K_M$ пірогалол, ммоль	2,30	3,16
$V_{max}$ , ммоль/мг·хв	0,09	0,057
Зберігання, міс	5	8

[фенол]:[H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]=1:1) сприяли кількісному ступеню окиснення фенолу (0,25–1,0 мМ) з утворенням нерозчинних у воді й більшості органічних розчинників продуктів темно-коричневого кольору з розміром частинок 15–75 мкм — поліоксифеніленів.

На рис. 3 наведено LDI-мас-спектр суміші продуктів окиснення фенолу за допомогою іммобілізованої пероксидази хрону.

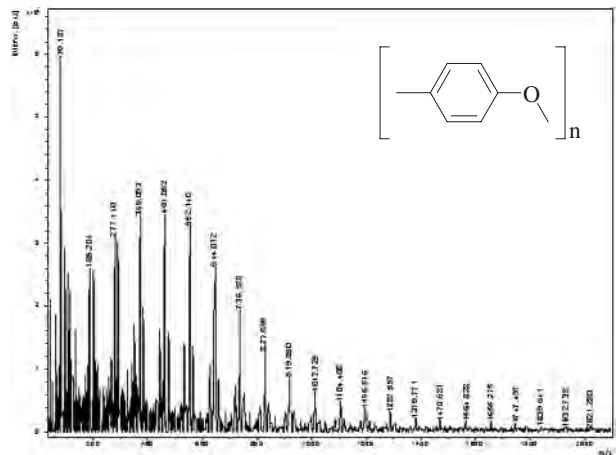


Рис. 3. LDI-мас-спектр суміші продуктів пероксидазного окиснення фенолу ([фенол] = 1,0 мМ, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 1,0 мМ, активність іммобілізованої ПОХ 88 Од/мг протеїну, рН 7,0,  $t = 37$  °С,  $\tau = 1$  год) у діапазоні 200–2 000 маса/заряд

Спостерігається серія піків з послідовністю 92 маса/заряд, що є підтвердженням утворення поліоксифенілену (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>. Найбільше зафіксоване значення маса/заряд становить 2 021, тобто ланцюг поліоксифенілену складається з 21 залишку.

Встановлено, що отриманий біокатализатор у реакторі періодичної дії сприяв кількісному

окисненню фенолу (1 мМ) протягом 7 циклів використання та високому рівню його біоконверсії (95–50%) у наступні 15 циклів (рис. 4) з утворенням нерозчинного продукту окиснення поліоксифенілену, тоді як вільна ПОХ каталізувала одноразове окиснення фенолу в тих самих умовах з 80,3%-м рівнем біоконверсії.

Таким чином, результати роботи мають практичне значення. Створення біокатализатора багаторазової дії, отриманого ковалентною іммобілізацією виділеного частково очищеного зразка ПОХ на мембрані «Діацел» дозволило розробити спосіб багаторазового окиснення фенолу у водних розчинах з утворенням нерозчинного продукту — поліоксифенілену.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Cooper V. A., Nicell J. A. Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase // *Water Res.* — 1996. — V. 30. — P. 954–961.
2. Wagner M., Nicell J. A. Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide // *Ibid.* — 2002. — V. 36. — P. 4041–4052.
3. Cheng J., Ming Yu. S., Zuo P. Horseradish peroxidase immobilized on aluminium-pillared inter-layered clay for the catalytic oxidation of phenolic wastewater // *Ibid.* — 2006. — V. 40, N 2. — P. 283–290.
4. Alemzade I., Nejati S. Phenol removal by immobilized horseradish peroxidase // *J. Hazard. Mater.* — 2009. — V. 166, N 2–3. — P. 1082–1086.
5. Bayramoglu G., Arica Y. Enzymatic removal of phenol and *p*-chlorophenol in enzyme reactor: Horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads // *Ibid.* — 2008. — V. 156, N 1–3. — P. 148–155.
6. Gomez J. L., Bodalo A., Gomez E. Immobilization of peroxidases on glass beads: an improved alternative for phenol removal // *Enz. Microb. Technol.* — 2006. — V. 39, N 2. — P. 1016–1022.
7. Magri M. L., De Las Nieves L. M., Miranda M. V. Immobilization of soybean seed coat peroxidase on its natural support for phenol removal from wastewater // *Biocatal. Biotransform.* — 2007. — V. 25, N 1. — P. 98–102.
8. Романовська І. І., Осійчук О. В., Декіна С. С. та ін. Дослідження пероксидазного окиснення фенольних сполук // *Мед. хімія.* — 2010. — Т. 12, № 4 (45). — С. 79–84.
9. Туркова Я. Аффинная хроматография. — М.: Мир, 1980. — 571 с.
10. Hartree E. E. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response // *Anal. Biochem.* — 1972. — V. 48, N 1. — P. 422–427.
11. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. — М.: Мир, 1979. — 280 с.
12. Березин И. В., Клесов А. А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976. — 320 с.
13. Коренман И. М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. — М.: Химия, 1975. — 360 с.
14. Veitch N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme // *Phytochemistry.* — 2004. — V. 65. — P. 249–259.

