

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СТАБИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КИНЕТИКИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ОКИСЛЕНИЯ ФЕНОЛОВ

Кравченко Е.М., Кучина Е.С., Лаптева Е.А., Одарюк И.Д.

Донецкий национальный университет

ул. Университетская, 24, г. Донецк, 283001, ДНР; e-mail: elena_grazhina@mail.ru

Поступила в редакцию: 14.07.2021

Аннотация. В работе изучена возможность применения стабильных радикалов для определения содержания фенолов в реакционной смеси с помощью окислительно-восстановительного титриметрического анализа. Разработана процедура получения АВТС^{•+}-радикала в реакции лакказного окисления АВТС с последующим выделением катион-радикала гель-хроматографией на колонке с сефадексом G-10. С помощью различных подходов определен коэффициент экстинкции для АВТС^{•+}-радикала, который составил $(3,3 \pm 0,2) \cdot 10^4$ л·(моль·см)⁻¹. В качестве реагента для стандартизации раствора АВТС^{•+}-радикала и [•]ДРРН предложена аскорбиновая кислота. Показана применимость окислительно-восстановительного титрования с использованием катион-радикала АВТС и [•]ДРРН для регистрации кинетики расщедования многоатомного фенола в процессе его окисления в присутствии лакказы *Trametes versicolor*.

Ключевые слова: стабильные радикалы, лакказа, фенолы, аскорбиновая кислота, окисление, спектрофотометрия, окислительно-восстановительное титрование.

В последние годы интерес исследователей привлекают ферменты лигнолитического комплекса дереворазрушающих грибов, в основном лакказы и пероксидазы [1], а также пероксидазы растений [2], так как высокая стабильность и активность, доступность сырья для извлечения делают их перспективными объектами технологических процессов. Сложность изучения процессов с участием лакказ или пероксидаз обусловлена возможностью инициации ферментом радикального окисления без дальнейшего его катализа, то есть, может включать элементарные стадии, протекающие за пределами активного центра фермента [3]. Поэтому для разработки технологических схем с участием этих оксидоредуктаз, прогнозирования протекания побочных реакций необходимо знать принципиальный механизм катализа этих процессов.

Распространенным методом исследования механизма окисления фенолов является спектрофотометрия. Для орто-, пара-дигидроксibenзолов и некоторых их производных достоверно установлено, что первичными относительно стабильными продуктами окисления являются соответствующие бензохиноны, и полосы поглощения продуктов и субстратов четко различимы. Однако в большинстве случаев при окислении фенолов наблюдается сложный спектр реакционной смеси, который не представляется возможным использовать для получения достоверных кинетических кривых. Указанные затруднения приводят к необходимости поиска дополнительных подходов для получения кинетических данных и исследования механизма.

В работе предложен способ изучения кинетики убыли многоатомного фенола в процессе ферментативного окисления с помощью метода селективного окислительно-восстановительного титрования проб реакционной смеси катион-радикалом 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоната) (АВТС^{•+}) и дифенилпикрилгидразилом ([•]ДРРН). Эти вещества имеют интенсивную окраску, АВТС^{•+} – сине-зеленую ($\lambda_{max} = 414$ нм), [•]ДРРН – фиолетовую ($\lambda_{max} = 513$ нм) и традиционно используются для определения антирадикальной активности. АВТС^{•+} применяется при изучении процессов в водных средах, а [•]ДРРН – в органических, например, в этаноле [4, 5]. Эти радикалы осуществляют одноэлектронное окисление фенолов, переходя в соответствующие восстановленные формы – АВТС (2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфонат)) и ДРРН (дифенилпикрилгидразин), растворы которых становятся бесцветными и светло-желтыми соответственно.

Отрыв подвижного Н-атома или электрона от гидроксильной группы фенола (QH₂) приводит к образованию феноксильного радикала (QH[•]) согласно уравнениям (1), (2) [6, 7]:



Дальнейшее превращение феноксильного радикала зависит от структуры исходного фенола. Возможно окисление семихинонных радикалов до хинонов, их диспропорционирование до соответствующих хинонов и исходных фенолов. Феноксильные радикалы также могут рекомбинировать [8]. Образование хинонов происходит следующим образом:



В случае фенолов, не образующих хинонов или имеющих заместители, стабилизирующие феноксильный радикал (например, ионол), возможно образование сложных олигомерных продуктов, в том числе продуктов конъюгации с АВТС^{•+} или [•]ДРРН [9, 10].

