УДК 577.158.52

І. І. Романовська[1], О. В. Осійчук[2], О. В. Севастьянов[1]
ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ О. В. БОГАТСЬКОГО НАН УКРАЇНИ, ОДЕСА
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ[2]

СПІВОКИСНЕННЯ ФЕНОЛЬНИХ СУБСТРАТІВ У ПЕРОКСИДАЗНОМУ КАТАЛІЗІ

Встановлено, що використання легкоокиснюваних похідних хіноліну (8-гідроксихінолін-3-сульфокислота, 8-гідроксихінолін-5-сульфокислота, 5,7-дибром-8-гідроксихінолін, 2,4-дигідроксихінолін) у реакціях пероксидазного каталізу сумісно з повільно окиснюваними фенольними полютантами (фенол, о-, m-, n-крезоли, резорцин, о-, m-, n-хлорфеноли, 2,4,6-трихлорфенол, пентахлорфенол) при мольних відношеннях 0,5:1 сприяє підвищенню ступеня біоконверсії останніх з 20,4–80,4 до 60,5–100 %. Показано утворення легкоосаджуваних продуктів, нерозчинних в органічних розчинниках.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **пероксидаза хрону, феноли, похідні хіноліну, біоконверсія, співокиснення субстратів.**

ВСТУП. Розробка, вдосконалення і пошук ефективних методів видалення високотоксичних фенольних полютантів з розчинів продовжують залишатися актуальним питанням. Гранично допустимі концентрації фенолів у стічних водах варіюють від 0,001 до 0,1 мг/дм^3 [8]. Серед існуючих методів дефенолізації (фотокаталітичне, електрохімічне, біохімічне окиснення, адсорбція, екстракція, окиснення озоном, хлором та ін.) [3] ефективним є ферментативний спосіб із застосуванням пероксидази хрону (ПОХ) завдяки утворенню нерозчинних продуктів окиснення, можливості використовувати ензим у широких інтервалах pH, температур і концентрацій субстратів [11, 14, 15], а також створення біосенсорів для визначення концентрації фенолу в розчинах та біологічних рідинах у біології і медицині, тощо.

Пероксидаза (КФ 1.11.1.7) належить до гемовмісних глікопротеїнів, які за присутності пероксиду водню, хлориту натрію і ряду органічних гідропероксидів каталізують окиснювальну трансформацію різноманітних хімічних сполук (ароматичні вуглеводні, меркаптани, аліфатичні нітросполуки, галогенозаміщені аліфатичні й ароматичні сполуки, заміщені похідні гідразину та ін.) [13], в тому числі фенолів з утворенням малорозчинних і нерозчинних продуктів окиснення [12, 14, 15]. Механізм пероксидазного окиснення фенолів – тристадійна циклічна реакція, в ході якої ПОХ спочатку окиснюється пероксидом водню, а потім відновлюється у двох послідовних стадіях одноелектронного перенесення [10]:

$$(\text{Порф}\ [Fe(III)])^+ + H_2O_2 \xrightarrow{k_1} (\text{Порф}\ [Fe(IV)=O])^+ + H_2O$$
$$\text{ПОХ} \qquad\qquad \text{ПОХ I}$$

$$(\text{Порф}\ [Fe(IV)=O])^+ + R\text{-}H \xrightarrow{k_2} (\text{Порф}\ [Fe(IV)=O]) + R^{\bullet} + H^+$$
$$\text{ПОХ I} \qquad\qquad \text{ПОХ II}$$

$$(\text{Порф}\ [Fe(IV)=O]) + R\text{-}H + H^+ \xrightarrow{k_3} (\text{Порф}\ [Fe(III)])^+ + R^{\bullet} + H_2O$$
$$\text{ПОХ II} \qquad\qquad \text{ПОХ}$$

Вільні радикали, що утворюються в ході каталітичного циклу ПОХ, є реакційноздатними сполуками і можуть неферментативно полімеризуватися з утворенням високомолекулярних сполук, схильних до випадання з водного розчину в осад, нерозчинний в органічних розчинниках.

