УДК 577.152.192 + 547.562.1 DOI: 10.5281/zenodo.14923034 EDN: DNZHQH

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛАККАЗНОГО ОКИСЛЕНИЯ ФЕНОЛА

© 2025. ***Е. М. Кравченко, О. В. Макурина, И. Д. Одарюк, В. С. Дорошкевич***

Исследована кинетика лакказного окисления фенола в широком диапазоне начальных концентраций субстрата спектрофотомерическим методом по накоплению продукта. Получаемый продукт не характерен для автоокисления фенола, скорости автоокисления фенола в водных средах при разных значениях pH очень низкие. Одним из промежуточных продуктов лакказного окисления является вещество хиноидной природы, а на глубоких стадиях превращения образуется и выпадает в осадок вероятно полимерный продукт. Кинетика ферментативного процесса, наблюдаемая по накоплению продукта, не описывается уравнением Михаэлиса-Ментен.

Ключевые слова: фенол, лакказа, автоокисление, спектрофотометрия, окисление.

Введение. Лакказы являются медьсодержащими оксидазами и синтезируются различными организмами, грибами, растениями и бактериями. Высокопотенциальные лакказы многих дереворазрушающих грибов участвуют в процессах делигнификации и детоксикации. Эти ферменты способны окислять фенолы, ароматические амины, аминофенолы, некоторые другие органические соединения, ионы металлов [1, 2].

Фенол C_6H_5OH – продукт крупнотоннажной химии, широко распространенный реагент в таких процессах, как получение фенолформальдегидных смол, в медицине и органическом синтезе [3, 4]. Загрязнение воды и почв фенолом – серьезная экологическая проблема, в том числе и нашего региона [5, 6]. Разрабатываются подходы на основе оксидаз и пероксидаз для очистки природных сред от фенолов, в том числе самого фенола [7, 8].

Исследование кинетики и механизма ферментативного окисления фенола представляет интерес для разработки процессов органического синтеза, получения полимеров, биодеградации отходов и биоремедиации.

Постановка задачи. Фенол достаточно устойчив к окислению молекулярным кислородом в водных средах в мягких условиях. К тому же, в этих условиях он не реагирует с такими одноэлектронными окислителями, как ионы Fe^{3+} и Cu^{2+} [9]. По имеющимся данным, фенол характеризуется высоким редокс-потенциалом в слабокислой среде (около 1000 мВ [10]), заметно превышающим потенциал первого медного центра лакказы *Trametes versicolor* – 785 мВ [11, 12]). Так что исходя из гипотезы о пределах субстратной специфичности лакказ, обусловленных стерическим (геометрия активного центра) и термодинамическим факторами (редокс-потенциал первого медного центра, ответственного за взаимодействие с субстратом), его лакказное окисление маловероятно. Однако на практике окисление фенола молекулярным кислородом в присутствии лакказы *Trametes versicolor* все же происходит. Этот процесс характеризуется невысокой скоростью по сравнению с *орто-* и *пара*-дигидроксибензолами и сопровождается образованием продукта коричневатого цвета, довольно быстро выпадающего в осадок. Исследование природы этого вещества, или вероятно смеси веществ, и кинетики реакции представляет интерес для планирования окислительных процессов с использованием ферментов.

Методика эксперимента. Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Specord S300 UV-Vis с термостатируемым кюветным отделением. Для регистрации сигнала и первичной обработки полученных данных использовали программное обеспечение WinAspect. Измерения pH буферных растворов проводили на иономере И–160 М. Математическую обработку экспериментальных данных проводили в программе MS Excel.

В исследованиях использовали коммерческий препарат лакказы *Trametes versicolor* (SIGMA ALDRICH, активность 440 U/мг без дополнительной очистки. Фенол и хлороформ (РЕАХИМ) очищали перегонкой, аскорбиновую кислоту – перекристаллизацией из спирта. Чистоту веществ подтверждали спектрофотометрически. Цитратные, фосфатные и карбонатные буферные растворы готовили из соответствующих компонентов марки «ч.д.а.» или очищенных перекристаллизацией, согласно методикам, описанным в [13].

Анализ результатов. При исследовании стабильности фенола в водных средах от слабокислой до щелочной в условиях автоокисления отмечено превращение с очень низкими скоростями. Во всех исследованных системах наблюдается снижение оптической плотности при длине волны 270 нм (285 нм в щелочной среде) и ее возрастание в виде плеча при длине волны 295 нм (315 нм в щелочной среде) (рис. 1), и не отмечается образования продукта (продуктов), характерного для ферментативного процесса (рис. 2). Ферментативная реакция исследуется в оптимальном цитратном буфере. Замена состава была проведена для выяснения возможного взаимодействия с компонентами буферных растворов – карбоновыми кислотами. Таковое не наблюдали.

