

ЕФЕКТИВНІСТЬ ЛАККАЗО-МЕДІАТОРНИХ СИСТЕМ У ПРОЦЕСАХ ОКСИДАТИВНОЇ ДЕГРАДАЦІЇ ЕКОПОЛЛЮТАНТІВ

Куш О. В.^{1,2}, Гордєєва І. О.², Зосенко О. О.², Старкова Г. М.²,
Цяпало О. С.², Шендрик О. М.²

¹Інститут фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка НАН України, відділ спектроскопічних досліджень, м. Київ, Україна, e-mail: o.kusch@gmail.com

²Донецький національний університет ім. Василя Стуса, факультет хімії, біології і біотехнологій, м. Вінниця, Україна, e-mail: i.hordieeva@donnu.edu.ua; o.zosenko@donnu.edu.ua; h.starkova@donnu.edu.ua; a.tsypalo@donnu.edu.ua; o.shendrik@donnu.edu.ua

Досліджено бікаталітичні ферментно-медіаторні системи на основі лаккази *Trametes versicolor* та НОН-сполук (віолурова кислота, 1-гідроксибензотріазол, арилзаміщені *N*-гідроксифталіміди) у радикально-ланцюгових процесах оксидативної деградації екополлютантів. Поєднання ферментативного та органічного каталізу приводить до сильного синергетичного ефекту і дозволяє окиснювати складні органічні сполуки, стійкі до фізичної, хімічної та біологічної деградації. Лакказо-медіаторні системи були протестовані в процесах окиснення синтетичних барвників різної структури – індігоїдних, антрахінонових, трифенілметанових, азобарвників, а також антибіотиків тетрациклінової групи. Для оптимізації процесів вивчали субстратну специфічність лаккази, а також вплив різних чинників на активність каталітичної системи: температури, рН, концентрації складових каталітичної системи, часу інкубації. Кінетичні параметри процесів окиснення визначали із залежностей Міхаеліса-Ментен. Встановлено, що ефективність медіаторів у процесах лакказо-каталізуємого окиснення збільшується в ряді: 4-Cl-*N*-гідроксифталімід < *N*-гідроксифталімід < 4-CH₃O-*N*-гідроксифталімід < 1-гідроксибензотріазол < віолурова кислота. Показано, що досліджені лакказо-медіаторні системи можуть використовуватись багаторазово у циклічному режимі, що свідчить про їх високу ефективність.

Ключові слова: лакказа *Trametes versicolor*, НОН-сполуки, медіатори, оксидативна деградація, барвники, антибіотики.

THE EFFICIENCY OF LACCASE-MEDIATOR SYSTEMS IN THE OXIDATIVE DEGRADATION PROCESSES OF ECO POLLUTANTS

Kushch O. V.^{1,2}, Hordieieva I. O.², Zosenko O. O.², Starkova H. M.²,
Tsyapalo O. S.², Shendrik A. N.²

¹LM Litvinenko Institute of Physical-Organic Chemistry and Coal Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, Department of spectrochemical studies, Kyiv, Ukraine, e-mail: o.kusch@gmail.com

²Vasyl' Stus Donetsk National University, Faculty of Chemistry, Biology and Biotechnologies, Vinnytsia, Ukraine, e-mail: i.hordieeva@donnu.edu.ua; o.zosenko@donnu.edu.ua; h.starkova@donnu.edu.ua; a.tsyapalo@donnu.edu.ua; o.shendrik@donnu.edu.ua

