

## Иммобилизованные биокатализаторы на основе органофосфатгидролазы в процессах разложения фосфорорганических отравляющих веществ

© 2011. Е. Н. Ефременко<sup>1</sup>, д.б.н., зав. лабораторией, И. В. Лягин<sup>1,2</sup>, к.х.н., н.с.,  
Д. А. Гудков<sup>1</sup>, к.х.н., м.н.с., М. С. Сироткина<sup>1</sup>, аспирант, Н. В. Завьялова<sup>3</sup>, д.б.н., г.н.с.,  
В. В. Завьялов<sup>4</sup>, к.х.н., с.н.с., С. Д. Варфоломеев<sup>2</sup>, член-корр. РАН, директор,  
В. И. Холстов<sup>5</sup>, д.х.н., директор,

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,

<sup>2</sup>Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН,

<sup>3</sup>33 Центральный научно-исследовательский и испытательный институт МО РФ,

<sup>4</sup>Экспертно-криминалистический центр МВД РФ,

<sup>5</sup>Департамент реализации конвенционных обязательств Министерства  
промышленности и торговли Российской Федерации,  
e-mail: elena\_efremenko@list.ru

В статье представлены материалы по использованию иммобилизованных ферментных биокатализаторов, созданных на основе гексагистидинсодержащей органофосфатгидролазы, в процессах биодеструкции фосфорорганических отравляющих веществ и продуктов их гидролиза в проточных системах и в почвогрунте. Обсуждается применение указанного фермента в иммобилизованной форме как составного элемента защитных средств нового поколения, обладающих самодегазацией. Метод и носитель для иммобилизации фермента определяются назначением и условиями применения разработанного биокатализатора. Для всех вариантов созданных биокатализаторов на основе иммобилизованного фермента продемонстрирована высокая эффективность их действия.

The work presents information on the use of immobilized enzymatic biocatalysts developed on the base of hexahistidine-containing organophosphorus hydrolase in the processes of biodestruction of organophosphorous neurotoxic agents as well as products of their hydrolysis in flow-through systems and soil. The application of the enzyme mentioned in immobilized form as a main element of personal protection material of a new generation possessing self-deactivation is discussed. Method and carrier for enzyme immobilization is defined by purpose and conditions of exploitation of originated biocatalyst. A high enough efficiency of action is demonstrated for all the variants of created biocatalysts based on immobilized enzyme.

Ключевые слова: фосфорорганические отравляющие вещества,  
гексагистидинсодержащая органофосфатгидролаза, иммобилизованные биокатализаторы,  
проточные системы, почвы, защитные материалы

Key words: organophosphorous chemical warfare agents, hexahistidine-containing  
organophosphorus hydrolase, immobilized biocatalysts, flow-through systems, soils,  
protective materials

Современные биохимические процессы, основанные на использовании генетически модифицированных ферментов с улучшенными каталитическими характеристиками, формируют новую научно-практическую базу для решения задач, связанных с необходимостью детоксикации фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ) в различных объектах, в частности в водных средах, почвах и в составе самодегазирующих средств защиты. Огромный интерес в мире к ферментативным методам разложения ФОВ обусловлен их высокой эффективностью действия и экологической безопасностью, которая предопределяет

условиями реализации методов: температурой окружающей среды, атмосферным давлением, использованием водных сред с отсутствием агрессивных химических агентов [1, 2]. На сегодняшний день наиболее активным ферментом, способным катализировать гидролиз фосфорорганических соединений (ФОС), представляющих собой производные ортофосфорной и алкилфосфоновой кислот, является органофосфатгидролаза (ОРН, ЕС 3.1.8.1) [3]. Установлено, что ОРН, содержащая генетически введённую на N-конец молекулы белка гексагистидиновую последовательность (His<sub>6</sub>-ОРН), способна осуществлять высоко-

эффективный гидролиз ФОВ при концентрации до  $10^{-2}$  М в виде чистых веществ и в составе сложных по химическому составу реакционных массах, получаемых после детоксикации ОВ [4]. Также показано, что His<sub>6</sub>-ОРН гидролизует различные фосфонаты, являющиеся продуктами разложения ФОВ, в широком диапазоне их концентраций, pH среды и температуры [5, 6].

