



ХИМИЧЕСКАЯ ПЕРЕРАБОТКА ДРЕВЕСИНЫ

УДК 544.472:547.992.3

С.А. Покрышкин¹, К.Г. Боголицын^{1,2}, Ю.Г. Хабаров¹

¹ Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова

² Институт экологических проблем Севера УрО РАН

Покрышкин Сергей Александрович родился в 1987 г., окончил в 2009 г. Архангельский государственный технический университет, аспирант кафедры теоретической и прикладной химии Северного (Арктического) федерального университета имени М.В. Ломоносова. Имеет 2 публикации в области ферментативной кинетики и катализа.
E-mail: serge.physchem@yandex.ru



Боголицын Константин Григорьевич родился в 1949 г., окончил в 1971 г. Архангельский лесотехнический институт, доктор химических наук, профессор, директор ИЭПС УрО РАН, проректор по научной работе и заведующий кафедрой теоретической и прикладной химии Северного (Арктического) федерального университета имени М.В. Ломоносова, заслуженный деятель науки РФ. Имеет более 480 научных работ в области развития фундаментальных принципов «зеленой» химии и разработки физико-химических основ процесса переработки древесины.
E-mail: bogolitsyn@icpn.ru



Хабаров Юрий Германович родился в 1950 г., окончил в 1972 г. Архангельский лесотехнический институт, доктор химических наук, профессор, профессор кафедры технологии ЦБП Северного (Арктического) федерального университета имени М.В. Ломоносова. Имеет 180 печатных работ в области химии древесины, органической и аналитической химии.
E-mail: khabarov.yu@mail.ru



ОКИСЛЕНИЕ ЛИГНИНА ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА В СРЕДЕ ВОДА–ДМСО В ПРИСУТСТВИИ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА*

Показано сохранение активности фермента при наличии в растворе до 30 % ДМСО в реакции окисления лигнина, установлена возможность ферментативного окисления олиго- и полимерных препаратов лигнина.

Ключевые слова: фермент, пероксидаза, лигнин, диметилсульфоксид.

Задача мониторинга качества вод промышленных предприятий в настоящее время является актуальной. На предприятиях ЦБП токсичные фенольные компоненты в технологических водах обнаруживаются на всем протяжении

*Работа выполнена в Центре коллективного пользования научным оборудованием (ЦКП НО) «Арктика» Северного (Арктического) федерального университета имени М.В. Ломоносова при поддержке Минобрнауки РФ.

© Покрышкин С.А., Боголицын К.Г., Хабаров Ю.Г., 2013

нии технологического процесса. После удаления легкоокисляемых мономерных фенолов сточные воды содержат большое количество лигнинных веществ, которые накапливаются в водоемах. Разрушение их под действием ультрафиолетового излучения солнца, микроорганизмов, окисления кислородом воздуха создает постоянный фон токсичных компонентов и снижает уровень кислорода в водоеме [2, 4, 5]. Поэтому определение содержания олиго- и полимерных лигнинных веществ является актуальным с точки зрения как оптимизации технологии, так и экологического мониторинга [6]. Одно из перспективных направлений – использование биосенсоров, основанных на ферментах, позволяет повысить экспрессность, увеличить чувствительность и селективность анализа [17].

Классические растительные пероксидазы, в частности пероксидаза из корней хрена (HRP), обладают высокой стабильностью, более высоким рН-оптимумом и возможностью окисления фенольных соединений непосредственно, без медиаторов или вторых субстратов [11, 15]. Фермент пероксидаза (КФ 1.1.11.7) широко применяется в иммуноферментном анализе [12, 21], при конструировании ферментных электродов [13, 16, 20], создании биомаркеров [14]. Нативная пероксидаза хрена катализирует окисление пероксидом водорода широкого круга фенольных субстратов [3, 19]. Для окисления малорастворимых в воде высокомолекулярных фенольных соединений перспективно использование водно-органических смешанных растворителей. Одним из хорошо известных растворителей для лигнинов является ДМСО [8]. В работах [1, 9, 18] показана возможность окисления фенольных соединений пероксидазой хрена в водно-органических средах.