Відомо, що фенольні субстрати ПОХ можна класифікувати як легко- і важкоокиснювані; для збільшення швидкості окиснення останніх запропоновано метод співокиснення субстратів пероксидази [5, 9].

Метою роботи було вивчити співокиснення фенольних субстратів і похідних хіноліну в пероксидазному каталізі для підвищення ступеня трансформації фенолів та їх видалення з водних розчинів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі використовували пероксидазу хрону, виділену за модифікованим методом Баха [6], комерційний препарат ПОХ (“Sigma”), похідні фенолів і хіноліну (“ТОР”, Україна). У виділеному ферментному препараті визначали спектральний по-

© І. І. Романовська, О. В. Осійчук, О. В. Севастьянов, 2013.

казник чистоти (RZ=A403/A278=1,0) і активність по пірогалолу (100 Од/мг протеїну) [6].

Концентрацію пероксидази та пероксиду водню визначали спектрофотометрично (СФ-46), використовуючи молярні коефіцієнти поглинання ε 102000 моль$^{-1}$·см$^{-1}$ при 403 нм і ε 72,4 моль$^{-1}$·см$^{-1}$ при 230 нм відповідно.

Реакцію окиснення фенолу, *о-*, *m-*, *n*-крезолів, резорцину, *о-, m-, n*-хлорфенолів, 2,4,6-трихлорфенолу, пентахлорфенолу (1,0 мМ) пероксидом водню (1,0 мМ) проводили в середовищі 0,01 М Na-фосфатного буферного розчину (рН 7,0) за присутності розчину ПОХ (0,1 од./мг) з наступним додаванням розчинів 8-гідроксихінолін-3-сульфокислоти, 8-гідроксихінолін-5-сульфокислоти, 5,7-дибром-8-гідроксихіноліну, 2,4-дигідроксихіноліну (0,1–1 мМ). Контролювали зменшення концентрації досліджуваних фенольних субстратів при 37 °С протягом 1 год 4-аміноантипіриновим методом [4] і виражали у відсотках.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Раніше ми проводили дослідження, присвячені порівняльному аналізу окиснення у розроблених умовах широкого спектра фенольних сполук, що каталізується виділеним частково очищеним і комерційним препаратами ПОХ (RZ=1,0 і 2,7 відповідно) [1, 2, 7]. При цьому ефективність біоконверсії багатьох субстратів була високою – 80–96 % (фенол, *о-, m-, n*-крезоли, пірокатехін, гідрохінон, *n*-хлорфенол, 2,4,6-трихлорфенол, α-нафтол), тоді як *m*-хлорфенол і пентахлорфенол трансформувалися всього на 26,0 і 24,5 %, а *о-, n*-нітрофеноли не піддавались ферментативному окисненню у зв'язку з неможливістю утворення феноксильних радикалів (табл. 1).

При порівнянні ступеня трансформації досліджуваних субстратів за допомогою виділеного нами частково очищеного препарату ПОХ і комерційного препарату показано відсутність істотного впливу спектрального ступеня чистоти ензиму (RZ) на цей процес (табл. 1).

Слід зазначити, що, крім невисокої конверсії хлорпохідних фенолу (*m*-хлорфенол, 2,4,6-трихлорфенол, пентахлорфенол), ряд полютантів (пірокатехін, гідрохінон) не утворює полімерних осадів у реакціях, що каталізуються ПОХ. Відомо, що легкоокиснювані субстрати ПОХ (*о*-діанізидин, α-нафтол, 2,3-диметилфенол) значною мірою сприяють ферментативному каталізу повільно окиснюваних фенолів (фенол, 2,4-дихлорфенол, 2,4,6-трихлорфенол, пентахлорфенол та ін.) [6, 9] і осадженню розчинних продуктів окиснення.