Взаимодействие стабильных радикалов с большинством фенолов в условиях эксперимента протекает с высокой скоростью, что позволяет использовать окислительно-восстановительный титриметрический анализ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Ферментативное окисление фенолов исследовали в присутствии лакказы макромицета *Trametes versicolor* фирмы SIGMA. Фермент, ABTS (содержание основного вещества $\geq 98\%$) и *DPPH того же производителя дополнительно не очищали. Аскорбиновую кислоту, флороглюцин, 2,3-дигидроксibenзойную кислоту очищали перекристаллизацией из спирта или водно-спиртовых растворов. Гидрохинон очищали сублимацией. Чистоту реагентов устанавливали по температурам плавления и спектрофотометрически. Буферные растворы готовили из реагентов надлежащей чистоты по стандартным методикам [11] на бидистиллированной воде.

ABTS⁺-радикал получали ферментативным окислением ABTS с помощью лакказы из *Trametes versicolor* и выделяли методом гель-проникающей хроматографии. В цитратный буфер с pH 3,0 вводили раствор ABTS (концентрация в смеси 5,0 мМ) и фермент (концентрация в смеси 100 мг/л). Окислителем выступал молекулярный кислород. Закрытую пробирку помещали в термостат при 308 К, выдерживали смесь в течение 2 часов при периодическом перемешивании. После этого реакционную смесь вносили в колонку с сефадексом G-10 (l = 20 см, d = 1,0 см), уравновешенную 50 мМ цитратным буфером pH 3,0. Смесь элюировали бидистиллированной водой. Буфер и бидистиллированную воду для элюирования дегазировали с помощью вакуумирования.

Полученный раствор ABTS⁺-радикала, свободный от фермента, стандартизовали титрованием аскорбиновой кислотой, а его концентрацию непосредственно перед работой проверяли спектрофотометрически. Растворы ABTS⁺ и *DPPH стабильны при хранении при 4 °С не менее недели.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Так как чистота коммерческого препарата *DPPH находится в пределах 90-95%, а катион-радикал ABTS образуется с высоким, но достоверно неизвестным выходом, при определении точных концентраций их растворов ориентироваться только на величину навесок было недостаточно. В качестве титрантов для стандартизации ABTS⁺-радикала были испытаны несколько восстановителей. Определение точки перехода при окислительно-восстановительном титровании проводили со спектрофотометрическим и визуальным контролем. Как видно из таблицы 1, значения коэффициентов экстинкции, полученные при использовании спектрофотометрического и визуального контроля, совпадают.

Согласно [12], коэффициент экстинкции ABTS⁺-радикала, рассчитанный по количеству прореагировавшего ABTS при условии, что выход при окислении его ионами Ce⁴⁺ составляет 100%, равен $3,6 \cdot 10^4$ л·(моль·см)⁻¹. Полученное в данной работе значение коэффициента экстинкции для ABTS⁺ в реакции лакказного окисления составило $(3,3 \pm 0,2) \cdot 10^4$ л·(моль·см)⁻¹. Такое же значение получаем, применяя окислительно-восстановительное титрование катион-радикала аскорбиновой кислотой (табл. 1). При использовании персульфата калия в качестве окислителя ABTS значение коэффициента экстинкции составило $(2,8 \pm 0,2) \cdot 10^4$ л·(моль·см)⁻¹. Применение в качестве восстанавливающих агентов для ABTS⁺ тролокса, гексацианоферрата калия, тиосульфата натрия, йодида калия и β-меркаптоэтанола дает более высокие значения коэффициента экстинкции (табл. 1). Таким образом, в дальнейшей работе использовали $\epsilon(\text{ABTS}^+) = 3,3 \cdot 10^4$ л·(моль·см)⁻¹.