Проведение иммобилизации His<sub>6</sub>-ОРН позволяет получать стабильную форму фермента, которая может обеспечить продолжительное сохранение ферментом его каталитических характеристик и дать возможность многократно использовать его для гидролиза ФОВ и продуктов их разложения. Очевидно, что выбор метода иммобилизации и носителя для фермента предопределяется условиями его дальнейшего применения. Различные иммобилизованные формы фермента могут найти применение в технологии биодegradации реакционных масс в условиях проточных реакторов, в процессах биоремедиации почв, загрязнённых как исходными ФОВ, так и продуктами их первичного гидролиза, а также в создании нового поколения средств индивидуальной защиты, основанных на их биоактивации и самодегазации. В данной работе представлены результаты исследований по трём указанным направлениям использования иммобилизованных ферментных препаратов, разработанных на основе His<sub>6</sub>-ОРН.

**Иммобилизованная His<sub>6</sub>-ОРН в составе защитного самодегазирующегося материала**

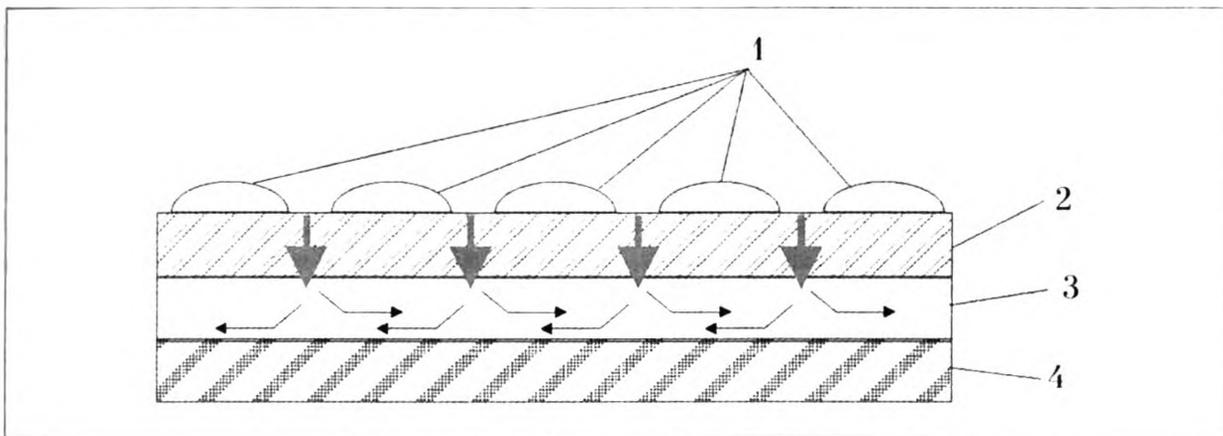
Одной из актуальных задач, связанных с детоксикацией ФОВ, является разработка

высокоэффективных самодегазирующихся фильтрующих защитных материалов. Американские исследователи предпочли использовать смесь ферментов, способных гидролизовать различные ФОВ, для введения в самодегазирующийся слой защитного материала [7]. Среди применённых ими ферментов были ОРН и фосфорорганическая кислая ангидролаза (ФКА, ЕС 3.1.8.2), суммарное каталитическое действие которых должно обеспечивать защиту от токсичного воздействия трёх основных ФОВ: зарина, зомана и ОВ типа Vx.

Для создания российского аналога был использован фермент His<sub>6</sub>-ОРН, который не только более эффективно гидролизует три указанные ФОВ в сравнении с ОРН и ФКА, но и катализирует разложение фосфорорганических продуктов их гидролиза [8]. Структура защитного самодегазирующегося материала, разработанного на основе His<sub>6</sub>-ОРН, схематично представлена на рисунке 1.