Згідно з даним методом, легкоокиснювані феноли сприяють видаленню та зниженню токсичності важкоокиснюваних фенолів при додаванні ПОХ і пероксиду водню до їх водних розчинів. Цей ефект співокиснення полягає в тому, що повільно окиснюваний субстрат більш ефективно окиснюється радикалами легкоокиснюваного субстрату, ніж сполуками ПОХ I і ПОХ II, а радикали легкоокиснюваного субстрату ефективніше взаємодіють з радикалами важкоокиснюваного субстрату, ніж один з одним. Це сприяє утворенню легкоосаджуваного високомолекулярного змішаного полімеру. Повільно окиснюваний фенол також здатний адсорбуватись на

Таблиця 1 – **Окиснення фенольних сполук, що каталізуються ПОХ**

Фенольна сполука	Ступінь біоконверсії, %	
	ПОХ*	ПОХ**
фенол	80,4	88,4
о-крезол	78,1	79,2
m-крезол	76,5	78,6
n-крезол	91,2	94,8
резорцин	75,0	72,9
пірогалол	94,3	98,9
пірокатехін	84,3	84,8
гідрохінон	92,1	95,3
о-хлорфенол	68,1	73,1
m-хлорфенол	25,2	26,0
n-хлорфенол	71,0	74,1
2,4,6-трихлорфенол	62,0	61,0
пентахлорфенол	20,4	24,5
α-нафтол	94,1	98,6
о-нітрофенол	0	0
n-нітрофенол	0	0

Примітка. ([Фенольний субстрат]=1,0 мМ, [H_2O_2]=1,0 мМ, активність ПОХ – 0,1 од./см^3, рН – 7,0, t=37 °С, τ=1 год); * – виділений препарат ПОХ; ** – комерційний препарат ПОХ, "Sigma".

осаджуваних полімерах сполуки, що легко видаляється [6].

Розглянутому механізму відповідає схема:

$$ПОХ+H_2O_2 \rightarrow ПОХ\ I+H_2O$$
$$ПОХ\ I+S_1 \rightarrow ПОХ\ II+S_1\cdot$$
$$ПОХ\ I+S_2 \rightarrow ПОХ\ II+S_2\cdot$$
$$ПОХ\ II+S_1 \rightarrow ПОХ+S_1\cdot$$
$$ПОХ\ II+S_2 \rightarrow ПОХ+S_2\cdot$$
$$2S_1\cdot \rightarrow P_1+S_1$$
$$S_1\cdot+S_2\cdot \rightarrow P_1+S_2$$
$$2S_2\cdot \rightarrow P_2+S_2$$
$$S_1+S_2\cdot \rightarrow S_1\cdot+S_2,$$

де ПОХ, ПОХ I і ПОХ II – пероксидаза та її окиснені форми; S_1 і S_2 – повільно і швидко окиснювані субстрати; $S_1\cdot$ і $S_2\cdot$ – вільні радикали цих субстратів.

У даній роботі вперше запропоновано використовувати як легкоокиснювані субстрати ПОХ похідні хіноліну (8-гідроксихінолін-3-сульфокислота, 8-гідроксихінолін-5-сульфокислота, 5,7-дибром-8-гідроксихінолін, 2,4-дигідроксихінолін) з метою більш ефективного ферментативного елімінування важкоокиснюваних фенолів і субстратів, що не утворюють осаджуваних полімерних продуктів.

Істотно важливо було встановити, наскільки ефективність процесу співокиснення фенолів, що каталізується частково очищеною ПОХ, залежить від концентрації похідних хіноліну.

Було вивчено залежність ступеня біоконверсії фенолу, *о*-крезолу, резорцину і *м*-хлорфенолу (1,0 мМ) від концентрації 2,4-дигідроксихіноліну в діапазоні від 0,1 до 1,0 мМ (активність ферменту – 1,0 од./мг, pH – 7,0, температура – 37 °С, час інкубації – 1 год).

