

## МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭЛЕКТРОННЫХ СПЕКТРОВ ПОГЛОЩЕНИЯ ФЕНОЛОВ И ПРОДУКТОВ ИХ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ОКИСЛЕНИЯ

Лаптева Е.А., Кравченко Е.М., Одарюк И.Д., Дорошкевич В.С., Баранова О.В.

Донецкий государственный университет

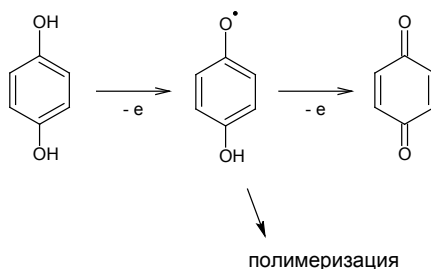
ул. Университетская, 24, г. Донецк, 283001, ДНР, РФ; e-mail: elen.kravchenko@donnu.ru

Поступила в редакцию 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0623

**Аннотация.** Рассмотрена возможность получения спектров поглощения фенолов и продуктов их лакказного окисления методами квантово-химического моделирования. Первичную оптимизацию структур проводили полуэмпирическим методом PM3, а моделирование спектров - в рамках теории функционала плотности методом DFT/B3LYP/6-311G++dp в водной среде в программе Gamess US. Для большинства исследованных фенолов и соответствующих им хинонов расчетными методами получены спектры, содержащие одну полосу поглощения, для некоторых - большее число полос, в то время как в экспериментальных спектрах поглощения этих веществ в диапазоне работы спектрофотометра, как правило, с разной достоверностью видны две полосы. Для большинства веществ длины волн максимумов поглощения расчетных спектров отличаются от экспериментальных не более чем на 10 нм. Расчетные коэффициенты экстинкции, как правило, превышают экспериментальные в 1,5-2 раза. Для фенолов, которые не могут быть непосредственно окислены до хинонов, в качестве продуктов рассмотрены олигомерные продукты. Их расчетные спектры также достаточно хорошо соотносятся с экспериментальным спектром реакционной смеси. Спектральные характеристики, полученные моделированием в указанных условиях, можно использовать для примерной оценки состава реакционной смеси, но для их использования в точном количественном анализе и кинетических исследованиях необходимы дополнительные исследования.

**Ключевые слова:** лакказа, фенолы, хиноны, спектрофотометрия, моделирование.

Лакказа катализирует процесс четырехэлектронного восстановления молекулярного кислорода за счет электронов субстрата-восстановителя. При окислении классических субстратов лакказы, двухатомных фенолов, образуется радикальный промежуточный интермедиат, который в дальнейшем либо ферментативно окисляется до хинона [1], если таковой возможен, либо превращается неферментативно в реакциях рекомбинации или полимеризации [2]. Фермент акцептирует по одному электрону и протону от одной гидроксильной группы субстрата, а дальнейшие превращения могут включать ферментативные и неферментативные стадии:



Фенолы и хиноны, как наиболее вероятные продукты лакказного окисления, имеют характерные полосы поглощения в УФ- и видимой областях спектра. Спектрофотометрический анализ широко используется для изучения кинетики этих процессов, однако он оказывается малоинформативным в случае сложных спектров реакционных смесей. Например, при окислении производных гидрохинона можно достоверно наблюдать как расходование субстрата, так и накопление продукта, а при окислении пирогаллола и галловой кислоты спектр реакционной смеси сложный, наблюдается смещение и наложение полос поглощения, вероятно образование различных промежуточных продуктов. Для таких исследований желательнее иметь образцы продуктов окисления или располагать структурными методами анализа. В любом случае, для интерпретации экспериментальных данных и получения кинетических кривых необходимы коэффициенты экстинкции реагентов.