Bicatalytic enzyme-mediator systems based on laccase *Trametes versicolor* and NOH-compounds (violic acid, 1-hydroxybenzotriazole, aryl-substituted *N*-hydroxyphthalimides) in radical-chain processes of oxidative degradation of ecopollutants have been studied. The combination of enzymatic and organic catalysis leads to a strong synergistic effect and allows the oxidation of complex organic compounds that are resistant to physical, chemical, and biological degradation. The laccase-mediator systems were tested in the oxidation of synthetic dyes of various structures – indigo, anthraquinone, triphenylmethane, azo dyes, as well as antibiotics of the tetracycline group. To optimize the processes, the substrate specificity of the laccase was studied, as well as the influence of various factors on the catalytic system activity: temperature, pH, concentration of the catalytic system components, and incubation time. The kinetic parameters of oxidative processes were determined from the Michaelis-Menten dependences. It was found that the efficiency of mediators in the oxidation processes catalyzed by laccase increases in the following series: 4-Cl-*N*-hydroxyphthalimide < *N*-hydroxyphthalimide < 4-CH₃O-*N*-hydroxyphthalimide < 1-hydroxybenzotriazole < violic acid. The possibility of multiple use of the studied laccase-mediator systems in a cyclic mode is shown, which indicates their high efficiency.

Keywords: laccase *Trametes versicolor*, NOH-compounds, mediators, oxidative degradation, dyes, antibiotics.

Забруднення водою промисловими і комунальними відходами є важливою екологічною проблемою у всьому світі. На сьогодні згідно даним ВООЗ і ЮНІСЕФ близько 800 мільйонів людей не мають доступу до чистої

води [1]. У той же час глобальне потепління і зростання населення буде поступово збільшувати потребу в прісній воді і проблема її дефіциту стане однією з найгостріших до середини XXI століття [2]. Для України забруднення водою пестицидами, гербіцидами, барвниками, детергентами, антибіотиками, мікропластиком, радіоактивними відходами є особливо тривожною проблемою. Продовження цієї тенденції може мати катастрофічні наслідки для людей і навколишнього середовища.

Очистка стічних вод від стійких органічних поллютантів (СОП) є «гарячою» темою наукових досліджень в останні десятиліття [3]. СОП – це складні хімічні речовини, стійкі до фотохімічної, хімічної та біохімічної деградації з високим часом напіврозпаду в навколишньому середовищі. На сьогодні до групи СОП відносять стероїди і гормони, фармацевтичні препарати та засоби особистої гігієни, антисептики, поверхнево-активні речовини, барвники, консерванти, пестициди і т. д [4]. Через COVID-19 список стійких органічних забруднювачів, ймовірно, буде зростати внаслідок широкого застосування дезінфікуючих засобів та фармпрепаратів. Лікування пацієнтів з пошкодженими COVID-19 легеньми з використанням одночасно декількох видів антибіотиків, у тому числі «резервних», і накопичення їх у водоймах є небезпечним для екосистем і здоров'я людей.

Для видалення СОП і усунення їх токсичного впливу на живі організми, розроблено широкий спектр фізико-хімічних методів. Особлива увага приділяється зеленим біокаталітичним методам з використанням ферментів оксидоредуктаз. Лаккази (бензолдіол: кисень-оксидоредуктаза, КФ 1.10.3.2) – мідьвміщуючі ферменти, які називають «зеленими каталізаторами» завдяки високій ефективності при окисненні органічних сполук молекулярним киснем, при відновленні останнього до води [5]. Це робить їх привабливими для процесів органічного синтезу та біоремедіації, у тому числі для очищення стічних вод від екополлютантів [6] шляхом їх окисної деградації. Для досліджень нами було обрано лакказу *Trametes*

versicolor (*T. versicolor*), яка є ефективним біокаталізатором з високим редокс-потенціалом (E°) ($T1\ Cu\ E^\circ \sim 800\ V$) [7] і широкою субстратною специфічністю. Ці властивості зробили лакказу *T. versicolor* одним з найбільш поширених інструментів у сучасних біотехнологіях для руйнування ксенобіотиків, трансформації продуктів розкладання лігніну, делігніфікації і відбілювання целюлози, знебарвлення барвників у стоках текстильного виробництва, деградації фармпрепаратів, а також в органічному синтезі [8].