Верхний слой, используемый в качестве изолирующего от проникновения ФОВ в виде жидкости, представлял собой полиамидхлопчатобумажную ткань с полифторолефиновой или полиуретановой мембраной, обладающей олеофильными свойствами. Применение данного материала обеспечивает равномерное распределение и дозировку ФОВ к следующему сорбирующему слою [9].

Средний слой являлся сорбирующим, биоактивированным и самодегазирующимся. Фермент His<sub>6</sub>-ОРН вводился в этот слой в виде раствора различной концентрации в буфере. В качестве сорбирующего носителя применялся сшитый сополимер акриловой кислоты и акриламида, имеющий высокую степень набухаемости (~3000). Выбранный носитель, с одной стороны, позволял вводить различные



**Рис. 1.** Схема защитного материала на основе иммобилизованной His<sub>6</sub>-ОРН: 1 – капли ФОВ на поверхности материала; 2 – верхний изолирующий слой; 3 – слой, содержащий иммобилизованный фермент His<sub>6</sub>-ОРН; 4 – нижний гигиенический слой

количества фермента в сорбционный слой, а с другой – сорбент гарантированно удерживал буферный раствор с заданным значением pH в микроокружении фермента, создавая благоприятные условия для высокоэффективного ферментативного катализа. Данный сорбент абсолютно не токсичен как при пероральном попадании в организм, так и при контакте с кожей и глазами [10].

Введение антимикробных веществ, применение которых допустимо даже в детской косметологии [11], в состав защитного материала, имеющего влажность биоактивированного слоя 60%, создало благоприятные условия для длительного хранения иммобилизованного фермента в герметичной упаковке при отсутствии порчи готовой продукции и в состоянии полной готовности к применению. Кроме того, данные вещества способствовали предотвращению какой-либо угрозы возникновения у пользователей заболеваний кожи, связанных с микробным заражением, вызванным культурами *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* и др., а также делали потенциально безопасным применение защитного материала потребителем без каких-либо возрастных ограничений.

Нижний (гигиенический) слой был выполнен из тканого или нетканого целлюлозосодержащего материала и предназначен для контакта с кожным покровом, одновременно выполнял функцию подложки для остальных слоёв. Кроме того, данный материал способен осуществлять эффективный отвод влаги от по-

верхности тела человека. Использование тканых и нетканых материалов на основе хлопка в качестве пористого материала обусловлено их высокой сорбционной ёмкостью, способностью удерживать большие объёмы жидкостей, а также доступностью их производства в больших объёмах текстильной промышленности и, следовательно, возможным масштабированием производства защитных материалов на их основе.

Было разработано несколько вариантов защитных материалов, отличающихся по своему составу, и исследованы их характеристики (табл. 1). Показано, что при нанесении на поверхность такого материала вещества типа Vx в концентрации 10 г/м<sup>2</sup> отсутствие токсичных паров за слоем защитного материала регистрируется на протяжении 96 ч (далее анализ не проводился) при различных температурах (22–45 °С) и значениях pH (7,8–10,5).

При температуре хранения +4 °С независимо от pH среды, выбранной для иммобилизации His<sub>6</sub>-ОРН, целесообразное время хранения защитного материала составило 8 мес. Снижение остаточной влажности дегазирующего слоя до 10% сохраняло защитные свойства материала на 100% (при незначительном снижении эффективности самодегазации) в течение 12 мес. при температуре +4 °С (табл. 1, образец № 3).

Исследование кинетики разложения различных фосфонатов в слое с иммобилизованным ферментом His<sub>6</sub>-ОРН показало (рис. 2), что не зависимо от степени очистки применя-

**Таблица 1**

Состав и защитные характеристики полученных защитных материалов при воздействии на них 10 г/м<sup>2</sup> вещества типа Vx