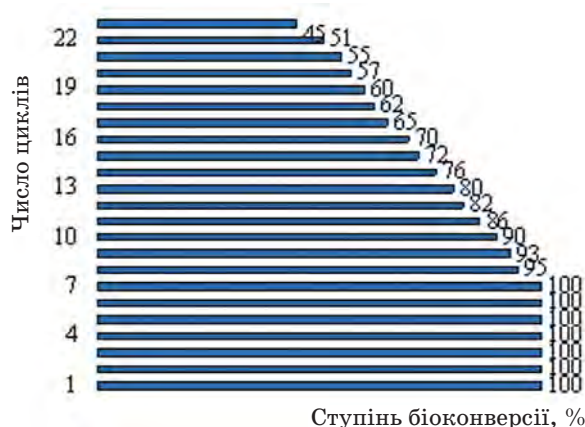


Рис. 4. Багаторазове використання ковалентно іммобілізованої ПОХ в реакції окиснення фенолу

## ОКИСЛЕНИЕ ФЕНОЛА КОВАЛЕНТНО ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ПЕРОКСИДАЗОЙ ХРЕНА

*И. И. Романовская<sup>1</sup>  
О. В. Осейчук<sup>3</sup>  
С. С. Декина<sup>1</sup>  
Ю. А. Шестеренко<sup>1</sup>  
О. В. Севастьянов<sup>1</sup>  
Т. Ю. Громовай<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Физико-химический институт  
им. А. В. Богатского НАН Украины, Одесса

<sup>2</sup>Институт химии поверхности

им. А. А. Чуйко НАН Украины, Киев

<sup>3</sup>Одесский национальный медицинский  
университет

*E-mail: romairina@gmail.com*

По модифицированному методу Баха выделен частично очищенный препарат пероксидазы хрена (RZ = 1,0; активность 100 Ед/мг протеина). Молекулярная масса выделенной пероксидазы хрена (42 972 Да) подтверждена методом масс-спектрометрии — матрично активированной лазерной десорбции / ионизации. Полученный препарат был ковалентно иммобилизован путем периодатного окисления полисахаридной мембраны «Диацелл» с последующим восстановлением боргидридом натрия в массовом отношении энзим: носитель 0,2:1. Получен биокатализатор с количественным связыванием протеина, с сохранением 88% активности (массовое отношение энзим: носитель 0,2:1), расширенными значениями рН- и термооптимумов активности, увеличенной термостабильностью, устойчивостью при хранении (8 мес). Кинетические исследования показали увеличение значений  $K_m$  по пероксиду водорода и пирогаллолу; уменьшение значений  $V_{max}$  реакции, которая катализируется иммобилизованной ПОХ. Разработанный биокатализатор в реакторе периодического действия способствовал количественному окислению фенола (1 мМ) в течение 7 циклов использования и высокому уровню его биоconversion (95–50%) в последующие 15 циклов. Методом лазерной десорбции/ионизации впервые определена молекулярная масса (около 2 021 Да) нерастворимого в воде и большинстве органических растворителей полимерного продукта пероксидазного окисления фенола — полиоксифенилена (размер частиц 15–75 мкм), состоящего из 21 звена.

**Ключевые слова:** пероксидаза хрена, мембрана «Диацелл», ковалентная иммобилизация, окисление фенола, полиоксифенилен.

## PHENOL OXIDATION USING COVALENTLY IMMOBILIZED HORSERADISH PEROXIDASE

*I. I. Romanovska<sup>1</sup>  
O. V. Oseychuk<sup>3</sup>  
S. S. Dekina<sup>1</sup>  
Y. A. Shesterenko<sup>1</sup>  
O. V. Sevastyanov<sup>1</sup>  
T. Yu. Gromovoy<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Bogatsky's Physico-Chemical Institute  
of National Academy of Sciences of Ukraine,  
Odesa

<sup>2</sup>Chuiko Institute of Surface Chemistry of  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

<sup>3</sup>Odesa National Medical University

*E-mail: romairina@gmail.com*

According to modified Bakh's method, partially purified horseradish peroxidase preparation (RZ = 1,0; activity 100 U/mg of protein) was isolated. Molecular mass of obtained HPR (42 972 Da) was confirmed by mass-spectrometry: matrix activated laser desorption/ ionization. The enzyme was covalently immobilized by periodate oxidation of polysaccharide membrane «Diacell», followed by sodium borohydride reduction, at mass ratio enzyme: support 0.2:1. The biocatalyst with quantitative protein coupling, 88% of activity's pH- and thermooptima, increased thermostability, stable at storage (8 months) was obtained. Kinetic studies had shown the increasing of hydrogen peroxide and pyrogallol  $K_m$  values and decreasing of  $V_{max}$  values during immobilized HPR-catalyzed reactions. In the batch reactor the biocatalyst developed promoted the quantitative phenol oxidation (1 mmol/dm<sup>3</sup>) during 7 cycles of usage and high level of it's bioconversion (95–50%) during the next 15 cycles.

Molecular weight (about 2021 Da) of polymer product, insoluble in water and most organic solvent, of peroxidase oxidation of phenol — polyoxyphenylene (particle size is from 15 to 75 nm) consisting of 21 units was first determined by laser desorption/ionization.

**Key words:** horseradish peroxidase, Diacell membrane, covalent immobilization, phenol oxidation, polyhydroxyphenylene.