Відповідно до даних таблиці 2, ефективність видалення фенолів поступово зростала з підвищенням концентрації 2,4-дигідроксихіноліну від 0,1 до 0,5 мМ, досягаючи високого рівня при 0,25–0,5 мМ, і становила для фенолу й *о*-крезолу 100 %, для резорцину та *м*-хлорфенолу – 97,2 і 70,1 % відповідно. Подальше збільшення концентрації 2,4-дигідроксихіноліну до 1,0 мМ не впливало на ступінь біоконверсії важкоокиснюваних фенольних субстратів ПОХ.

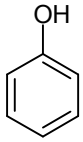
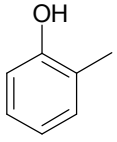
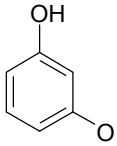
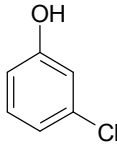
Отримані результати було використано для реакцій співокиснення ряду фенольних полютантів (фенол, *о-, м*-крезоли, резорцин, *о-, м-, п*-хлорфеноли, 2,4,6-трихлорфенол, пентахлорфенол) із застосуванням 8-гідроксихінолін-3-сульфокислоти, 8-гідроксихінолін-5-сульфокислоти, 5,7-дибром-8-гідроксихіноліну і 2,4-дигідроксихіноліну за оптимальних умов.

Використання похідних хіноліну в пероксидазному каталізі сумісно з фенолами, що повільно трансформуються, дозволяє підвищити ступінь біоконверсії останніх з 20,4–80,4 до 60,5–100 % з утворенням легкоосаджуваних полімерних осадів, нерозчинних у воді й органічних розчинниках (рис.).

Таким чином, легкоокиснювані сполуки – 8-гідроксихінолін-3-сульфокислоту, 8-гідроксихінолін-5-сульфокислоту, 5,7-дибром-8-гідроксихінолін, 2,4-дигідроксихінолін у реакціях окиснення повільно окиснюваних фенолів, що каталізуються ПОХ, можна успішно використати для видалення полютантів з водних розчинів.

ВИСНОВКИ. Показано відсутність істотного впливу спектрального ступеня чистоти пероксидази хрону на процес окиснення широкого спектра фенольних сполук у водних розчинах. Встановлено, що співокиснення легкоокиснюваних похідних хіноліну в пероксидазному каталізі з повільно окиснюваними фенольними полютантами при мольних відношеннях 0,5:1 сприяє підвищенню ступеня біоконверсії останніх у середньому в 1,2–1,6 раза з утворенням легкоосаджуваних продуктів, нерозчинних в органічних розчинниках.

Таблиця 2 – **Вплив концентрації 2,4-дигідроксихіноліну на біоконверсію фенолів**

Концентрація 2,4-дигідроксихіноліну, мМ	Ступінь біоконверсії фенолів, %			
	фенол 	*о*-крезол 	резорцин 	*м*-хлорфенол 
–	80,4	78,1	75,0	25,2
0,1	91,8	89,5	84,6	56,5
0,25	95,6	92,1	90	67,3
0,5	100	100	97,2	70,1
1	100	100	100	72,3

Примітка. [Фенольний субстрат]=1,0 мМ, $[H_2O_2]$=1,0 мМ, активність ПОХ – 0,1 од./см^3, pH – 7,0, t=37 °С, τ=1 год).