Для вычисления коэффициентов экстинкции пользовались одним из трех следующих способов:

- 1) градуировочный график – коэффициенты экстинкции всех субстратов и *para*-бензохинона, единственного продукта лакказного окисления, который был доступен в виде препарата.
- 2) по величине оптической плотности раствора в конце реакции, когда ее значение почти не меняется, при длине волны, соответствующей продукту, считая превращение полным и концентрацию продукта равной исходной концентрации субстрата. Полученный таким способом коэффициент экстинкции *para*-бензохинона примерно на 15% выше полученного из градуировочного графика;
- 3) по соотношению  $\Delta A/\Delta t$  субстрата и продукта для нескольких временных диапазонов одной кинетической кривой на ее прямолинейном участке. Значение  $\epsilon$ , полученное для *para*-бензохинона, завышено на 40% по сравнению с результатом градуировки.

Таким образом, даже в случае спектральной картины, позволяющей применить косвенные методы определения коэффициента экстинкции продукта, его точность оказывается не слишком высока.

Хиноны, как правило, являются высокорекреационноспособными веществами и достаточно быстро превращаются в неферментативных реакциях, что затрудняет их выделение в неизменном виде. Синтез этих веществ неферментативными методами снова приводит к необходимости выделения и очистки, к тому же нет уверенности, что в других условиях будут получены идентичные продукты. Таким образом, препаративное получение продуктов окисления в рамки исследования не входило.

Целью данной работы было выяснение возможности получения спектров поглощения продуктов окисления фенолов путем квантово-химического моделирования и анализ состава реакционных смесей лакказного окисления на основании спектрофотометрических данных.

**Экспериментальная часть.** Ферментативное окисление фенолов исследовали в присутствии лакказы макромицета *Trametes versicolor* фирмы SIGMA, которую использовали без дополнительной очистки. Субстраты очищали перекристаллизацией из водно-спиртовых растворов или сублимацией. Чистоту указанных реагентов устанавливали по температурам плавления и спектрофотометрически. Цитратный буферный раствор для проведения ферментативного окисления готовили из реагентов надлежащей чистоты по стандартным методикам [3] на бидистиллированной воде.

В работе использовался спектрофотометр SPECORD S300 UV VIS (Германия). Для регистрации сигнала и первичной обработки полученных данных использовали программу WinAspect.

Для получения стандартных спектров субстратов и продуктов применяли квантово-химическое моделирование. Вычисления проводились в рамках теории функционала плотности (DFT) с использованием гибридного функционала B3LYP в программе Gamess US. Исходные структуры фенолов и продуктов их окисления оптимизировали квантово-химическим методом PM3. На уровне B3LYP/6-311+G(d,p) получены электронные спектры поглощения. Расчеты проведены в водной среде в рамках модели IEFPCM.

**Результаты и обсуждение.** Полуэмпирический метод ZINDO, который раньше рекомендовался для моделирования УФ-спектров [4], не позволяет проводить оптимизацию молекулы. Построение спектра на основании энергии в единственной точке дает три полосы поглощения высокой интенсивности ( $\lambda_{\max 1} = 213$  нм,  $\epsilon_1 = 27000$ ;  $\lambda_{\max 2} = 259$  нм,  $\epsilon_2 = 9000$ ;  $\lambda_{\max 3} = 289$  нм,  $\epsilon_3 = 3000$ ). Полоса  $\lambda_{\max 2} = 259$  нм в экспериментальном спектре отсутствует.

Предварительная оптимизация методом PM3 и расчет методом ZINDO позволяют получить две полосы поглощения, также не совпадающие с экспериментальными ( $\lambda_{\max 1} = 270$  нм,  $\epsilon_1 = 10000$ ;  $\lambda_{\max 2} = 302$  нм,  $\epsilon_2 = 4000$ ).

