

ДОСЛІДЖЕННЯ, ОПИС ТА ПОРІВНЯННЯ КАТАЛАЗНОЇ АКТИВНОСТІ ВУГЛЕЦЕВИХ СОРБЕНТІВ ТИПУ СКН ТА КАУ

Досліджено кінетику каталітичної реакції розкладання пероксиду водню у водних розчинах різної концентрації (від 1 до 8 %) вуглецевими сорбентами типу СКН і КАУ та їх модифікованими формами (окиснені в Н- та сольовій Fe (III)-формі) при різних значеннях рН (4,8; 5,8; 6,8 та 7,8) порівняно з активністю ферменту каталази. Застосовано закони кінетики ферментативних реакцій для опису процесів каталітичного розкладання пероксиду водню та визначено залежність константи Міхаеліса-Ментен від рН для каталітичних реакцій, які прискорюються дослідженими матеріалами та каталазою. Показано, що активність вуглецевих сорбентів нижча порівняно з активністю каталази. Серед досліджених матеріалів окиснена форма СКН та модифікована залізом форма КАУ при досліджуваних значеннях рН мають найбільшу каталазну активність, що може знайти застосування у еферентній медицині та біотехнології.

Вступ

Погіршення стану навколишнього середовища на тлі постійного техногенного впливу призводить до зростання рівня захворюваності у населення. Екстракорпоральні методи детоксикації успішно використовуються при лікуванні цих захворювань [1]. На сьогоднішній день вуглецеві пористі матеріали займають провідне місце серед сорбентів медичного призначення [2]. Багаторічний досвід використання гемо- та ентесорбентів вказує на те, що їхня терапевтична активність пов'язана не тільки з сорбцією шкідливих та отруйних речовин і метаболітів із біологічних середовищ, але й із впливом на метаболічні шляхи організму, включаючи такі ферментативні процеси, як гідроліз білків, жирів і складних ефірів, інверсія сахарози, розкладання пероксидів, сечовини тощо [3-7]. При цьому сорбенти можуть виконувати різні функції. По-перше, вони здатні виявляти власну ензимоподібну активність в окисно-відновних та протектичних процесах. По-друге, сорбенти можна модифікувати, наприклад, шляхом їх окиснення та подальшого введення на їхню поверхню іонів різних металів, комплексів або інших лігандів, підсилюючи таким чином каталітичну здатність вуглецевого матеріалу. По-третє, вуглецеві сорбенти можуть бути носіями іммобілізованих ферментів та впливати на активність останніх.

Перебіг ферментативних реакцій у присутності вуглецевих сорбентів із розвинутою поверхнею може бути суттєво змінено - загальмовано або прискорено. Це визначається природою сорбентів, їхніми структурно-сорбційними властивостями та хімією поверхні. Знання закономірностей такого впливу відкриває можливість створення сорбентів спрямованої терапевтичної

дії, а також біокаталізаторів на основі іммобілізованих на поверхні твердих тіл ензимів для біотехнологічних процесів та біосенсорики.

Метою дослідження є вивчення та кількісна оцінка каталітичної (каталазної) активності вуглецевих сорбентів типу СКН, КАУ та низки їхніх модифікованих форм (окиснені в Н-формі та сольовій Fe (III)-формі) в модельній реакції розкладання пероксиду водню при різних значеннях рН порівняно з активністю ферменту каталази.

1. Матеріали та методи дослідження

1.1. Обладнання, реагенти й об'єкти дослідження

Процес розкладання пероксиду водню досліджували при 298 К в термостатованій комірці з перемішуванням. Об'єм розчину пероксиду водню в кожному досліді становив 50 мл, маса важкого вуглецевого сорбенту - 0,1 г, а кількість каталази - 1 мл (каталаза з печінки бика, К 1.11.1.6, активність 3300 о. а.). Аналіз зміни концентрації пероксиду водню в часі проводили при періодичному відборі проб, дослід відбувався протягом 30 хв. Концентрацію розчинів H_2O_2 визначали методом перманганатометрії. У роботі використовували хімічні реактиви марки «ч. д. а». Як вихідне використовували вугілля медичного призначення зразка СКН та КАУ, яке під час дослідження окиснювали азотною кислотою до певних значень статичної об'ємної ємності (CO_2 мг-екв/г) [8], а потім із нього одержували сольову шляхом модифікування розчином $FeCl_3$. Було визначено структурно-сорбційні характеристики сорбентів: об'єм сорбційних пор (V) за бензолом ексікаторним методом, площу питомої поверхні сорбентів ($S_{пит}$) методом термічної десорбції ар-