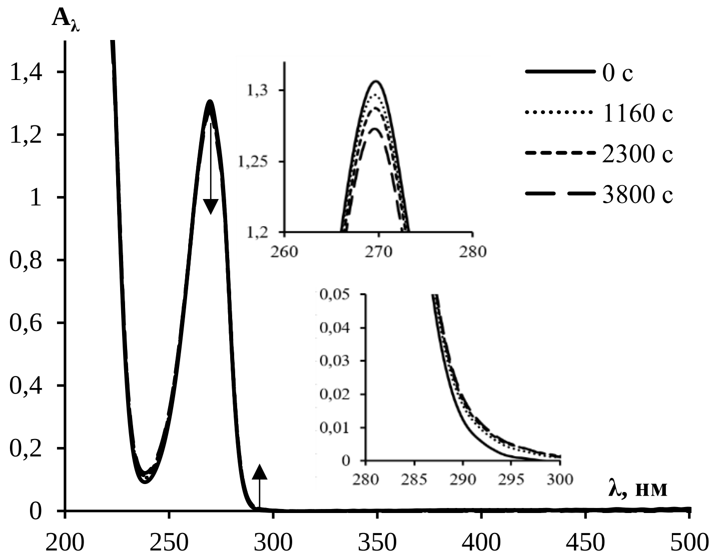

Рис. 1. Изменение спектра поглощения фенола в условиях автоокисления: $[S]_0$=1,0 мМ; 0,1 М фосфатный буфер pH 4,6, 308 К

Если скорости расходования можно оценить с использованием коэффициента экстинкции фенола, то оценка скорости накопления неизвестного продукта представляется затруднительной. При оценке его коэффициента экстинкции по сравнению с таковым для фенола исходя из относительного изменения оптической плотности получаются разные значения для разных систем даже при одном значении pH, т.е., вероятно, такой подход в данном случае некорректен (табл. 1). Как видно, скорость расходования фенола несколько возрастает при переходе к щелочной среде.

Таблица 1

Скорости превращения фенола в водных средах в условиях автоокисления

pH	Буферная система	$V_{0,\ 270\ нм}$, нМ/с	$\frac{\Delta D_{270}}{\Delta t}$, $с^{-1}$	$\frac{\Delta D_{295}}{\Delta t}$, $с^{-1}$	$\frac{\Delta D_{270}}{\Delta D_{295}}$
4,6	фосфатная	6,12	8,22	3,37	2,4
	цитратная	11,2	15	14,9	1,0
	ацетатная	4,06	5,45	6,4	0,9
7,1	фосфатная	6,32	8,48	1,8	4,7
		$V_{0,\ 285\ нм}$, нМ/с	$\frac{\Delta D_{285}}{\Delta t}$, $с^{-1}$	$\frac{\Delta D_{315}}{\Delta t}$, $с^{-1}$	$\frac{\Delta D_{285}}{\Delta D_{315}}$
10,5	карбонатная	17,4	2,34	0,45	5,2

$[S]_0$=1,0 мМ; 0,1 М буферные растворы, 308 К

Полоса поглощения при 270 нм для анализа ферментативной кинетики недоступна, так как в условиях ферментативного окисления уменьшения поглощения в ее области не наблюдается. В то же время хорошо наблюдается накопление продукта, которому соответствует возрастание интенсивности широкой полосы поглощения с λ_{max} = 400 нм. В самом начале реакции эта полоса отсутствует (рис. 2, а). Продукт лакказного окисления фенола экстрагируется из водной реакционной смеси хлороформом. Спектр экстракта в хлороформе схож со спектром реакционной смеси, максимум длины волны незначительно смещен в длинноволновую область (рис. 2, б).