Компонент защитного материала	Очищенный препарат His <sub>6</sub> -ОРН			Неочищенный препарат His <sub>6</sub> -ОРН		
	1	2	3	4	5	6
№ образца защитного материала						
Мембранотканевая составляющая, % масс	15,2	14,3	21,4	13,5	15,0	10,3
Сорбент, % масс.	20,3	12,7	21,4	15,0	13,2	14,4
Фермент His <sub>6</sub> -ОРН, % масс.	0,00125	0,0076	0,0041	0,11	0,22	0,4
Буферный раствор, % масс.	30,4	38,2	7,1	44,8	40,0	32,6
Целлюлозосодержащая тканевая составляющая, % масс.	10,1	12,4	21,4	7,4	9,8	9,4
Время полной самодегазации, ч	5	3	4	7	3	3
Температура проведения испытания, °С	22	22	37	28	22	45
Время действия в заражённой зоне, ч	96	96	96	96	96	96
pH буферного раствора*	7,8	10,5	10,0	9,0	8,5	10,5
Температура хранения защитного материала, °С	+8	+4	+4	+4	+10	+8
Время сохранения самодегазирующих свойств на 100%, мес	6	8	12	6	4	6

Примечание: \* при данном pH проводилась иммобилизация фермента His<sub>6</sub>-ОРН на сорбенте.

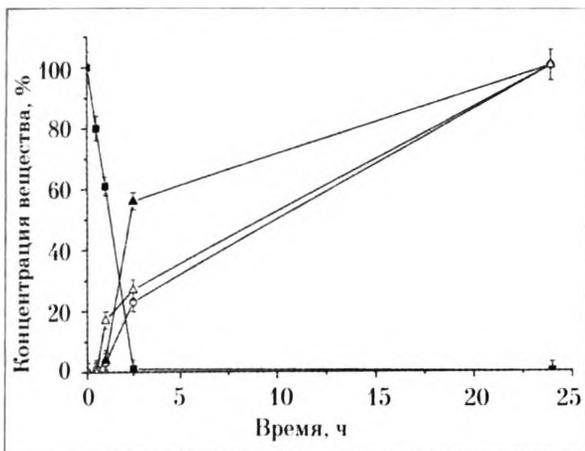


Рис. 2. Изменение концентрации вещества типа Vx (■), этилового эфира МФК (○), МФК (▲) и неорганического фосфата (□) в дегазирующем слое при детоксикации вещества типа Vx под действием иммобилизованного фермента His<sub>6</sub>-ОРН

емого фермента, pH и температуры время самодегазации образца защитного материала уменьшалось с 7 до 3 ч при увеличении концентрации фермента His<sub>6</sub>-ОРН. Минимальное время самодегазации (3 ч) наблюдалось для материалов, содержащих 0,0076 и 0,22% масс. для очищенного и неочищенного препарата His<sub>6</sub>-ОРН соответственно. Наряду с гидролизом вещества типа Vx наблюдалось разложение образующихся гидролитических продуктов: этилового эфира метилфосфоновой кислоты (ЭМФК) и метилфосфоновой кислоты (МФК) (рис. 2).

До 1 часа в накоплении ЭМФК и МФК наблюдался лаг-период, в то время как для фосфатов лаг-период закончился в первые 30 мин. За это время гидролиз вещества типа Vx проходил на 40%. По всей видимости, происходил гидролиз не только P-S, но и эфирной P-O связи в молекуле вещества типа Vx с образованием S-(2-дизопропиламиноэтил) метилфосфоната, который в данном эксперименте не контролировался. Далее происходило быстрое накопление МФК и более медленное накопление ЭМФК и фосфатов. Стоит отметить, что через 3 ч гидролиз вещества типа Vx заканчивался полным его разложением, в то же время накопление ЭМФК происходило до 25 часов включительно, что было обусловлено гидролизом диэтилового эфира МФК. К 25 часам в системе, вероятно, наступало химическое равновесие, потому что последующие анализы концентраций контролируемых веществ не выявили их изменений.

Сравнение времени защитного действия разработанного материала от паров вещества

типа Vx показало, что оно в 27 раз превосходило время защитного действия фильтрующей одежды общевойскового защитного комплекта ОЗК-Ф.

Таким образом, были разработаны прототипы биоактивированных защитных материалов нового поколения, позволяющие многократно улучшить характеристики средств индивидуальной защиты.