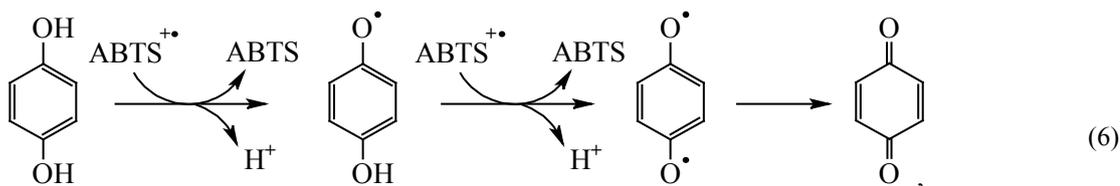
В отдельных экспериментах установлено, что при обесцвечивании ABTS⁺-радикал восстанавливается до ABTS, следовательно, процесс является одноэлектронным. Сопряженный процесс окисления гидрохинона до *n*-бензохинона сопровождается переносом двух электронов согласно реакции (6). Возможен также вариант диспропорционирования феноксильных радикалов по реакции (7). При таких вариантах окисления гидрохинона фактор эквивалентности будет в пределе равным двум.

Таблица 1. Значения коэффициентов экстинкции для водного раствора катион-радикала ABTS

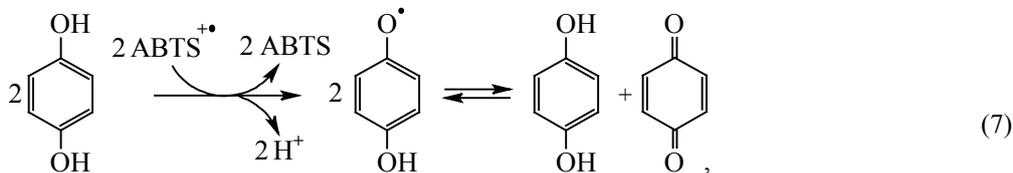
восстановитель ABTS ⁺ -радикала	<i>f</i>	$\epsilon \cdot 10^{-4}$, л·(моль·см) ⁻¹	примечание
AscH ₂	2	3,4 ± 0,2	
AscH ₂		3,3 ± 0,2	СФ*
тролокс		6,4 ± 0,3	СФ
K ₄ [Fe(CN) ₆]	1	4,3 ± 0,3	
K ₄ [Fe(CN) ₆]		4,3 ± 0,3	СФ
Na ₂ S ₂ O ₃		3,9 ± 0,2	
Na ₂ S ₂ O ₃		4,2 ± 0,1	СФ
KJ + Na ₂ S ₂ O ₃ + крахмал		5,4 ± 0,2	
β-меркаптоэтанол		4,4 ± 0,2	

СФ – титрование велось со спектрофотометрическим контролем точки перехода;

f – фактор эквивалентности, который использовали для расчетов, исходя из предполагаемой схемы реакции.