Для підвищення ефективності каталітичної дії ферменту при окисненні органічних сполук з високим окисно-відновним потенціалом використовують медіатори, які діють як проміжні субстрати лаккази, значно збільшують швидкість процесу окиснення і розширюють спектр сполук, здатних окиснюватись ферментом [9]. Найбільш ефективними медіаторами лакказо-каталізуємого окиснення є сполуки з NOH-фрагментом [10], такі як гідроксиламіни, оксими. Посередники під дією лаккази *in situ* утворюють активні *N*-оксильні радикали, які окислюють органічні сполуки в неферментативному процесі. NOH-сполуки є добре відомими органічними каталізаторами аеробного окиснення широкого кола органічних молекул [11-13]. Об'єднання ферментативного і органічного каталізу приводить до сильного синергетичного ефекту, однак пов'язане з певними труднощами через несумісність цих двох типів каталізу. Обмежуючими факторами для широкого практичного застосування лакказо-медіаторних систем (ЛМС) є гідрофобність медіаторів, низька стабільність відновленої і окисленої форм [14], інактивація ферментів нітроксильними радикалами, висока вартість, токсичність. Тому пошук ефективних медіаторів є складною і важливою задачею.

Мета дослідження: вивчення ефективності комбінованих біокаталітичних систем лакказа – NOH-сполуки – кисень повітря; оптимізація процесів окисдатовної деградації екополлютантів за участі досліджуваних ЛМС.

Матеріали і методи дослідження.

Лакказу *T. versicolor*, NOH-сполуки, барвники і антибіотики фірми «Fluka» і «Sigma-Aldrich» використовували без додаткової очистки.

Деколоризацію барвників і оксидативну деградацію антибіотиків контролювали за методом УФ-видимої спектроскопії з використанням UV-Vis спектрофотометра Analytic Jena SPECORD 50. Кожна реакційна суміш містила лакказу, субстрат та медіатор у цитратно-фосфатному буфері при оптимальному рН для кожного субстрату за температури 35 °С у кварцових односантиметрових кюветах об'ємом 3,0 мл. Контрольні зразки досліджували паралельно без лаккази. Ступінь конверсії субстратів визначали як $[(A_0 - A_t)/A_0] \times 100$, де A_0 - початкова абсорбція розчину, A_t – в момент часу t .

Кінетичні дослідження проводили за допомогою методів УФ-спектроскопії та амперометричної киснеметрії. Розходження кисню реєстрували з використанням термооксиметра «Експерт-001», обладнаного електродом Кларка.

Результати дослідження.

З метою визначення найбільш ефективних медіаторів для бікаталітичних систем нами були досліджені NOH-сполуки різної структури (рис.1) – 1-гідроксибензотріазол (1-НВТ), віолурова кислота (VA), арилзаміщені *N*-гідроксифталіміди (NHPI). Медіатори тестували в процесах оксидативної деградації синтетичних барвників, а також найбільш поширених антибіотиків тетрациклінового ряду – тетрацикліну (ТЦ) і окситетрацикліну.

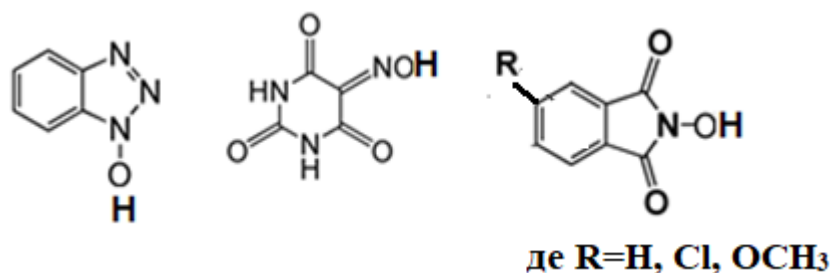


Рисунок.1. Структури досліджених редокс-медіаторів лаккази.