гону, а також їх СОЕ. Кількість заліза у сольових формах сорбентів визначали за допомогою атомно-абсорбційного спектрометра КАС-120.1, аналізуючи розчини після обробки зразків гарячим 0,1 Н розчином соляної кислоти.

Характеристики досліджених зразків вугілля наведено в таблиці 1.

Таблиця 1. Характеристики дослідженого вугілля

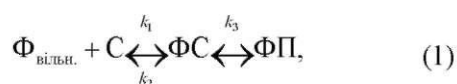
Марка вугілля	СОЕ, мг-екв/г	Vs, см ³ /г	Спит, м ² /г	Кількість Fe, мг/г
КАУ	0,25	0,51	1070	-
КАУ	1,30	0,84	1850	-
КАУ _{Fe}	-	-	-	11,4
СКН	0,25	0,75	1970	-
СКН	2,10	0,78	2140	-
СКНFe	-	-	-	10,3

Нами було досліджено кінетику реакції розкладання пероксиду водню у водних розчинах з концентрацією від 1 до 8 % у присутності активованих, окиснених та сольових форм вугілля порівняно з ферментом каталазою. Досліди проводили при значеннях рН 4,8; 5,8; 6,8 та 7,8, які підтримували фосфатним буфером.

1.2. Кількісна оцінка каталазої активності вуглецевих сорбентів

Щоб отримати кількісні дані для порівняння каталітичної здатності вуглецевих сорбентів з активністю каталази, було застосовано закономірності кінетики ферментативних реакцій до реакцій, у яких пероксид водню розкладався під дією вуглецевих адсорбентів та каталази [9, 10].

У цьому разі утворення фермент-субстратного комплексу при взаємодії ферменту із субстратом представлено схемою:



де $\Phi_{\text{вільн.}}$ - вільний фермент, С - субстрат, ΦC - фермент-субстратний комплекс, ΦP - комплекс фермент-продукт.

Початкова швидкість реакції (V_0) (утворення продукту) залежить від початкової концентрації фермент-субстратного комплексу

$$V_0 = k_3 [\Phi C]. \quad (2)$$

В умовах стаціонарного стану реакції, коли швидкість утворення ΦC однакова, одержуємо:

$$\frac{d[\Phi C]}{dt} = 0 = k_1 [\Phi_{\text{вільн.}}] \cdot [C] - (k_2 + k_3) \cdot [\Phi C], \quad (3)$$

$$\text{або } [\Phi C] = \frac{[\Phi_{\text{загальн.}}] \cdot [C]}{[C] + \frac{k_2 + k_3}{k_1}} = \Phi_{\text{загальн.}} \cdot \frac{[C]}{[C] + K_m}. \quad (4)$$

Величину $K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$ називають констан-

тою Міхаеліса-Ментен. Щоб перейти до початкової швидкості реакції, множать обидві частини рівняння на k^3 і заміняють $k^3 [\Phi C]$ на V_0 , тоді маємо:

$$V_0 = k_3 [\Phi_{\text{загальн.}}] \cdot \frac{[C]}{[C] + K_m}, \quad (5)$$

$$\text{або } V_0 = k_3 [\Phi_{\text{загальн.}}] \cdot \frac{1}{\frac{K_m}{[C]} + 1}. \quad (6)$$

За умови $[C] \gg K_m$

$$V_0 = V_{\text{макс}} = k_3 [\Phi_{\text{загальн.}}], \quad (7)$$

$$\text{або } V_0 = \frac{V_{\text{макс}} \cdot [C]}{[C] + K_m}, \quad (8)$$

$$\text{або } K_m = [C] \cdot \left(\frac{V_{\text{макс}}}{V_0} - 1 \right), \quad (9)$$

де K_m - константа Міхаеліса-Ментен, мМ; $[C]$ - концентрація субстрату, г-екв/л; V - максимальна швидкість реакції, г-екв/ст; V_0 - початкова швидкість реакції, г-екв/ст. Рівняння (8) та (9) відомі як рівняння Міхаеліса-Ментен.