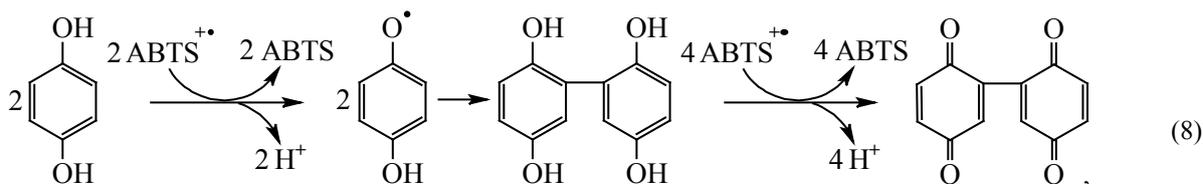


$$\square(\text{GX}):\square(\text{ABTS}^{\bullet+}) = 1:2, f = 2.$$

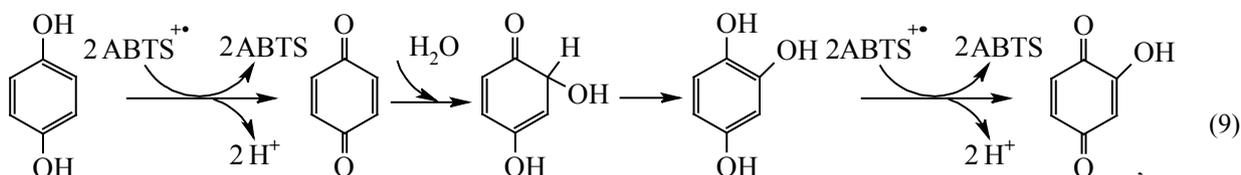


$$\square(\text{GX}):\square(\text{ABTS}^{\bullet+}) = 1:2, f = 2.$$

Однако для бензохинонов и феноксильных радикалов, образующихся при окислении соответствующих фенолов, могут реализовываться дополнительные пути превращений, в которых молярные соотношения будут иными. Рассмотрим на примере гидрохинона. Взаимодействие двух феноксильных радикалов может приводить не только к диспропорционированию по реакции (7), но и к образованию новой С-С связи между ароматическими кольцами. Такой димерный конъюгат имеет четыре гидроксильные группы, которые могут быть окислены $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -радикалом по реакции (8). Кроме того, возможно нуклеофильное присоединение воды к хинону, в результате чего образуются новые гидроксильные группы, которые тоже могут восстанавливать $\text{ABTS}^{\bullet+}$, например, по реакции (9). В этом случае молярное соотношение в пределе будет равно четырем, а если предположить окисление гидроксильной группы хинона, то больше четырех.



$$\square(\text{GX}):\square(\text{ABTS}^{\bullet+}) = 1:3, f = 3.$$



$$\square(\text{GX}):\square(\text{ABTS}^{\bullet+}) = 1:4, f = 4.$$

Таким образом, в реакции окисления многоатомных фенолов $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -радикалом в зависимости от механизма фактор эквивалентности (f) может варьировать в относительно широких пределах: от примерно двух, при отсутствии побочных реакций, до трех и более – при их наличии. Данный параметр напрямую с количеством гидроксильных групп не связан.

В качестве модельных соединений для проверки применимости методики использовали двухатомные фенолы – гидрохинон и 2,3-дигидроксибензойную кислоту, так как кинетические кривые их расходования и накопления продуктов регистрируются с помощью УФ- и видимой спектрофотометрии. Молярные соотношения (фактор эквивалентности), в которых $\text{ABTS}^{\bullet+}$ взаимодействует с гидрохиноном, 2,3-дигидроксибензойной кислотой и флороглюцином, равны $(2,0 \pm 0,1)$, $(4,5 \pm 0,2)$, $(2,8 \pm 0,3)$ соответственно. По-видимому, процесс окисления катион-радикалом 2,3-дигидроксибензойной кислоты, флороглюцина является более сложным, чем описано реакциями (3), (4). Кроме этого, не исключены процессы рекомбинации феноксильных радикалов с $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Несмотря на то, что полученные значения молярных соотношений не являются целыми и не позволяют однозначно судить о механизме окисления 2,3-дигидроксибензойной кислоты и флороглюцина $\text{ABTS}^{\bullet+}$ -радикалом, их можно использовать при расчете неизвестной концентрации титруемого фенола.

Кинетику лакказного окисления молекулярным кислородом гидрохинона и 2,3-дигидроксибензойной кислоты исследовали спектрофотометрически непосредственно в термостатируемой кювете с перемешиванием, и методом отбора проб в термостатируемом реакторе с барботацией с последующим установлением концентрации субстрата окислительно-восстановительным титрованием. Отбор проб реакционной смеси производили, разбавляя их в 4-8 раз фосфатным буферным раствором (pH 7), при комнатной температуре,

Таблица 2. Начальные скорости лакказного окисления гидрохинона и 2,3-дигидроксibenзойной кислоты

Субстрат	$V_{0,CF}$, мкМ/с	$V_{0,ABTS^{+}}$, мкМ/с
гидрохинон	$2,1 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,3$
2,3-дигидроксibenзойная кислота	$0,57 \pm 0,04$	$0,54 \pm 0,04$