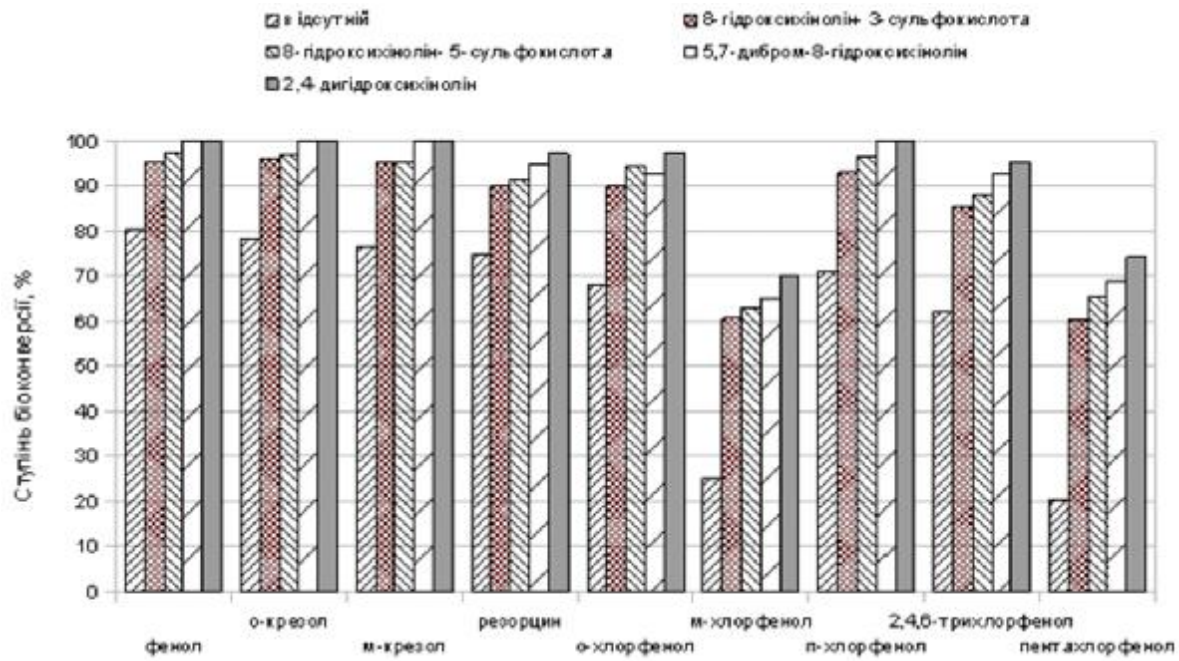


Рис. Вплив похідних хіноліну на біоконверсію фенолів ([похідні хіноліну]=0,5 мМ, [феноли]=1,0 мМ, $[H_2O_2]$=1,0 мМ, активність ПОХ – 0,1 од./см^3, pH – 7,0, t=37 °С, τ=1 год).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Анализ влияния структуры фенольных соединений на степень их ферментативной конверсии / И. И. Романовская, Е. Н. Муратов, В. Е. Кузьмин [и др.] // Доповіді НАН України. – 2006. – № 9. – С. 161–166.

2. Дослідження пероксидазного окиснення фенольних полютантів / І. І. Романовська, О. В. Осійчук, С. С. Декіна [та ін.] // Мед. хімія. – 2010. – **12**, № 4. – С. 79–84.

3. Запольський А. К. Фізико-хімічні основи очищення стічних вод : підручник / А. К. Запольський, І. М. Астерлін, М. Т. Брик. – К. : Лібра, 2000. – 552 с.

4. Коренман И. М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений / И. М. Коренман. – М. : Химия, 1975. – 360 с.

5. Лебедева О. В. Механизм пероксидазного окисления. Субстрат-субстратная активация в реакциях, катализируемых пероксидазой хрена / О. В. Лебедева, Н. Н. Угарова // Известия РАН. Серия "Химия". – 1996. – № 1. – С. 25–31.

6. Михлин Д. М. Биологическое окисление / Д. М. Михлин. – М. : Изд-во Академии наук СССР, 1956. – 442 с.

7. Осейчук О. В. Исследование условий трансформации фенола и его монохлорзамещенных производных, катализируемое пероксидазой / О. В. Осейчук, И. И. Романовская, О. В. Севастьянов // Химия и технология воды. – 2006. – **28**, № 5. – С. 505–512.

8. Проблема сбора, переработки и утилизации отходов : сб. науч. статей. – Одесса : ОЦНТЭИ, 2001. – С. 83–87.