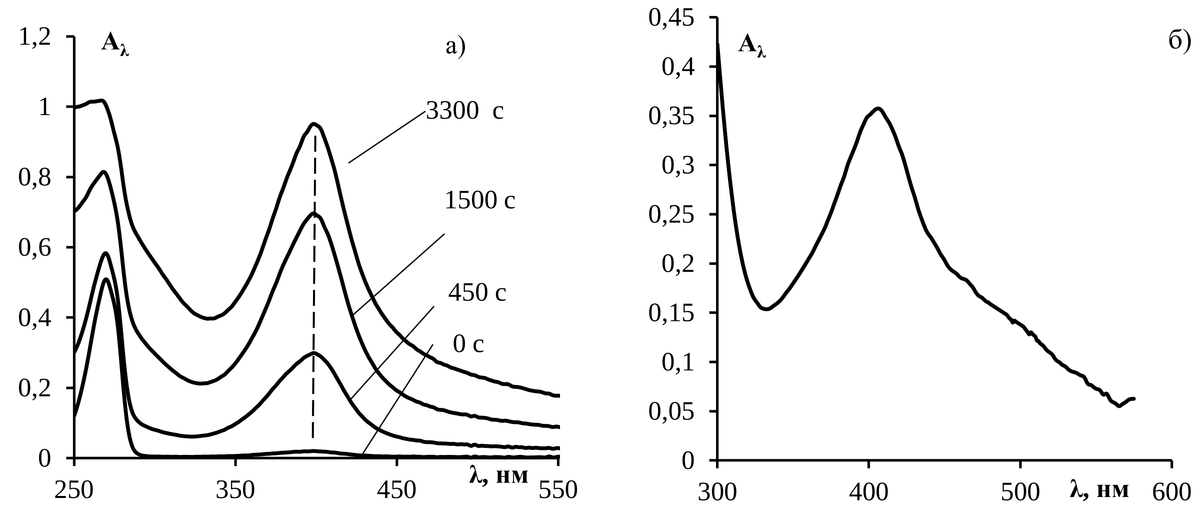

Рис. 2. Спектр продукта лакказного окисления фенола.
а) в реакционной смеси при окислении фенола: $[S]_0$ =0,35 мМ, $[E]_0$ =150 мг/л; цитр. буфер pH 4,6, 308 К;
б) после экстракции хлороформом из реакционной смеси при окислении фенола: $[S]_0$ =6 мМ, $[E]_0$ = 50 мг/л; цитр. буфер pH 4,6, 308 К, $V_{РС}$ = 10 мл, $V_{хлороформа}$ = 3.0 мл, экстракция в момент времени t = 1800 с

При больших степенях превращения фенола интенсивность данной полосы поглощения проходит через экстремум, а потом начинает убывать (рис. 3). Это происходит примерно в 20 раз медленнее накопления продукта. Вероятно, это связано с его дальнейшими превращениями или с выпадением осадка, так как примерно в это же время частицы осадка становятся заметны визуально.

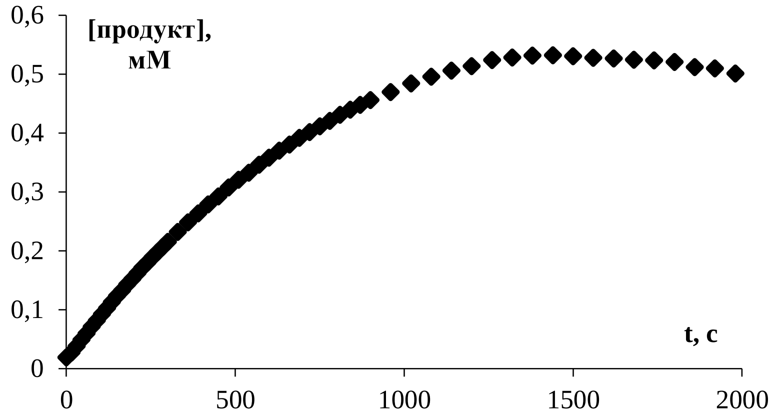

Рис. 3. Кинетическая кривая накопления продукта лакказного окисления фенола: $[S]_0$=1.0 мМ, $[E]_0$=150 мг/л; цитратный буфер pH 4,6, 308 К

При проведении лакказного окисления фенола в реакционных смесях большого объема, с отделением осадка центрифугированием и введением порций свежего субстрата, достичь высокого выхода продукта не удалось. Отдельно показано падение активности используемого фермента в ходе окисления фенола. Причиной может быть его ингибирование промежуточными продуктами превращения или осаждение вместе с продуктом. Эта ситуация осложняет получение больших количеств продукта.

Продукт глубоких стадий окисления, отделенный фильтрованием через фильтр Шотта (размер пор 16) и высушенный на воздухе, частично растворяется в спирте (примерно 10 %). Осадок после высыхания полностью растворяется в ДМСО (рис. 4), но практически не растворим в хлороформе.