Скринінг ефективних медіаторів проводили за різних комбінацій фермент-медіатор-субстрат. Для оптимізації процесів вивчали вплив температури, рН, концентрації складових каталітичної системи, часу інкубації [15]. В умовах експерименту безпосередньо лакказою більшість досліджених субстратів не окиснюється, тобто вони не є прямими субстратами лаккази, але в присутності медіаторів процес розкладання протікає практично кількісно.

Деколонізацію барвників і окислативну деградацію антибіотиків контролювали за допомогою УФ-спектроскопії. Як приклад, УФ-видимі спектри барвників індигокарміну (ІК), азобарвника метилового помаранчового (МП) та їх оксидатів після обробки ЛМС у цитратно-фосфатному буфері при рН = 4.5 представлено на рисунку 2. Деколонізація розчинів барвників у присутності тільки лаккази *T. Versicolor* або тільки НОН-медіаторів не спостерігалася. Після додавання суміші лаккази і медіатора VA відбувається знебарвлення розчину МП і зникнення смуги поглинання з $\lambda_{\max} = 467$ нм через 49 хв (рис. 2, криві 1 і 3), при додаванні системи лаккази- ННPI спостерігається знебарвлення розчину ІК ($\lambda_{\max} = 614$ нм) через 310 хв (рис. 2, криві 2 і 4)).

В умовах ферментативного окиснення початковий рН розчину є одним з найбільш значущих параметрів, що впливають на ефективність розкладання забруднюючих речовин. Тому швидкість окиснення субстратів у присутності системи лаккази *T. versicolor* – НОН-медіатори була вивчені як функція рН. Криві мають типовий дзвіноподібний профіль. Оптимальні значення рН в значній мірі залежать від природи медіатору і субстрату і для досліджуваних систем лежать в області 4.0-6.0 одиниць.

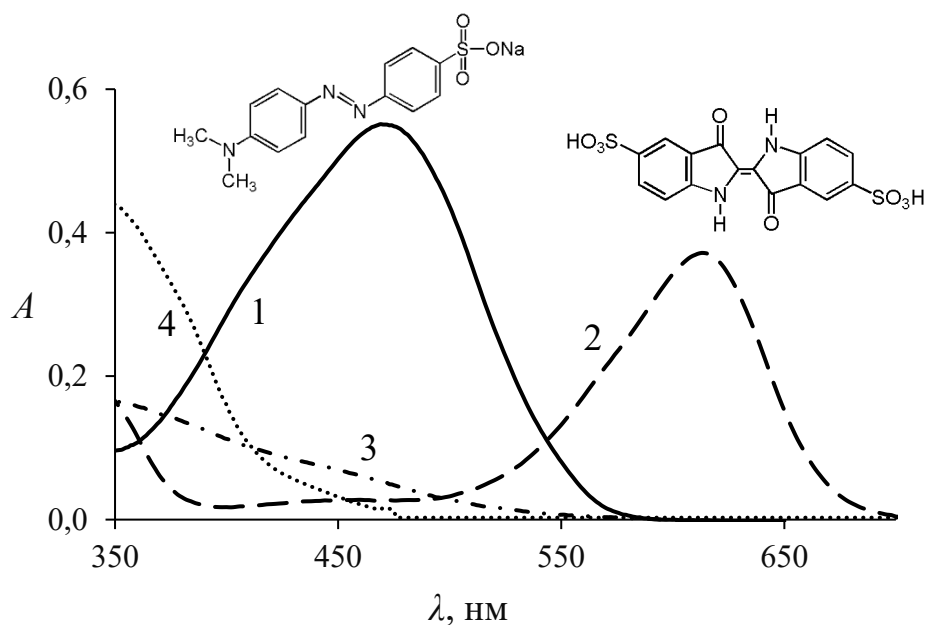


Рисунок. 2. УФ-спектри МП (1) та ІК (2) до і після обробки сумішшю лаккази і ВА (3) та лаккази і NHPI (4) відповідно. $t = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 4.5$. $[\text{MP}]_0 = 2.0 \cdot 10^{-5}\text{ M}$, $[\text{IK}]_0 = 2.0 \cdot 10^{-5}\text{ M}$, $[\text{VA}]_0 = 2,4 \cdot 10^{-4}\text{ M}$, $[\text{NHPI}]_0 = 2.4 \cdot 10^{-4}\text{ M}$, $[\text{T. versicolor}]_0 = 124\text{ мкг/мл}$.