Более перспективна оптимизация молекулы в рамках теории функционала плотности (DFT) методом TD-SCF с использованием гибридного функционала B3LYP [5]. В нашем случае она дает результаты, весьма близкие к экспериментальным ( $\lambda_{\max 1} = 217$  нм,  $\epsilon_1 = 11000$ ;  $\lambda_{\max 2} = 281$  нм,  $\epsilon_2 = 6000$ ), однако оказывается очень затратной по времени и вычислительной мощности – оптимизация и расчет спектра гидрохинона занимает порядка 12 часов, а более сложных молекул – еще большее время.

При использовании метода PM3 для оптимизации и расчете на уровне B3LYP/6-311+G(d,p) электронный спектр поглощения рассчитывается за время не более 1 часа на том же компьютере. Эти спектры содержат, как правило, только одну полосу поглощения, примерно совпадающую с экспериментальной бензоидной полосой поглощения по величине  $\lambda_{\max}$  похожего вида ( $\lambda_{\max} = 287$  нм,  $\epsilon = 3500$ ). Так как первая этиленовая полоса поглощения в большинстве случаев все равно недоступна для достоверного измерения в условиях проведения кинетики, для расчета выбрали именно такой вариант.

Так как на вид спектров поглощения большое влияние оказывает растворитель [6], важно проводить расчет в среде, близкой к экспериментальной. Расчеты были проведены в водной среде в рамках модели IEFPCM.

Все исследованные фенолы имеют 2 полосы поглощения в диапазоне работы спектрофотометра, высокоинтенсивная этиленовая и немного более слабая бензоидная. Условия работы с ферментом не позволяли достоверно наблюдать первую коротковолновую полосу, в большинстве случаев она не видна или сильно искажена. Вторая полоса во многих случаях подходит для спектрофотометрического наблюдения за расходом субстрата в процессе лакказного окисления.

Оптимизация по методу PM3 с дальнейшим расчетом на уровне B3LYP/6-311+G(d,p) позволяет получить для гидрохинона и большинства его производных, пирокатехина и резорцина только одну, по-видимому, бензоидную полосу поглощения. Для 2,5-дихлоргидрохинона и 2,3-дигидроксибензойной кислоты получены 2 полосы поглощения. Для большинства исследованных фенолов наблюдается достаточно хорошее совпадение расчетных длин волн максимумов поглощения с экспериментальными – различие порядка 10 нм. В случае фенолкарбоновых кислот разница намного выше – 50-100 нм, несмотря на учет содержания анионной формы. Возможно, для соединений, содержащих карбоксильные группы, необходимо применять другие расчетные базисы. Расчетные коэффициенты экстинкции в большинстве случаев завышены в 1,5-2 раза (табл. 1).

Таблица 1. Экспериментальные и расчетные спектральные характеристики фенолов

Субстрат	Экспериментальные			Расчетные		
	$\epsilon$	$\lambda_{\max}$ , нм	$\lambda_{1/2}$ , нм	$\epsilon$	$\lambda_{\max}$ , нм	$\lambda_{1/2}$ , нм
Гидрохинон	516	236	12			
	2268	289	27	3500	287	40
2,5-дигидроксибензойная кислота	3658	238	10			
	5165	320	41	5000	429	100
2,3-дицианогидрохинон	5012	237	66			
	5238	346	42	7000	344	62
2,5-дибромгидрохинон	1285	237	12			
	3083	310	28	7000	280	35
2,5-дихлоргидрохинон	940	236	12	4000	230	30
	4132	297	89	6000	284	45
метилгидрохинон	-	-	-			
	2814	288	33	4000	283	45
триметилгидрохинон	-	-	-			
	2549	285	26	4500	287	48
третбутилгидрохинон	970	236	4			
	3486	289	32	4000	289	48
пирокатехин	-	-	-			
	2047	275	19	3200	265	36
2,3-дигидроксибензойная кислота	4093	240	10	7800	255	36
	2616	306	47	3200	350	68
4-третбутилпирокатехин	-	-	-			
	2386	278	17	3700	270	40
резорцин	-	-	-	1050	224	24
	2008	273	22	2000	259	38
фенол	-	234	-	50000	191	35
	1378	270	22	5000	253	45
орто-крезол	-	-	-	40000	210	25
	1282	271	13	4500	255	30

Курсив – полоса поглощения сильно искажена поглощением буферного раствора;

«-» - данные полностью недостоверны, но полоса поглощения имеется.