Цель данной работы – изучить процесс окисления лигнина в бинарном растворителе вода–ДМСО в присутствии пероксидазы хрена и возможность применения данного фермента для создания новых методик определения лигнина. В качестве объекта исследования была выбрана пероксидаза HRP (КФ 1.1.11.7) – гем-содержащий фермент, относящийся к классу пероксидаз растений.

В работе использовали коммерческий препарат С2 пероксидазы хрена (ВВИ «Enzymes») со спектральным показателем чистоты $R_z = 2,30$. Активность фермента определяли по скорости реакции окисления гваякола пероксидом водорода [10].

Концентрацию пероксида водорода контролировали спектрофотометрическим методом с использованием 2-лучевого УФ спектрофотометра Specord250Plus («Analytik Jena») по полосе поглощения 230 нм (молярный коэффициент поглощения $72,7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). В качестве субстрата применяли гваякол производства «Sigma-Aldrich». Реактивы соответствовали квалификации «ос.ч.».

Параметры проведения ферментативной реакции соответствовали определенным ранее [7]. Реакцию пероксидазного окисления лигнина (концентрация $(5 \dots 500) \cdot 10^{-3} \text{ г/л}$) пероксидом водорода ($0,1 \cdot 10^{-3} \text{ М}$) проводили при температуре $25 \text{ }^\circ\text{C}$ в среде фталатного буферного раствора ($0,1 \text{ М}$) при concentra-

ции ДМСО 30 % масс. Процесс инициировали введением пероксидазы хрена (0,015 мг/мл) при объеме реакционной смеси 3 мл. Запись спектров и кинетических кривых окисления гваякола производили на Specord250Plus. За ходом реакции следили по поглощению в области характеристической полосы продукта ферментативного окисления гваякола. Начальную скорость реакции рассчитывали по результатам измерений тангенса угла наклона начального линейного участка кинетической кривой.

Молекулярно-массовое распределение анализировали методом эксклюзионной хроматографии* с использованием ВЭЖХ системы LC-20 («Shimadzu», Япония), оснащенной насосом LC-20 ADsp, автосамплером SIL-20A, термостатом колонок СТО-20А, спектрофотометрическим детектором SPD-20А. Разделение проводили на колонке Styragel (300×4,6 мм), заполненной стиролди-винилбензолным гелем с диаметром частиц 5 мкм («Waters», США) при температуре 50° С. В качестве элюента использовали диметилформамид с добавкой бромид лития (0,05 М) для подавления полиэлектролитных эффектов. Объем вводимой пробы – 10 мкл, концентрация – 1 мг/мл. Система отградуирована с использованием монодисперсных стандартов полистирола в диапазоне молекулярных масс от 100 до 100 тыс. Да. Детектирование осуществляли при длине волны 280 нм. Данные собирали и обрабатывали с использованием программного обеспечения WinGPC (PSS, Германия).

В качестве модельных субстратов фермента использовали образцы диоксанлигнина, сульфатного лигнина, лигносульфоната, выделенных из ели, и натронного лигнина пшеничной соломы. Готовили растворы препаратов лигнина в ДМСО с концентрацией 10 г/л, которые добавляли в реакционную смесь до получения требуемой концентрации лигнина. Раствор

лигнина в присутствии пероксида водорода без добавления фермента оставался стабильным в течение 3 ч. При добавлении в реакционную смесь пероксидазы хрена наблюдалось увеличение оптической плотности в области 400...600 нм (рис. 1). В процессе ферментативного окисления в спектрах