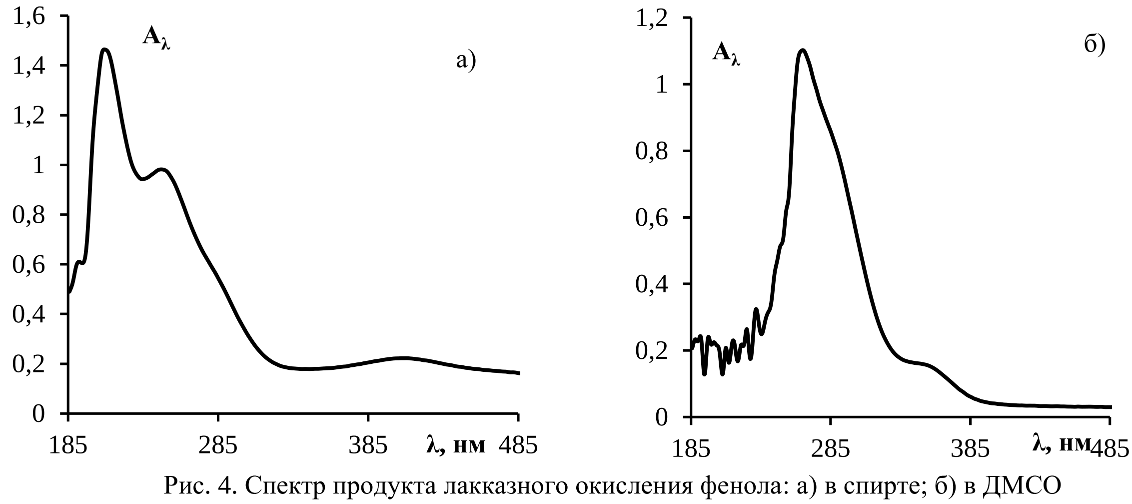

Рис. 4. Спектр продукта лакказного окисления фенола: а) в спирте; б) в ДМСО

В случае фенола вероятные продукты ферментативного окисления разнообразны (схема 1). Сообщается о получении олигомерных и полимерных веществ [14–16], похожих на полианилин в ферментативных и неферметативных системах [17, 18]. Также известно о присутствии в реакционных смесях при неферментативном окислении хиноидных соединений, двухатомных фенолов и хинонов, образовавшихся при их окислении [16, 18].

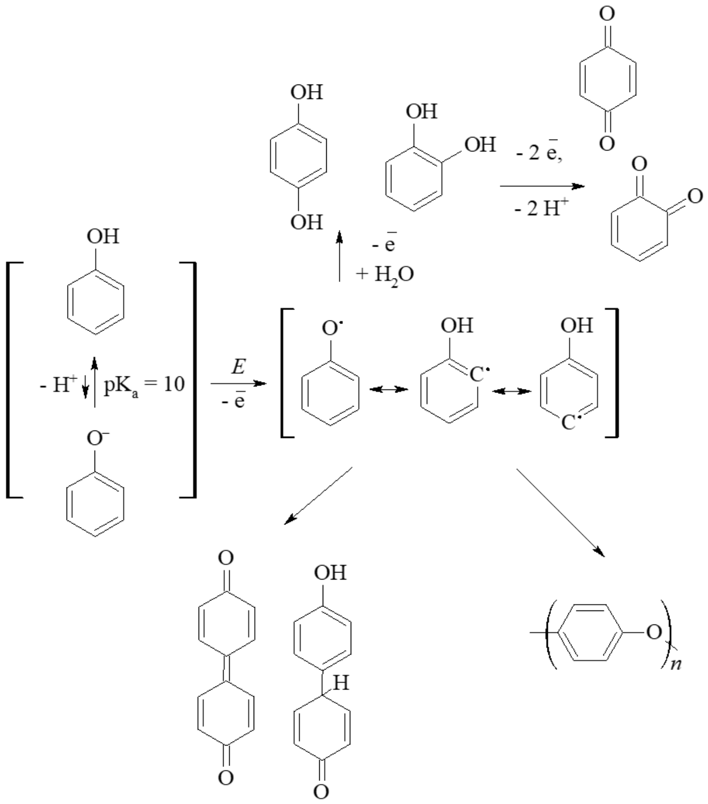

Схема 1. Возможные пути окислительных превращений фенола в присутствии лакказы

Максимум длины волны полосы поглощения продукта окисления фенола близок к максимумам полос продуктов, возникающих при окислении гидрохинона и пирокатехина – *пара*- и *орто*-бензохинонов (420 и 390 нм соответственно). Однако при лакказном окислении этих фенолов образование полимера мы не наблюдали.

Для оценки коэффициента экстинкции продукта использовали максимальную оптическую плотность (в точке экстремума и около нее) исходя из предположения, что фенол полностью превратился в конечный продукт в мольном отношении 1:1 к этому моменту. Он составил (2810 ± 260) л·(см·моль)$^{-1}$.

Исходя из предположения о присутствии в реакционной смеси при лакказном окислении фенола хиноидных продуктов, исследовано действие на них аскорбиновой кислоты. Аскорбиновая кислота может реагировать с хинонами [19, 20], в предельном случае по пути двухэлектронного восстановления до соответствующих фенолов. Изменение оптической плотности *пара*-бензохинона, растворенного в водной среде, или полученного при лакказном окислении гидрохинона, соответствует такому процессу и позволяет вычислить коэффициент экстинкции хинона с достаточно высокой точностью, аналогичное действие аскорбиновой кислоты наблюдается по отношению к продукту окисления пирокатехина [21].

В реакции лакказного окисления фенола добавки аскорбиновой кислоты также снижают оптическую плотность при длине волны 400 нм. Водный раствор аскорбиновой кислоты прибавляли к реакционной смеси лакказного окисления фенола после его остановки. В отличие от окисления пирокатехина и гидрохинона, торможение водным раствором щелочи недостаточно эффективно (снижение скорости в 2 раза при pH 6.0 по сравнению с оптимумом фермента при pH 4.6), а разбавление этанолом вдвое полностью останавливает реакцию.