В случае орто- и пара-дигидроксибензолов образование хинонов как основного или единственного продукта окисления достаточно однозначно следует из спектроскопических данных, однако их коэффициенты экстинкции требуют уточнения. Т.е. основным объектом моделирования выступали хиноны.

Образующийся при лакказном окислении гидрохинона *пара*-бензохинон имеет две четко различимые полосы поглощения – ультрафиолетовую высокой интенсивности (246 нм) и малоинтенсивную видимую (420 нм). При моделировании получена только первая полоса поглощения, а для многих других фенолов также получены видимые полосы поглощения. Во многих случаях расчетные длины волн максимумов поглощения также отличаются от экспериментальных примерно на 10 нм, а коэффициенты экстинкции отличаются не более чем в 2 раза (табл. 2).

Для мета-дигидроксибензолов и одноатомных гидроксibenзолов, которые не могут быть окислены до соответствующих хинонов, необходим поиск других возможных продуктов окисления, возникающих при рекомбинации или иных превращениях феноксильных радикалов. Таковыми могут быть димерные, олигомерные и полимерные продукты [7,8].

Используемая программа не предназначена для работы с полимерными соединениями. Максимальная длина олигомера, который удалось оптимизировать и рассчитать спектр – 3 звена. То есть, в колонке расчетных величин под продуктами лакказного окисления резорцина, фенола и орто-метилфенола имеются в виду соответствующие тримеры (табл. 2).

Таблица 2. Экспериментальные и расчетные спектральные характеристики хинонов

Продукт	Экспериментальные			Расчетные		
	$\epsilon$	$\lambda_{\max}$ , нм	$\lambda_{1/2}$ , нм	$\epsilon$	$\lambda_{\max}$ , нм	$\lambda_{1/2}$ , нм
Пара-бензохинон (1,4-бензохинон)	18361	246	28	16000	257	30
	20	420	95			
2-карбоксо-1,4-бензохинон	18285	248	30	15000	263	45
	182	420	120	500	378	100
2,3-дициано-1,4-бензохинон	10402	260	36	12000	308	55
	799	445	120			
2,5-дибром-1,4-бензохинон	-	-	-			
	1333	355	100	7500	364	90
2,5-дихлор-1,4-бензохинон	17763	273	26			
	265	340	80	9300	347	70
Метил-1,4-бензохинон	20801	250	170	16000	270	40
	616	325				
Триметил-1,4-бензохинон	22324	261	10	15000	281	40
	500	355				
4-третбутил-1,4-бензохинон	23323	252	15	14000	270	45
	895	323,5		500	381	600
1,2-бензохинон	7124	252		2700	231	45
	1884	390	17	2300	438	100
3-карбоксо-1,2-бензохинон				11000	248	50
	2317	418	37	8000	417	100
4-третбутил-1,2-бензохинон				5400	278	55
	1333	400	93	1400	495	100
продукт окисления резорцина	-	340	120	26000	334	60
продукт окисления фенола	-	270	-	5500	285	40
	2753	400	70	16000	372	90
продукт окисления орто-крезола	-	271	-	12000	270	55
	646	412	80	500	364	80

Таким образом, спектральные характеристики фенолов и соответствующих хинонов, полученные путем моделирования в рамках теории функционала плотности (DFT) с использованием гибридного функционала B3LYP в программе Gamess US, схожи с экспериментальными, однако недостаточно точны. Погрешность определения максимума поглощения 10 нм и более недопустима при анализе сложного спектра реакционной смеси. Завышенные в два раза коэффициенты экстинкции затруднительно использовать для получения достоверных кинетических данных; с другой стороны, в большинстве случаев это завышение соизмеримо с погрешностью косвенных методов определения коэффициента экстинкции по экспериментальным данным кинетики.