Детально було досліджено кінетику процесів окиснення барвників різної структури і антибіотиків тетрациклінового ряду в присутності ЛМС. У всіх випадках залежність початкових швидкостей ферментативного окиснення субстратів від концентрації медіатору добре описується класичним рівнянням Міхаеліса-Ментен. Криві насичення були отримані для усіх медіаторів. Графік Лайнуівера-Берка у подвійних обернених координатах використовували для визначення кінетичних параметрів: констант Міхаеліса K_m та максимальних швидкостей V_{max} . Отримані значення є типовими для ферментативних реакцій. Кінетичні дані свідчать про те, що всі досліджені медіатори залучаються у процес як субстрати лаккази. Для прикладу на рисунку 3 показано залежність початкових швидкостей ферментативного окиснення ТЦ від концентрації медіатору 1-НВТ, а також графік Лайнуівера-Берка.

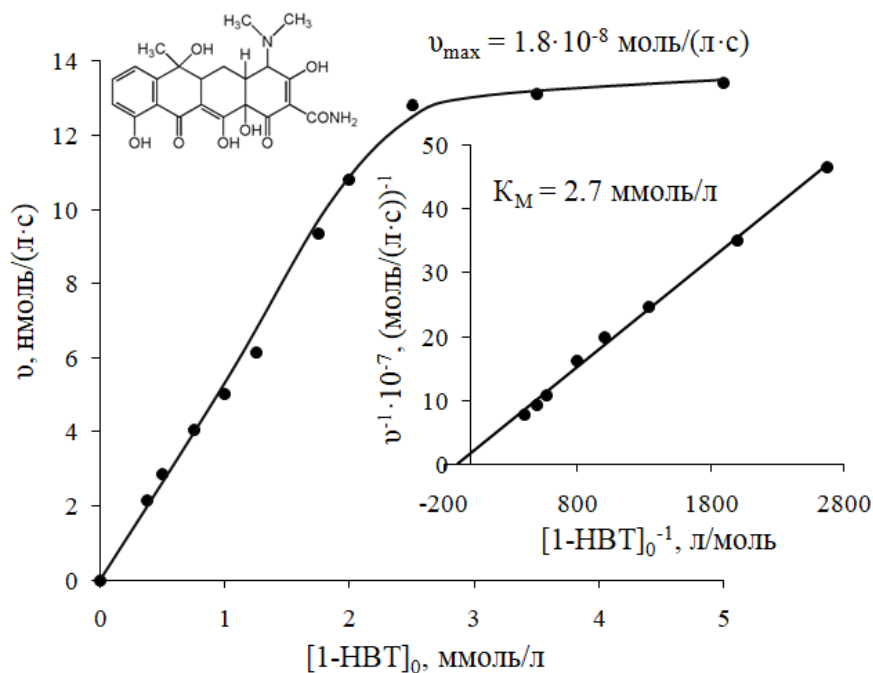


Рисунок. 3. Залежність швидкості окиснення тетрацикліну від початкової концентрації 1-НВТ медіатора і графік Лайнуівера-Берка. $t = 35\text{ }^\circ\text{C}$, $[\text{ТЦ}]_0 = 2,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $[1\text{-НВТ}]_0 = 0.5 \div 5$ ммоль/л, $[T. \text{versicolor}]_0 = 124$ мкг/мл, рН 4.5.