При титровании малыми объемами раствора аскорбиновой кислоты реакционной смеси, остановленной при достижении примерно $0{,}4A_{400,max}$ изменения оптической плотности мгновенные и приблизительно одинаковые. Коэффициент экстинкции, определяемый таким образом в предположении, что 1 моль аскорбиновой кислоты восстанавливает и обесцвечивает 1 моль продукта (двухэлектронное восстановление), составляет (75800 ± 9700) л·(см·моль)$^{-1}$. В случае остановки реакции при достижении примерно $0{,}8A_{400,max}$ аскорбиновая кислота также снижает оптическую плотность, но взаимодействие уже не мгновенное и получить точные значения нельзя.

Экстракт в хлороформе также быстро реагирует с аскорбиновой кислотой с обесцвечиванием. В обоих случаях многократный избыток аскорбиновой кислоты обесцвечивает смесь полностью, однако при последовательном прибавлении малых порций титранта влияние на оптическую плотность и соответствующий коэффициент экстинкции меняются даже с учетом разбавления. То есть, вероятно наличие в системе нескольких веществ, в том числе и в результате реакции с восстановителем, реагирующих с аскорбиновой кислотой в разных соотношениях и с разной скоростью, и процесс сложнее, чем быстрое двухэлектронное восстановление хинона до фенола. Предполагая, что хотя бы на начальном этапе 1 моль аскорбиновой кислоты восстанавливает и обесцвечивает 1 моль продукта (двухэлектронный процесс), вычислили коэффициент экстинкции, равный (23300 ± 6500) л·(см·моль)$^{-1}$.

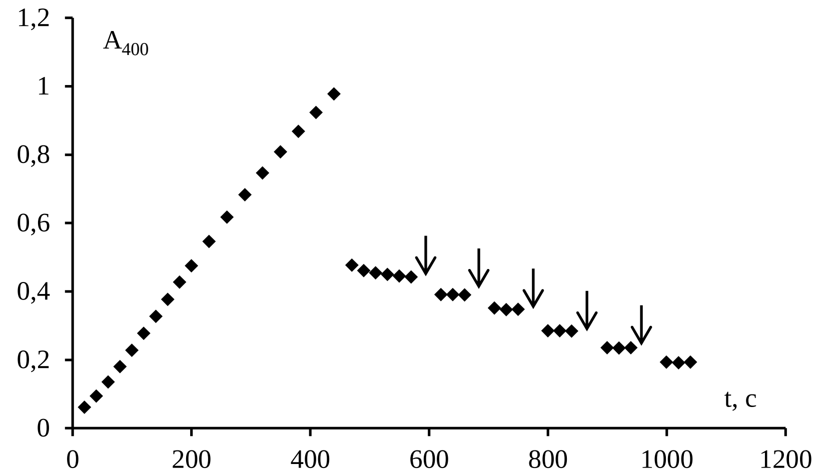

Рис. 5. Определение коэффициента экстинкции продукта окисления фенола в реакционной смеси при восстановлении его аскорбиновой кислотой.
Лакказное окисление: V_{PC} = 1.5 мл; T = 308 K; pH 4.6 (0.1 M цитр. буфер), $[E]_0$ = 150 мг/л; $[S]_0$ = 6.0 мМ; Остановка реакции: 1.5 мл этанола.
Введение по 2 мкл 1.0 мМ аскорбиновой кислоты (стрелками указано время введения).

Лакказное окисление фенола исследовали спектрофотометрически в широком концентрационном диапазоне, используя для расчета концентрации коэффициент экстинкции по максимальному поглощению. Учитывая допущения, сделанные при его расчете, вычисляемые константы пригодны для сопоставления кинетических закономерностей со схемой Михаэлиса-Ментен, но не для корректного сравнения с константами уравнения для других субстратов.

Зависимость начальной скорости лакказного окисления фенола по накоплению продукта возрастает, не выходя на насыщение, хотя на ней наблюдается небольшой излом (рис. 6).