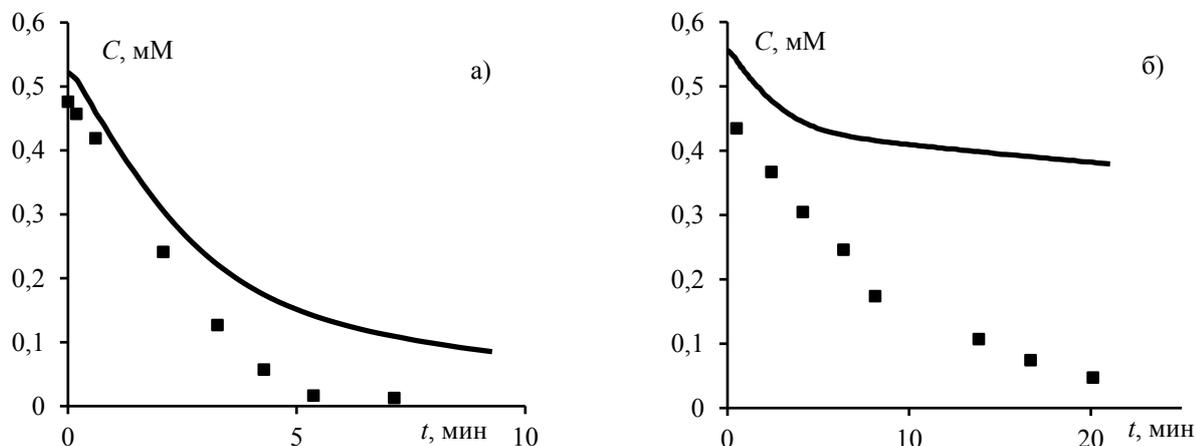


Рисунок 1. Кинетические кривые расходования гидрохинона (а) и 2,3-дигидроксibenзойной кислоты (б) в процессе лакказного окисления, полученные спектрофотометрическим методом (сплошные кривые) и титрованием непрореагировавшего субстрата катион-радикалом АВТС (обозначено точками). $[E]_0 = 20$ мг/л, 0,1 М цитратный буфер рН 4,6, Т 308 К. $[GX]_0 = 0,5$ мМ, $[2,3\text{-диОН}]_0 = 0,6$ мМ

обеспечивая торможение лакказного окисления путем разбавления и изменения рН. Ингибирование лакказы необходимо, так как она катализирует превращение и субстрата, кинетика окисления которого изучается, и продукта восстановления АВТС⁺-радикала – АВТС. Концентрацию гидрохинона и 2,3-дигидроксibenзойной кислоты вычисляли из титриметрических данных с использованием факторов эквивалентности, определенных ранее.

Несмотря на то, что определенные разными способами значения начальных скоростей реакции расходования двух использованных субстратов лакказы при их окислении совпадают в пределах погрешности эксперимента (табл. 2), кинетические кривые не накладываются (рис. 1).

Кинетическая кривая расходования гидрохинона, регистрируемая с помощью окислительно-восстановительного титрования, расположена немного ниже кривой, получаемой спектрофотометрией. То есть, имеется небольшой вклад накапливающегося *para*-бензохинона в области максимума полосы поглощения гидрохинона ($\lambda_{max} = 289$ нм). Расхождение кинетических кривых расходования 2,3-дигидроксibenзойной кислоты, полученных спектрофотометрическим и титриметрическим методами, значительно. Таким образом, применение АВТС⁺-радикала для установления концентраций многоатомного фенола в реакционной смеси окислительно-восстановительным титрованием в водной среде позволяет достоверно определить только начальные скорости расходования субстратов, когда спектрофотометрический метод для решения этой задачи не подходит. Это обуславливает необходимость поиска других агентов для проведения окислительно-восстановительного титрования при определении концентрации фенолов в реакционной смеси.

В качестве такого агента можно использовать *DPPH, так как он имеет ряд преимуществ: является коммерческим препаратом и его предварительное получение не требуется; титрование осуществляется в этаноле, в котором число побочных реакций резко снижено по отношению к водной среде и происходит полное ингибирование фермента. С помощью аскорбиновой кислоты было определено с высокой точностью значение коэффициента экстинкции для *DPPH, которое составило $(1,9 \pm 0,1) \cdot 10^4$ л·(моль·см)⁻¹. Вычисленное значение f для гидрохинона составило $2,1 \pm 0,2$, что указывает на реализацию реакций (2), (4), (5) при проведении окислительно-восстановительного титрования с использованием *DPPH.

Предложенная методика определения концентрации субстрата при лакказном окислении фенолов путем окислительно-восстановительного титрования может быть полезна в случаях, когда затруднено спектрофотометрическое наблюдение. Методика проста в исполнении и состоит из двух этапов – определение фактора эквивалентности путем титрования раствором стабильного радикала нескольких известных концентраций исследуемого фенола и исследование ферментативной кинетики. Однако требует необходимости использования метода отбора проб, что удлиняет время проведения эксперимента и ограничивает число точек для получения кинетической кривой.