#### Список литературы / References:

1. Thurston C.F. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology*, 1994, vol. 140, pp. 19-26.
2. Catherine H. Product formation from phenolic compounds removal by laccases: A review. *Environmental Technology & Innovation*, 2016, vol. 5, pp. 250-266.
3. Досон Р. *Справочник биохимика*. М.: Мир, 1991, 539 с. [Dawson R. *Biochemist's Handbook*. М.: Mir, 1991, 539 p. (In Russ)].
4. Серба П.В., Блинов Ю.Ф., Мирошниченко С.П. *Квантово-химические расчеты в программе Gaussian Учебное пособие*. Таганрог: Изд-во ТТИ ЮФУ, 2012, 100 с. [Serba P.V., Blinov Yu.F., Miroshnichenko S.P. *Quantum-chemical calculations in the program Gaussian Tutorial*. Taganrog: Publishing House of TTI SFU, 2012, 100 p. (In Russ.)].
5. Albarran G. et al. Absorption Spectrum, Mass Spectrometric Properties, and Electronic Structure of 1,2-Benzoquinone. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2010, vol. 114, iss. 28, pp. 7470-7478.
6. Сильверстейн Р., Басслер Г., Моррил Т. *Спектрометрическая идентификация органических соединений*. М.: Мир 1977, 592 с. [Silverstein R., Bassler G., Morrill T. *Spectrometric identification of organic compounds*. М.: Mir 1977, 592 p. (In Russ.)].
7. Sun X. et al. Laccase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Phenolic Compounds. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, vol. 171, iss. 7, pp. 1673-1680.

8. Романовская И.И. и др. Окисление фенола ковалентно иммобилизованной пероксидазой хрена. *Биотехнология*, 2011, т. 4, № 6, с. 31-35 [Romanovskaya I.I. et al. Oxidation of phenol by covalently immobilized horseradish peroxidase. *Biotechnology*, 2011, vol. 4, no. 6, pp. 31-35 (In Russ.)].

#### SIMULATION OF THE ELECTRONIC ABSORPTION SPECTRA OF PHENOLS AND PRODUCTS OF THEIR ENZYMATIVE OXIDATION

Lapteva E.A., Kravchenko E.M., Odaryuk I.D., Doroshkevich V.S., Baranova O.V.

Donetsk State University

Universitetskaya str., 24, Donetsk, 283001, DPR, Russia; e-mail: elen.kravchenko@donnu.ru

Received 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0623

**Abstract.** The possibility of obtaining absorption spectra of phenols and products of their laccase oxidation by quantum-chemical modeling methods is considered. The primary optimization of the structures was carried out by the semi-empirical PM3 method, and the spectra were simulated within the framework of the density functional theory by the DFT/B3LYP/6-311G++dp method in an aqueous medium using the Gamess US program. For most of the studied phenols and their corresponding quinones, spectra containing one absorption band were obtained by calculation methods, for some - a larger number of bands, while in the experimental absorption spectra of these substances in the operating range of the spectrophotometer, as a rule, two bands are visible with different reliability. For most substances, the wavelengths of the absorption maxima of the calculated spectra differ from the experimental ones by no more than 10 nm. The calculated extinction coefficients, as a rule, exceed the experimental ones by 1,5–2 times. For phenols that cannot be directly oxidized to quinones, oligomeric products are considered as products. Their calculated spectra also correlate quite well with the experimental spectrum of the reaction mixture. The spectral characteristics obtained by modeling under these conditions can be used for a rough estimate of the composition of the reaction mixture, but additional studies are needed for their use in accurate quantitative analysis and kinetic studies.

**Key words:** laccase, phenols, quinones, spectrophotometry, simulation.