### Разложение фосфонатов в проточных системах под действием иммобилизованных биокатализаторов

Иммобилизация белков на металл-хелатирующих носителях характеризуется высокой прочностью и специфичностью связывания, а также отсутствием инактивации ферментов под действием сшивающих агентов, которые обычно используются в случае ковалентной химической иммобилизации ферментов. В основе этого метода иммобилизации лежит образование комплекса между ионами двухвалентных металлов, которыми заряжен носитель, и атомами азота имидазольных колец остатков гистидина полигистидиновой последовательности, введенной на какой-либо из концов молекулы белка [12].

Были разработаны биокатализаторы, предназначенные для использования в проточных реакторах, на основе His<sub>6</sub>-ОРН, иммобилизованной на макропористом полиакриламидном криогеле, модифицированном лигандами иминодисукусной кислоты и заряженном ионами меди (Cu-IDA-криоПААГ) [13 – 14]. При скорости потока 6 мл/ч в проточном реакторе были определены каталитические константы His<sub>6</sub>-ОРН, иммобилизованной на Cu-IDA-криоПААГ, в реакциях гидролиза различных фосфонатов (табл. 2). Установлена эффективность каталитического действия иммобилизованного биокатализатора в отношении метилфосфоновой кислоты (МФК), O,O'-дизобутилового эфира МФК (ДИБЭМФК) и O-изобутилового эфира МФК (ИБЭМФК).

Подача реакционных масс, образующихся в результате гидролиза вещества типа Vx, (РМГ), разбавленных в 50 раз 0,1 М карбонатным буфером (pH 10,5), со скоростью 3 мл/ч через слой иммобилизованного биокатализатора (100 мл) гарантированно обеспечивала разложение вещества типа Vx и ДИБЭМФК на 100%, а ИБЭМФК – на 9%. При этом следует отметить, что концентрация ИБЭМФК как основного продукта разложения веще-

Эффективные каталитические характеристики препарата His<sub>6</sub>-ОРН, иммобилизованного на Cu-IDA-криоПААГ, в отношении различных фосфонатов

Субстрат	$V_{max}/E_0, \text{ мин}^{-1}$	$K_m, \text{ мМ}$	$V_{max}/(E_0 \times K_m), \text{ М}^{-1}\text{мин}^{-1}$
ИБЭМФК	$6 \pm 0,4$	$3500 \pm 200$	$1,7 \pm 0,2$
ДИБЭМФК	$6,2 \pm 0,4$	$13,8 \pm 0,3$	$450 \pm 40$
МФК	$10,1 \pm 0,6$	$4,4 \pm 0,2$	$2300 \pm 240$

Примечание: ИБЭМФК – *O*-изобутиловый эфир метилфосфоновой кислоты, ДИБЭМФК – *O,O'*-диизобутиловый эфир метилфосфоновой кислоты, МФК – метилфосфоновая кислота.

ства типа Vx в начале обработки составляла не менее 5,4 г/л. Более глубокое разложение ИБЭМФК было продемонстрировано в результате последовательной обработки РМГ указанным иммобилизованным ферментным биокатализатором и биокатализатором в виде иммобилизованных клеток *Pseudomonas* sp. 78Г, осуществляющих утилизацию МФК [15]. Такая двухстадийная обработка токсичных РМГ гарантировала разложение ИБЭМФК и МФК (накапливающейся в результате деструкции всех других фосфонатов) на 90–93% [5].

Таким образом, впервые была показана возможность эффективной детоксикации различных фосфорорганических компонентов РМГ в проточной системе с применением разработанного ферментного иммобилизованного биокатализатора. Наиболее глубокое разложение оказалось возможным в случае комбинированной обработки РМГ с использованием иммобилизованных биокатализаторов на основе His<sub>6</sub>-ОРН и клеток бактерий *Pseudomonas* sp. 78Г.