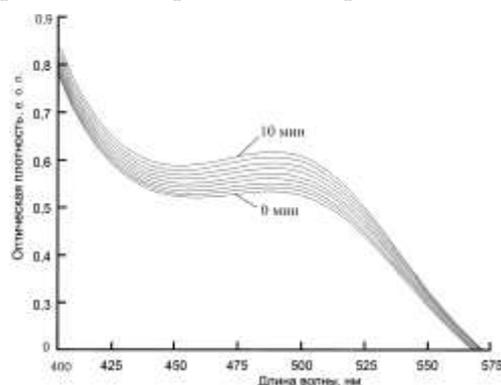


Рис. 1. Электронные спектры поглощения продуктов ферментативного окисления диоксанлигнина в 30 %-м водном растворе ДМСО (продолжительность реакции варьировали от 0 до 10 мин)

* Авторы выражают благодарность м.н.с. ЦКП НО «Арктика» Н. В. Ульяновскому за анализ проб методом эксклюзионной ВЭЖХ.

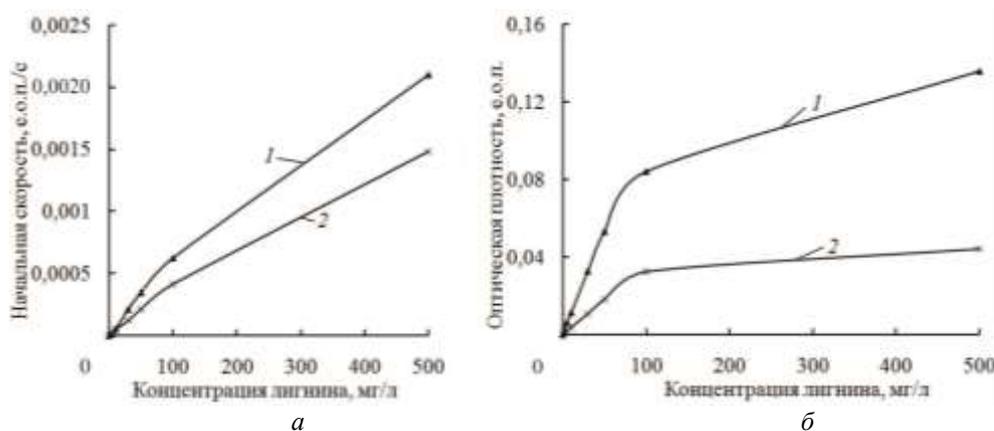


Рис. 2. Зависимость начальной скорости реакции (а) и максимальной оптической плотности реакционной смеси (б) от концентрации сульфатного лигнина (1) и диоксанлигнина (2)

проявлялся максимум при 490 нм, отсутствующий в исходных спектрах и использованный в дальнейшем для определения скорости реакции.

В диапазоне концентраций препаратов лигнина 5...500 мг/л была определена скорость протекания реакции, построены зависимости начальной скорости реакции и максимальной оптической плотности реакционной смеси от концентрации лигнина (рис. 2).

В ходе реакции для образцов диоксанлигнина и сульфатного лигнина было обнаружено увеличение оптической плотности, для образцов лигносульфоната и натронного лигнина признаков протекания реакции не обнаружено. Это можно объяснить ионной формой фенольных ОН-групп в оптимальном для фермента диапазоне рН. В диапазоне концентраций лигнина от 5 до 100 мг/л полученные зависимости начальной скорости (V_0) и максимальной оптической плотности (D_{\max}) от концентрации лигнина (рис. 2) являются линейными, выходящими из центра координат, и описываются уравнениями вида

$$V_0 = ax \text{ и } D_{\max} = bx.$$

Угловые коэффициенты a и b приведены в табл. 1. Отклонение экспериментальных точек от линейной зависимости при высоких концентрациях

Таблица 1
Параметры зависимостей начальной скорости и максимальной оптической плотности от концентрации лигнина

| Коэффициент | Диоксанлигнин | Сульфатный лигнин |
|-------------|----------------------|----------------------|
| a | $4,16 \cdot 10^{-6}$ | $6,42 \cdot 10^{-6}$ |
| b | $3,63 \cdot 10^{-4}$ | $1,06 \cdot 10^{-3}$ |