Для оцінки стійкості і ефективності ЛМС при тривалому їх використанні, кінетичні параметри процесу окиснення субстратів були виміряні в режимі послідовного чергування циклів. Показано, що ЛМС можуть використовуватись багаторазово для очищення стічних вод. На рисунку 4 наведено дані, які отримано при повторному додаванні однакової вихідної концентрації барвника ІК. Видно, що досліджувана система зберігає свою каталітичну активність на протязі тривалого часу. Це зменшує витрати на регенерацію і підтримку в робочому стані каталітичної системи і свідчить про її високу ефективність в окисдатовному процесі.

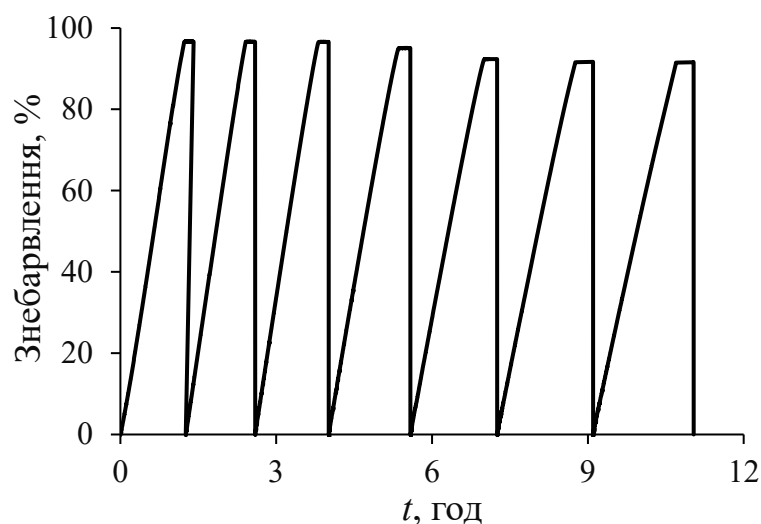


Рисунок. 4. Кінетика деколоризації ІК в циклічному режимі в присутності ЛМС лакказа – 1-НВТ. $[1\text{-НВТ}]_0 = 2.4 \cdot 10^{-4}$ М, $[T. \textit{versicolor}]_0 = 124$ мкг/мл, $[ІК]_0 = 2.0 \cdot 10^{-5}$ М; рН 4.5, $t = 35$ °С.

Каталіз процесу окиснення лакказою *T. versicolor* може протікати за двома принципово різними механізмами. Перший – класичний механізм ферментативного каталізу, тобто пряме ферментативне окиснення субстрату киснем безпосередньо в фермент-субстратному комплексі. Другий – непрямий опосередкований механізм за участі медіатора окиснення, представлений на рисунку 5. У цьому випадку медіатори, які виконують роль проміжного субстрату лаккази, окиснюються ферментом за механізмом протон-спряженого переносу електрона (РСЕТ) і перетворюються у високореакційні радикали. Далі, вони дифундують у реакційний об’єм і швидко реагують із різними органічними сполуками, які не є прямими субстратами ферменту через високий окисно-відновний потенціал або стеричні перешкоди. Сумарним результатом такої послідовності реакцій є опосередкований протон-спряжений перенос електронів медіатором від субстрату окиснення (поллютанта) на кисень у потрібному фермент-медіатор-молекулярний кисень комплексі. Відновлення радикалів медіатора до молекулярної форми відбувається за

реакцією відриву атома водню (НАТ) або за механізмом PCET в залежності від структури субстрату і рН середовища.