### Разложение фосфонатов в почвогрунте под действием иммобилизованного ферментного биокатализатора

Ситуация с загрязнением территорий, прилегающих к объектам уничтожения химического оружия, требует особого внимания и наличия эффективных и экологически безопасных средств для своевременного проведения мероприятий по биоремедиации почв.

Иммобилизация фермента His<sub>6</sub>-ОРН на целлюлозосодержащем носителе (соломе) позволила получить иммобилизованный биокатализатор, введение которого в почвогрунт, загрязнённый различными ФОС, обеспечивает их гидролиз в течение короткого промежутка времени [16]. При этом для иммобилизации используется неочищенный ферментный препарат, что делает его экологически привлекательным для применения, а присутствие балластных белков оказывает дополнительный стабилизирующий эффект на His<sub>6</sub>-ОРН.

Введение иммобилизованного фермента в песок, загрязнённый МФК в концентрации 100 мг/кг почвогрунта, обеспечивает полное разложение фосфоната в течение 13 сут. при 20 °С (рис. 3). При этом в песке происходит накопление фосфат-ионов, являющихся продуктом разложения МФК.

Таким образом, показана возможность высокоэффективного применения нового иммобилизованного ферментного препарата на основе His<sub>6</sub>-ОРН для гидролиза фосфонатов (на примере МФК) в почвогрунте.

### Заключение

Представленные в данной работе три направления возможного использования иммобилизованных биокатализаторов на основе His<sub>6</sub>-ОРН для детоксикации ФОВ отнюдь не ограничивают возможные сферы применения данного фермента, а, наоборот, подтверждают его уникальные каталитические характеристики и большой прикладной потенциал. Способность эффективного функционирования разработанных биокатализаторов в различных гетерогенных системах (в проточных реакторах, в почвогрунте и в составе защитных материалов) открывает новые возможности для биокаталитического, экологически безопасно-

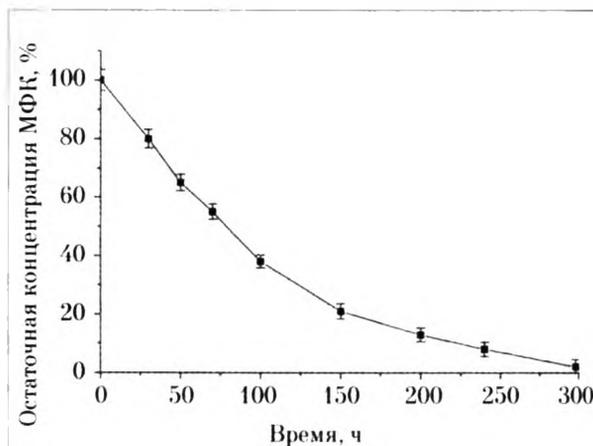


Рис. 3. Разложение МФК в песке под действием фермента His<sub>6</sub>-ОРН, иммобилизованного на соломе

го решения проблем, связанных с деструкцией ФОВ и продуктов их деградации.