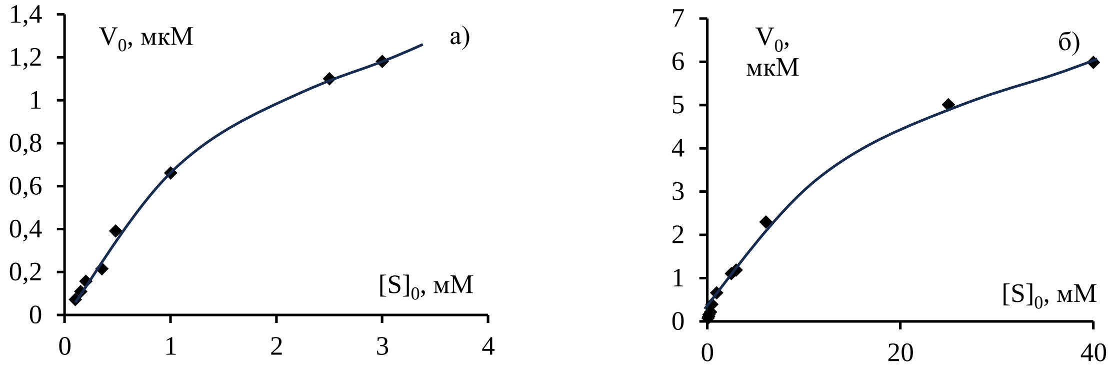

Рис. 6. Зависимость начальной скорости накопления продукта при лакказном окислении фенола от начальной концентрации субстрата. $[E]_0$ = 150 мг/л лакказы, 308 К, 0,1 М цитратный буфер рН 4,6. а), б) – разные диапазоны

В координатах уравнения Лайнуивера-Берка зависимость линейна (рис. 7, а). Из этой прямой формально возможно определение параметров ферментативной кинетики. Построенная на их основе модельная кривая в координатах уравнения Михаэлиса-Ментен не совпадает с экспериментальной зависимостью (рис. 7, б). При преобразовании кинетических данных в координатах уравнений Иди-Хофсти и Хейнса, также используемых для вычисления параметров уравнения Михаэлиса-Ментен, линеаризация вовсе не происходит (рис. 7, в, г), определение K_m и V_{max} этими способами невозможно даже формально и эта кинетическая схема не описывает наблюдаемую кинетику процесса.

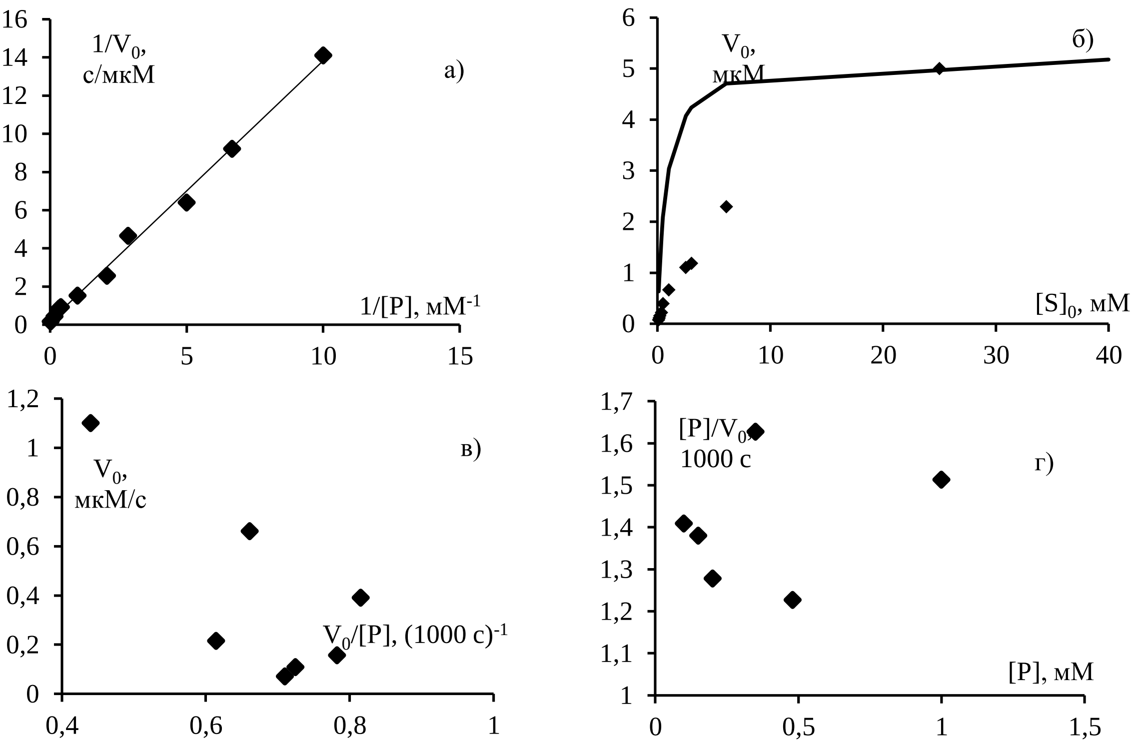

Рис. 7. Зависимость начальной скорости накопления продукта при лакказном окислении фенола от начальной концентрации субстрата. $[E]_0$ = 150 мг/л лакказы, 308 К, 0,1 М цитратный буфер рН 4,6 а) в координатах Лайнуивера-Берка; б) график уравнения Михаэлиса-Ментен, точки – экспериментальные, кривая – моделирование на основании констант, определенных из уравнения Лайнуивера-Берка; в) в координатах Иди-Хофсти; г) в координатах Хейнса