Список литературы / References:

1. Куликова Н.А. и др. Использование базидиальных грибов в технологиях переработки и утилизации техногенных отходов: фундаментальные и прикладные аспекты (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*, 2011, т. 47, с. 619-634. [Kulikova N.A. et al. The use of basidiomycetes in technologies for processing and utilization of technogenic waste: fundamental and applied aspects (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2011, vol. 47, pp. 619-634. (In Russ.)]
2. Veda P Pandey et al. A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases [Text]. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 2017, vol. 6, no. 1, pp. 1-16. doi: 10.4172/2161-1009.1000308
3. Diana M. Mate, Alcalde M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microbial Biotechnology*, 2017, vol. 10, no. 6, pp. 1457-1467. doi: 10.1111/1751-7915.12422
4. Santos-Sanchez N.F., Salas-Coronado R., Villanueva-Cañongo C., Hernández-Carlos B. Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. *IntechOpen*, 2019. doi: 10.5772/intechopen.85270
5. Roberta Re et al. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, vol. 26, pp. 1231-1237.
6. Волков В.А., Дорофеева Н.А., Пахомов П.М. Кинетический метод анализа антирадикальной активности экстрактов растений. *Химико-фармацевтический журнал*, 2009, т. 43, № 6, с. 27-31. [Volkov V.A., Dorofeeva N.A., Pakhomov P.M. Kinetic method for the analysis of antiradical activity of plant extracts. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2009, vol. 43, no. 6, pp. 27-31. (In Russ.)] doi: 10.30906/0023-1134-2009-43-6-27-31
7. Osman A.M., Wong K.K.Y., Fernyhough A. ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: isolation and structural elucidation of covalent adducts. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2006, vol. 346, no. 1, pp. 321-329. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.05.118
8. Shendrik A.N., Odaryuk I.D., Kanibolotska L.V. et al. Radical formation during phenol oxidation in aqueous media [Text]. *Int. J. Chem. Kinet.*, 2012, vol. 44, no. 6, pp. 414-422. doi: 10.1002/kin.20592
9. Gramss G. Reappraising a Controversy: Formation and Role of the Azodication (ABTS²⁺) in the Laccase-ABTS Catalyzed Breakdown of Lignin. *Fermentation*, 2017, vol. 3, no. 27, pp. 1-18. doi: 10.3390/fermentation3020027
10. Osman A.M. Multiple pathways of the reaction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH·) with (+)-catechin: evidence for the formation of a covalent adduct between DPPH· and the oxidized form of the polyphenol. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2011, vol. 412, pp. 473-478. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.123
11. Досон Р. и др. *Справочник биохимика*: Пер. с англ. М.: Мир, 1991, 544 с. [Dawson R. et al. *Biochemist's Handbook*: Per. from English M.: Mir, 1991, 544 p. (In Russ.)]
12. Branchi B., Galli C., Gentili P. Kinetics of oxidation of benzyl alcohols by the dication and radical cation of ABTS. Comparison with laccase-ABTS oxidations: an apparent paradox. *Org. Biomol. Chem.*, 2005, vol. 3, pp. 2604-2614. doi: 10.1039/B504199F

THE STABLE RADICALS FOR STUDY THE ENZYME OXIDATION OF PHENOLS**Kravchenko E.M., Kuchina E.S., Lapteva E.A., Odaryuk I.D.**

Donetsk National University

Universitetskaya str., 24, Donetsk, 283001, DPR; e-mail: elena_grazhina@mail.ru

Abstract. It was studied the possibility of using stable radicals to determine the content of phenols in the reaction mixture with redox titrimetric analysis. The procedure for obtaining an ABTS^{•+}-radical in the laccase oxidation of ABTS has been developed. The subsequent isolation of the radical cation by gel chromatography on a column with Sephadex G-10 was applied. The extinction coefficient for the ABTS^{•+}-radical was determined using various approaches and it was equaled $(3.3 \pm 0.2) \cdot 10^4 \text{ L} \cdot (\text{mol} \cdot \text{cm})^{-1}$. Ascorbic acid has been proposed as a reagent for the solution of ABTS^{•+}-radical and *DPPH standardization. Redox titration with ABTS^{•+} and *DPPH might be used for recording the kinetics of consumption of polyphenol during its oxidation in the presence of the *Trametes versicolor* laccase.

Key words: stable radicals, laccase, phenols, ascorbic acid, oxidation, spectrophotometry, redox titration.