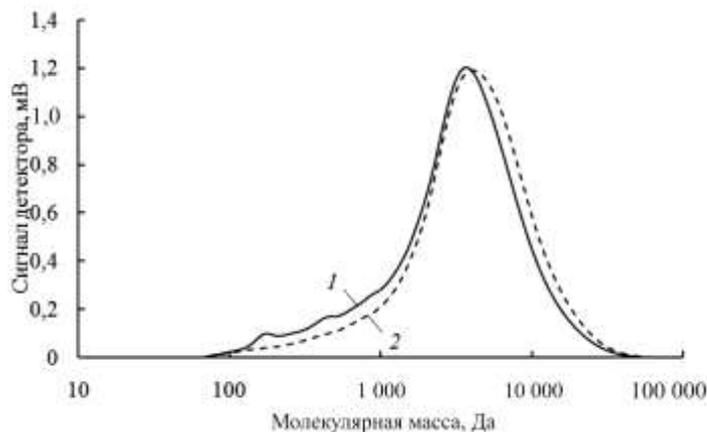


Рис. 3. Молекулярно-массовое распределение препарата диоксанлигнина до реакции (1) и через 60 мин после начала реакции (2)

лигнина обусловлено насыщением субстрат-связывающих сайтов фермента. Полученные данные создают предпосылки для разработки метода определения содержания лигнинных веществ после перевода их в раствор в системе вода–ДМСО.

Для препарата диоксанлигнина дополнительно методом эксклюзионной хроматографии было изучено изменение молекулярно-массового распределения в ходе реакции. Полученные результаты свидетельствуют об уменьшении доли низкомолекулярных фракций и некотором возрастании молекулярной массы препарата лигнина при снижении степени его полидисперсности (рис. 3, табл. 2), что свидетельствует о совместном протекании процессов окисления и полимеризации лигнина под действием фермента, а также о вступлении в реакцию не только низко-, но и высокомолекулярных фрагментов лигнина.

Таблица 2

Молекулярно-массовые характеристики препарата диоксанлигнина

| Показатель | Значение показателя | |
|-------------------------|---------------------|-----------------|
| | до окисления | после окисления |
| Молекулярная масса, Да: | | |
| M_n | 1 540 | 2 030 |
| M_w | 4 660 | 5 480 |
| M_z | 9 040 | 10 100 |
| Полидисперсность | 3,0 | 2,7 |

Выводы

Показано, что фермент (пероксидаза хрена) проявляет активность в реакциях окисления лигнинных веществ при значительном содержании ДМСО в растворе (до 30 %).