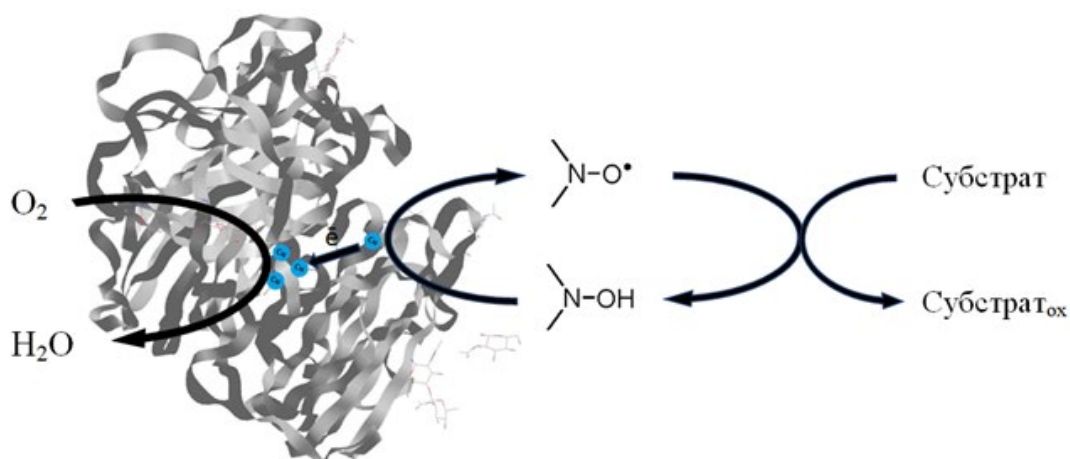


Рисунок. 5. Механізм дії лакказо-медіаторної системи.

Квазістаціонарність концентрацій спінових центрів забезпечується реакціями їх загибелі в паралельному процесі перетворення субстрату. Спостережуваний загальний нульовий порядок реакції за субстратом свідчить про те, що сумарна швидкість процесу окиснення сполук лімітується першою стадією генерування радикалів, а окиснення субстратів є подальшою швидкою стадією. Можна заключити, що ефективний медіатор повинен бути прийнятним субстратом для ферменту, не мати стеричних перешкод для взаємодії з активним сайтом лаккази, легко утворювати при окисненні ензимом активні радикали, витримувати якнайбільшу кількість каталітичних циклів, бути нетоксичним і не інактивувати фермент. Стабільність радикалів сприяє збільшенню їх квазістаціонарних концентрацій в системі, оборотності редокс-пари медіатор/радикал $>N-OH/>N-O^{\bullet}$ і підвищенню кількості каталітичних циклів у радикальному неферментативному циклі. Ефективність медіаторів у процесах лакказо-каталізованого окиснення збільшується в ряді: 4-Cl-NHPI < NHPI < 4-CH₃O-NHPI < 1-NBT < VA. Арилзаміщені *N*-гідроксифталіміди є гідрофобними сполуками, мають невисоку оборотність внаслідок

нестабільності самого медіатора і його радикала у водному середовищі, тому проявляють невисоку ефективність у процесах окиснення екополлютантів порівняно з VA і VTNO.

Висновки.

Комплексна очистка стічних вод від антропогенного забруднення з використанням біокаталізаторів є перспективною технологією для забезпечення глобальної водної безпеки у майбутньому. Лаккази мають великий потенціал для комплексної деградації екополлютантів у стічних водах і окиснюють широкий спектр субстратів з використанням молекулярного кисню як кінцевого акцептора. Отримані результати свідчать про те, що більшість досліджених субстратів не є прямими субстратами лаккази *T. versicolor*, але використання медіаторів у складі каталітичної системи дозволяє ефективно окиснювати складні органічні сполуки, такі як синтетичні барвники різної структури, антибіотики тетрациклінового ряду.

Робота виконана на базі спільної навчально-наукової лабораторії з дослідження радикальних реакцій Інституту фізико-органічної хімії і вуглекімії імені Л.М. Литвиненка НАН України та Донецького національного університету імені Василя Стуса.

Список літератури.