9. Рогожин В. В. Стационарная кинетика совместного пероксидазного окисления гидрохинона и *о*-дианизидина в присутствии пероксидазы / В. В. Рогожин, В. В. Верхотуров // Биохимия. – 1997. – **64**, № 2. – С. 219–224.

10. Dunford H. B. Peroxidases in chemistry and biology / H. B. Dunford // CRC Press. – 1991. – **2**. – P. 1–24.

11. Guopsng Z. Treatment of aqueous pentachlorophenol by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide / Z. Guopsng, J. A. Nicell // Water Research. – 2000. – **34**. – P. 1629–1637.

12. Phenol conversion and dimeric intermediates in horseradish peroxidase – catayzed phenol removal from water / J. Yu, K. E. Taylor, H. Zou [et al.] // Environ. Sci. Technol. – 1994. – **28**. – P. 2154–2160.

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

14. Wagner M. Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide / M. Wagner, J. A. Nicell // Water Res. – 2002. – **36**. – P. 4041–4052.

15. Wilberg K. Q. Removal of phenol by enzymatic oxidation and flotation / K. Q. Wilberg, D. G. Nunes, J. Rubio // Brazilian Journal of Chemical Engineering. – 2000. – **17**. – P. 716–727.

И. И. Романовская[1], О. В. Осейчук[2], О. В. Севастьянов[1]
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМЕНИ А. В. БОГАТСКОГО НАН УКРАИНЫ[1], ОДЕССА
ОДЕССКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ[2]

СООКИСЛЕНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СУБСТРАТОВ В ПЕРОКСИДАЗНОМ КАТАЛИЗЕ

Резюме

Установлено, что использование легкоокисляемых производных хинолина (8-гидроксихинолин-3-сульфокислота, 8-гидроксихинолин-5-сульфокислота, 5,7-дибром-8-гидроксихинолин, 2,4-дигидроксихинолин) в реакциях пероксидазного катализа совместно с медленно окисляемыми фенольными поллютантами (фенол, о-, м-, п-крезолы, резорцин, о-, м-, п-хлорфенолы, 2,4,6-трихлорфенол, пентахлорфенол) при мольных отношениях 0,5:1 способствует повышению степени биоконверсии последних с 20,4–80,4 до 60,5–100 %. Показано образование легкоосаждаемых продуктов, нерастворимых в органических растворителях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **пероксидаза хрена, фенолы, производные хинолина, биоконверсия, соокисление субстратов.**

I. I. Romanovska[1], O. V. Osiychuk[2], O. V. Sevastyanov[1]
O. V. BOHATSKYI PHYSICO-CHEMICAL INSTITUTE OF NAS OF UKRAINE[1], ODESA
ODESA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY[2]

COOXIDATION OF PHENOLIC SUBSTRATES IN PEROXIDATIVE CATALYSIS

Summary

Usage of easily oxydisable quinoline derivatives (8-hydroxyqinoline-3-sulphonic acid, 8-hydroxyqinoline-5-sulphonic acid, 5,7-dibromo-8-hydroxyqinoline, 2,4-dihydroxyqinoline), in peroxidative catalysis jointly with poorly oxidisable phenolic pollutants (phenol, o- m- p-cresols, resorcinol, m- p-chlorophenols, 2,4,6-trichlorophenol, pentachlorophenol) at molar rations of 0,5:1 promotes enchancing the bioconversion level of the last from 20,4–80,4 % to 60,5–100 %, as it was estabilished. The formation of easily precipitating products, insoluble in organic solvents, was shown.

KEY WORDS: **horse radish peroxydase, phenols, qinoline derivatives, bioconversion, cooxidation of substrates.**

Отримано 21.05.13

Адреса для листування: *І. І. Романовська, Фізико-хімічний інститут імені О.В. Богатського НАН України, Люстдорфська дор., 86, Одеса, 65080, Україна, e-mail: romairina@gmail.com.*