Выводы. При лакказном окислении фенола полоса поглощения субстрата для наблюдения недоступна, наблюдается образование продукта коричневого цвета с λ_{max} = 400 нм, не характерного для процесса автоокисления. Вероятно, конечным продуктом окисления является полимер, частично растворимый в спирте и ДМСО. Продукт начальных этапов превращения экстрагируется из реакционной смеси хлороформом, восстанавливается аскорбиновой кислотой в водной и органической средах и вероятно имеет хиноидную природу. Кинетика лакказного окисления фенола, наблюдаемая по накоплению продукта спектрофотометрически, не описывается уравнением Михаэлиса-Ментен.

Работа выполнена в рамках темы государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (номер госрегистрации 124012400355-7).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Laccases as green and versatile biocatalysts: from lab to enzyme market – an overview / T. Brugnari, D.M. Braga, C.S.A. dos Santos et al. // Bioresour. Bioprocess. – 2021. – V. 8, Is. 131. – P. 1-29. – DOI: 10.1186/s40643-021-00484-1.
2. Recent Advancements in Biotechnological Applications of Laccase as a Multifunctional Enzyme / S. Chaudhary, A. Singh, A. Varma et al. // J Pure Appl Microbiol. – 2022. – Vol. 16, Is. 3. – P. 1479-1491. – DOI: 10.22207/JPAM.16.3.72
3. Алиева, А. П. Композиционные материалы на основе фенолформальдегидных смол / А. П. Алиева // Промышленное производство и использование эластомеров. – 2021. – № 1. – С. 34-43. – DOI: 10.24412/2071-8268-2021-1-34-43. – EDN: BYQTGS.
4. Rasheedy, Sh. K. Medical use of Phenol / Sh. K. Rasheedy // International Journal of Current Science Research and Review. – 2022. – Vol. 5, Is. 3. – P. 711-718.
5. Танеева, А. В. Особенности газо-хроматографического метода контроля содержания фенолов в водной среде / А. В. Танеева, А. В. Дмитриева, В. Ф. Новиков // Известия высших учебных заведений. Проблемы энергетики. – 2023. – Т. 25, № 2. – С. 153-164. – DOI: 10.30724/1998-9903-2023-25-2-153-164. – EDN: RSEOJG.
6. Бутенко, Э. О. Экологическая ситуация промышленных регионов Донбасса и Приазовья / Э. О. Бутенко, А. Е. Капустин // Восточно-Европейский журнал передовых технологий. – 2010. – Т. 5, № 6(47). – С. 50-55. – EDN: TLMSYF.
7. Peroxidases from grass clippings for the removal of phenolic compounds from wastewater / A. Langsdorf, M. Volkmar, R. Ulber et al. // Bioresource Technology Reports. – 2023. – Vol. 22. – P. 101471. – DOI: 10.1016/j.biteb.2023.101471.
8. Enzymatic polymerization of phenol catalyzed by horseradish peroxidase in aqueous micelle system / L. Zhang L., W. Zhao, Zh. Ma et al. // European Polymer Journal. – 2012. – Vol. 48, No. 3. – P. 580-585. – DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2011.12.011.
9. Автоокисление фенольных антиоксидантов в водных средах: монография / А. Н. Шендрик, И. Д. Одарюк, Л. В. Каниболоцкая [и др.]. – Донецк: ДонНУ, 2013. – 147 с.
10. Pavitt, A. S. Oxidation potentials of phenols and anilines: correlation analysis of electrochemical and theoretical values / A. S. Pavitt, E. J. Bylaska, P. G. Tratnyek // Environmental Science: Processes & Impacts. – 2017. – Vol. 19, No. 3. – C. 339-349.
11. "Голубые" лакказы (обзор) / О. В. Морозова, Г. П. Шумакович, М. А. Горбачева [и др.] // Биохимия. – 2007. – Т. 72, № 10. – С. 1396-1412. – EDN: ICDBLJ.
12. Laccase Engineering: Redox Potential Is Not the Only Activity-Determining Feature in the Metalloproteins / M. Ali, P. Bhardwaj, H.M. Ishqi et al. // Molecules. – 2023. – Vol. 28. – No. 17. – P. 6209. – DOI: 10.3390/molecules28176209.
13. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс; Пер. с англ. В. Л. Друцы, О. Н. Королевой. – Москва : Мир, 1991. – 543 с. – ISBN 5-03-001032-7.
14. Rangelov, S. Modelling the transient kinetics of laccase-catalyzed oxidation of four aqueous phenolic substrates at low concentrations / S. Rangelov, J. A. Nicell // Biochemical Engineering Journal. – 2018. – Vol. 132. – P. 233-243. – DOI : 10.1016/j.bej.2018.01.016.
15. Окисление фенола ковалентно иммобилизованной пероксидазой хрена / И. И. Романовская, О. В. Осейчук, С. С. Декина [и др.] // Биотехнология. – 2011. – Т. 4, № 6. – С. 031-035. – EDN: PWJOFT.