1. UN-Water. World Water Development Report 2018: Nature-based Solutions for Water, 2018, Geneva, Switzerland.
2. Boretti A. Reassessing the projections of the world water development report / A. Boretti, L. Rosa // NPJ Clean Water. – 2019. – Vol. 2, №1. – P. 1-6.
3. Bilal M. Emerging contaminants of high concern and their enzyme-assisted biodegradation – a review / M. Bilal, M. Adeel, T. Rasheed, Y. Zhao, H. M. Iqbal // Environment international. – 2019. – №124. – P. 336-353.

4. Rasheed T. Environmentally-related contaminants of high concern: potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment / T. Rasheed, M. Bilal, F. Nabeel, M. Adeel, H. M. Iqbal // Environment international. – 2019. – №122. – P. 52-66.
5. Arregui L. Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation / L. Arregui, M. Ayala, X. Gómez-Gil, G. Gutiérrez-Soto, C. E. Hernández-Luna, M. H. de los Santos, M. A. Trujillo-Roldán // Microbial cell factories. – 2019. – Vol. 18, №1. – P. 200-233.
6. Patel A. Fungal laccases: versatile green catalyst for bioremediation of organopollutants / A. Patel, V. Patel, R. Patel, U. Trivedi, K. Patel // In Emerging Technologies in Environmental Bioremediation. – 2020. – P. 85-129.
7. Piontek K. Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers / K. Piontek, M. Antorini, T. Choinowski // Journal of Biological Chemistry. – 2002. – Vol. 277. – – №40. – P. 37663-37669.
8. Canfora L. Oxidative transformation of natural and synthetic phenolic mixtures by *Trametes versicolor* laccase / L. Canfora, G. Iamarino, M. A. Rao, L. Gianfreda // Journal of agricultural and food chemistry. – 2008. – Vol. 56, №4. – P. 1398-1407.
9. Xu F. Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of *N*-hydroxy compounds / F. Xu, J. J. Kulys, K. Duke, K. Li, K. Krikstopaitis, H. J. W. Deussen, P. Schneider // Applied and environmental microbiology. – 2000. – Vol. 66, №5. – P. 2052-2056.
10. Xu F. Enzymatic and electrochemical oxidation of *N*-hydroxy compounds: Redox potential, electron-transfer kinetics, and radical stability / F. Xu, H. J. W. Deussen, B. Lopez, L. Lam, K. Li // European Journal of Biochemistry. – 2001. – Vol. 268, №15. – P. 4169-4176.
11. Opeida I. A. The Role of *N*-hydroxyphthalimide in the oxidation reactions of alkylarenes with molecular oxygen / I. A. Opeida, M. A. Kompanets,

- O. V. Kushch, E. G. Yastrebova // *Petroleum Chemistry*. – 2009. – Vol. 49, №5. – P. 389-392.
12. Kushch O. V. Effect of the structure of *N*-hydroxyphthalimides on their catalytic activity in the oxidation of isopropylbenzene in the presence of cuprous salts / O. V. Kushch // *Theoretical and Experimental Chemistry*. – 2012. – Vol. 48, №4. – P. 252-257.
13. Опейда Й.А. Комплексы *N*-гидроксифталимида и ацетата кобальта (II) в реакциях окисления алкиларенов молекулярным кислородом / Й. А. Опейда, А. Л. Плехов, О. В. Куш, А. Г. Матвиенко // *Журнал физической химии*. – 2011. – Т. 85, №7. – С. 1223-1228.
14. Kushch O. V. Kinetics of *N*-oxyl radicals' decay / O. V. Kushch, I. O. Hordieieva, K. V. Novikova, Y. E. Litvinov, M. O. Kompanets, A. N. Shendrik, I. A. Opeida // *The Journal of Organic Chemistry*. – 2020. – Vol. 85, №11. – P. 7112-7124.
15. Kushch O. V. Comparison of *N*-hydroxy compounds as mediators in laccase-catalysed decolorization of indigo carmine / O. V. Kushch, I. O. Hordieieva, O. O. Zosenko, A. N. Shendrik // *ChemistrySelect*. – 2019. – №4. – P. 3905-3913.