### Литература

1. Ефременко Е.Н., Лягин И.В., Завьялов В.В., Варфоломеев С.Д., Завьялова Н.В., Холстов В.И. Ферменты в технологии уничтожения фосфорорганических отравляющих веществ // Рос. хим. ж. 2007. Т. LI. № 2. С. 24–29.
2. Ефременко Е.Н., Завьялова Н.В., Гудков Д.А., Лягин И.В., Сенько О.В., Гладченко М.А., Сироткина М.С., Холстов А.В., Варфоломеев С.Д., Холстов В.И. Экологически безопасная биодegradация реакционных масс, образующихся при уничтожении фосфорорганических отравляющих веществ // Рос. хим. ж. 2010. Т. LIV. № 4. С. 19–24.
3. Ефременко Е.Н., Варфоломеев С.Д. Ферменты деструкции фосфорорганических нейротоксинов // Усп. биол. химии. 2004. Т. 44. С. 307–340.
4. Ефременко Е.Н., Вотчицева Ю.А., Курочкин И.Н., Варфоломеев С.Д., Гачок И.В., Завьялова Н.В., Капашин В.П., Холстов В.И. Способ ферментативного гидролиза боевых отравляющих веществ // Патент РФ на изобретение № 2296164 (27.03.2007). Бюл. № 9.
5. Ефременко Е.Н., Завьялова Н.В., Лягин И.В., Сенько О.В., Гудков Д.А., Аксенов А.В., Степанов Н.А., Сироткина М.С., Спиричева О.В., Иванов Р.В., Лозинский В.П., Варфоломеев С.Д., Кондратьев В.Б., Холстов В.И. Способ биоразложения фосфорорганических соединений в составе реакционных масс, получаемых после химического уничтожения вещества типа Vx // Патент РФ на изобретение № 2408724 (10.01.2011). Бюл. № 1.
6. Ефременко Е.Н., Лягин И.В., Сенько О.В., Сироткина М.С., Завьялова Н.В. Имобилизованные гетерогенные биокатализаторы для разложения С-Р-связи в продуктах уничтожения фосфорорганических отравляющих веществ // Вестн. РНДН. Сер. «Экология и безопас. жизнедеят.». 2011. № 1. С. 61–66.
7. Lee Y., Chadha S., Riecker A., Mendum T., Puglia J.P., Rastogi V. Dynamic nanocomposite self-deactivating fabrics for the individual and collective protection // DTIC OAI Technical Report No. ADA481575. Waltham, MA: Foster-Miller Inc. 2006. 9 p.
8. Ефременко Е.Н., Завьялов В.В., Завьялова Н.В., Гореленков В.К., Гудков Д.А., Лягин И.В., Варфоломеев С.Д., Холстов В.И. Фильтрующе-сорбирующий самодезагазирующийся материал для средств индивидуальной защиты от воздействия фосфорорганических соединений // Патент РФ на изобретение № 2330717 (10.08.2008). Бюл. № 22.
9. Резниченко С., Гореленков В., Шубина О., Шашков С., Шмидт Н., Барбулев С., Перцовский Г., Барбулев Д., Ананьев В. Сквозь огонь, кислоты, непогоду... // Химия и бизнес. 2007. № 1(80). С. 47–49.
10. Гореленков В.К., Онойко В.Я., Соболев Ю.П., Шашков С.Л. Пути создания материалов для перспективной боевой экипировки мирного и военного времени военнослужащих общевойсковых подразделений Российской армии. М.: ВА РХБЗ, 2001. 166 с.
11. Легин Г.Я., Шехтман И.М., Андреев В.М. Консервация косметических изделий и эффективные современные консерванты // Хим. фармац. журн. 1983. № 3. С. 1–36.
12. Gaberc-Porekar V., Menart V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography // J. Biochem. Bioph. Meth. 2001. V. 49. P. 335–360.
13. Ефременко Е.Н., Лягин И.В., Галаев И.Ю., Плиева Ф.М., Варфоломеев С.Д., Маттиассон Б. Способ получения биокатализатора и биокатализатор для детоксикации фосфорорганических нейротоксичных соединений в проточных системах // Патент РФ на изобретение № 2315103 (20.01.2008). Бюл. № 2.
14. Efremenko E.N., Lyagin I.V., Plieva F.M., Galaev I.Y., Mattiasson B. Dried-reswollen immobilized biocatalysts for detoxification of organophosphorous compounds in the flow systems // Appl. Biochem. Biotechnol. 2009. V. 159. P. 251–260.
15. Харечко А.Т., Мяких А.В., Колесников И.О., Колесников Д.П., Королев В.Д., Лысов А.А., Матущенко Ю.А., Завьялова Н.В., Климентьев Ю.А. Штамм *Pseudomonas species* 78Г, предназначенный для деградации продуктов деструкции фосфорорганических отравляющих веществ // Патент РФ на изобретение № 2154103 (10.08.2000). Бюл. № 22.
16. Ефременко Е.Н., Лягин И.В., Сироткина М.С. Способ ферментативного гидролиза фосфорорганических соединений в почвогрунте // Заявление на патент РФ на изобретение № 2011100231 (приоритет от 12.01.2011).