16. Reihmann, M. Synthesis of phenol polymers using peroxidases / M. Reihmann, H. Ritter // Enzyme-Catalyzed Synthesis of Polymers. – 2006. – P. 1-49. – DOI: 10.1007/12_034.
17. Saito, K. Green synthesis of soluble polyphenol: oxidative polymerization of phenol in water / K. Saito, G. Sun, H. Nishide // Green Chemistry Letters and Reviews. – 2007. – Vol. 1, No. 1. – P. 47-51. – DOI: 10.1080/17518250701756975.
18. A poly (3, 4-ethylenedioxythiophene)-poly (styrene sulphonate) composite electrode coating in the electrooxidation of phenol / M. A. Heras, S. Lupu, L. Pigani et al. // Electrochimica Acta. – 2005. – Vol. 50, No. 7-8. – P. 1685-1691. – DOI: 10.1016/j.electacta.2004.10.029.
19. Redox cycling of quinones reduced by ascorbic acid / D. Njus, K. Asmaro, G. Li et al. // Chemico-Biological Interactions. – 2023. – Vol. 373. – P. 110397. – DOI: 10.1016/j.cbi.2023.110397.
20. Isaacs, N. S., A mechanistic study of the reduction of quinones by ascorbic acid / N. S. Isaacs, van R. Eldik // Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2. – 1997. – No. 8. – P. 1465-1468.
21. Кравченко, Е. М. Экспериментальные и вычислительные методы определения коэффициентов экстинкции хинонов / Е. М. Кравченко, В. С. Дорошкевич // Вестник Донецкого национального университета. Серия А: Естественные науки. – 2024. – № 4. – С. 44-51. – DOI: 10.5281/zenodo.14289066. – EDN: OBGYHS.

Поступила в редакцию 03.02.2025 г.

SPECTROPHOTOMETRIC STUDY THE LACCASE OXIDATION OF PHENOL

E. M. Kravchenko, O. V. Makurina, I. D. Odaryuk, V. S. Doroshkevich

The kinetics the laccase oxidation of phenol in a wide range of initial substrate concentrations was studied using the spectrophotometric method for product accumulation. The resulting product is not typical for phenol autoxidation; the rates of phenol autoxidation in aqueous media at different pH values are very low. One of the intermediate oxidation products is a quinoid substance, and at deep stages of conversion, a polymeric product is probably formed and precipitated. The kinetics of the enzymatic process, observed by product accumulation, is not described by the Michaelis-Menten equation.

***Keywords**:* phenol, laccase, autoxidation, spectrophotometry, oxidation.

Кравченко Елена Михайловна
младший научный сотрудник кафедры биохимии и органической химии ФГБОУ ВО «Донецкий государственный университет», г. Донецк, ДНР, РФ.
E-mail: elena_grazhina@mail.ru
ORCID: 0009-0008-9153-9701
AuthorID: 970740

Kravchenko Elena Michailovna
Junior researcher the Department of Biochemistry and Organic Chemistry, Donetsk State University, Donetsk, DPR, RF.

Макурина Ольга Владимировна
лаборант молодежной лаборатории по исследованию реакционной способности органических соединений, магистрант, ФГБОУ ВО «Донецкий государственный университет», г. Донецк, ДНР, РФ.
E-mail: olya.makurina.03@mail.ru

Makurina Olga Vladimirovna
Laboratory assistant of the youth scientific laboratory for the study of the reactivity of organic compounds, Master's Degree student, Donetsk State University, Donetsk, DPR, RF.

Одарюк Иван Дмитриевич
кандидат химических наук;
доцент кафедры биохимии и органической химии ФГБОУ ВО «Донецкий государственный университет», г. Донецк, ДНР, РФ.
E-mail: odaryuk.iv@gmail.com

Odaryuk Ivan Dmitrievich
Candidate of Chemical Sciences;
Docent of the Department of Biochemistry and Organic Chemistry, Donetsk State University, Donetsk, DPR, RF.

Дорошкевич Виктор Сергеевич
старший преподаватель кафедры биохимии и органической химии ФГБОУ ВО «Донецкий государственный университет», г. Донецк, ДНР, РФ.
E-mail: v.s.doroshkevich@mail.ru
ORCID: 0000-0001-6566-8747
AuthorID: 653571

Doroshkevich Viktor Sergeevich
Senior Lecturer, Department of Biochemistry and Organic Chemistry, Donetsk State University, Donetsk, DPR, RF.