Установлено, что ферментативному каталитическому окислению могут быть подвержены как мономерные фенолы, так и олиго- и полимерные препараты, находящиеся в исследуемом растворе.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности разработок ферментативных биосенсоров для определения лигнина в водно-органических средах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Веселова И.А., Кирейко А.В., Шеховцова Т.Н.* Повышение каталитической активности и стабильности пероксидазы хрена за счет включения ее в полиэлектролитный комплекс с хитозаном // Прикладная биохимия и микробиология. 2009. Т. 45, № 2. С. 143–148.
2. *Грушко Я.М.* Сброс лигнина в водоемы с промышленными сточными водами // Влияние фенольных соединений на гидробионтов. Иркутск, 1981. С. 109–116.
3. Использование пероксидаз различного происхождения для определения фенолов / Т.Н. Шеховцова [и др.] // Журн. аналит. химии. 1994. Т. 49, № 12. С. 1317–1323.
4. *Калинкина Н.М.* Эколого-токсикологическая оценка опасности сульфатного лигнина для гидробионтов: автореф. дис. ... канд. хим. наук. М., 1993. 22 с.
5. *Криульков В.А., Каплин В.Т., Ганин Г.И.* Механизм превращения лигнина и его производных в природной среде // Химия и использование лигнина. Рига.: Зинатне, 1974. С. 397–408.
6. Оптимизация нормирования сброса стоков предприятий ЦБП в водотоки / Т.Ф. Личутина, И.В. Мискевич, О.С. Бровко, М.А. Гусакова. Екатеринбург: УрО РАН, 2005. 212 с.
7. *Покрышкин С.А., Боголицын К.Г., Аксенов А.С.* Кинетические закономерности ферментативного окисления гваякола в водной и водно-органической средах // Лесн. журн. 2012. №3. С.100–106. (Изв. высш. учеб. заведений).
8. Физическая химия лигнина / К.Г. Боголицын [и др.]. М.: Академкнига, 2010. 492 с.
9. *Яблоцкий К.В.* Новые аспекты применения нативной и иммобилизованной пероксидазы хрена для определения ее ингибиторов и субстратов: Автореф. дис. ... канд. хим. наук. М., 2010. 28 с.
10. *Bergmeyer H.U.* Methods of enzymatic analysis 2nd Edition. New York: Academic Press, 1974. P. 495.
11. *Dominic W.S. Wong.* Structure and action mechanism of ligninolytic Enzymes // Appl. Biochem. Biotechnol. 2009. N 157. P. 174–209.
12. Horseradish peroxidase-functionalized Pt hollow nanospheres and multiple redox probes as trace labels for a sensitive simultaneous multianalyte electrochemical immunoassay / Song Z [etc.] // Chem. Commun. (Camb). 2010. N 46. P. 6750–6752.

13. *Korkut S., Keskinler B., Erhan E.* An amperometric biosensor based on multi-walled carbon nanotube-poly(pyrrole)-horseradish peroxidase nanobiocomposite film for determination of phenol derivatives // *Talanta*. 2008. N 76. P. 1147–1152.

14. Membrane targeted horseradish peroxidase as a marker for correlative fluorescence and electron microscopy studies / J. Li, Y. Wang, S.L. Chiu, H.T. Cline // *Front Neural Circuits*. 2010. N 4. P. 6.

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

16. Reagentless biosensor for hydrogen peroxide based on self-assembled films of horseradish peroxidase/laponite/chitosan and the primary investigation on the inhibitory effect by sulfide / Shan D. [ect.] // *Biosens. Bioelectron.* 2010. N 26. P. 536–541.

17. *Sadana A., Sadana N.* Handbook of Biosensors and Biosensor Kinetics. Elsevier, the Netherlands, 2011.

18. Stability of free and immobilized peroxidase in aqueous-organic solvent mixtures / Azevedo Anna M. [etc.] // *J. of Molecular Catalysis B.: Enzymatic*. 2001. N 15. P. 147–153.

19. *Torres E., Ayala M.* Biocatalysis Based on Heme Peroxidases. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg. 2010. 358 s.

20. *Yao H., Hu N.* pH-switchable bioelectrocatalysis of hydrogen peroxide on layer-by-layer films assembled by concanavalin A and horseradish peroxidase with electroactive mediator in solution // *J. Phys. Chem. B*. 2010 N 114. P. 3380–3386.

21. *Zhang S. Zou J. Yu F.* Investigation of voltammetric enzyme-linked immunoassay based on a new system of HAP-H₂O₂-HRP // *Talanta*. 2008. N 76. P.122–127.

Поступила 30.04.13

S.A. Pokryshkin¹, K.G. Bogolytsin^{1,2}, Yu.G. Khabarov¹

¹ Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov

² Institute of Ecological Problems of the North, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences

Oxidation of Lignin with Hydrogen Peroxide in Water/DMSO Binary Solvent in the Presence of Horseradish Peroxidase

Peroxidase remained active in the presence of up to 30% DMSO in the solution for lignin oxidation. The possibility of enzymatic oxidation of oligomeric and polymeric phenolic compounds is substantiated.

Keywords: enzyme, peroxidase, lignin, dimethyl sulfoxide.