Константа Міхаеліса-Ментен [9, 10] є важливою характеристикою оцінки активності ферменту. K_m чисельно дорівнює концентрації субстрату, при якій швидкість реакції дорівнює половині максимальної. Вважається, чим менша величина константи Міхаеліса-Ментен, тим фермент активніший.

Для визначення константи Міхаеліса-Ментен знаходять початкову швидкість реакції при різних концентраціях субстрату. Всі інші умови дослідують постійними. Отримані результати використовують для побудови графіка залежності початкової швидкості реакції від концентрації субстрату в координатах Міхаеліса (V_0 від $[C]$) або в зворотних координатах за методом Лайнвівера та Берка ($1/V_0$ від $1/[C]$). З графіка залежності $1/V_0$ від $1/[C]$ шляхом екстраполяції прямої до перетину з віссю абсцис розраховують величини K та V :

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\text{макс}}} \cdot \frac{1}{[C]} + \frac{1}{V_{\text{макс}}}.$$

2. Результати та їх обговорення

2.1. Кінетика розкладання пероксиду водню об'єктами дослідження

На рис. 1 наведено кінетичні криві реакції розкладу пероксиду водню дослідженими сор-

бентами та каталазою при pH 5,8. Видно, що фермент каталаза є найактивнішим у цій реакції. Можна зазначити, що, як і очікувалось, синтетичне вугілля типу СКН та його модифіковані форми більш активні у розкладі пероксиду водню, ніж відповідні зразки кісточкового вугілля КАУ. Причини цього, вочевидь, пов'язані з будовою вуглецевих матриць, що обумовлює електронодонорну здатність матеріалу, ступенем розвиненості поверхні та концентрацією поверхневих активних кластерів.

За здатністю розкласти пероксид водню у досліджених умовах (за каталазною активністю) матеріали можна розташувати в такій послідовності:

Каталаза > СКН > СКН₀ >
> СКН_{Fe} > КАУ_{Fe} > КАУ > КАУ₀

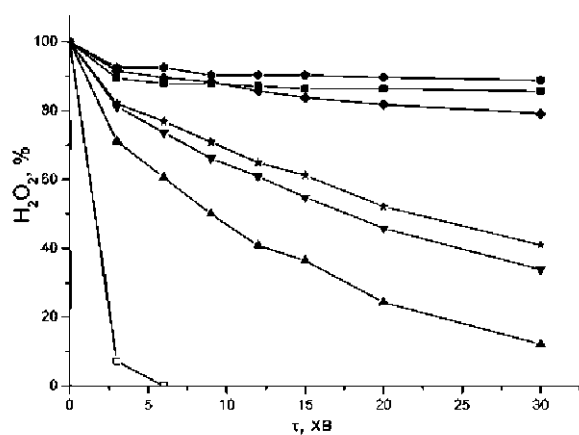


Рис. 1. Кінетика розкладання H_2O_2 за умов $V_{H_2O_2} = 50$ мл, $C_{к.т.} = 1\%$, $pH_{к.т.} = 5,8$ в присутності: (■) – КАУ; (●) – КАУ₀; (▲) – СКН; (▼) – СКН₀; (◆) – КАУ_{Fe}; (★) – СКН_{Fe}; (:) – каталаза

2.2. Залежність активності вуглецевих сорбентів від pH середовища

На рис. 2 наведено залежність для вугілля типу КАУ та його модифікованих форм від pH розчину. Видно, що каталітична активність вугілля типу КАУ та КАУ-Fe висока та майже однакова у дослідженому інтервалі pH, тоді як окиснене вугілля втрачає активність зі збільшенням pH після 5,8. Це зумовлено тим, що окиснене вугілля більш електронегативне, ніж вихідне, і характеризується підвищеною роботою виходу електрона через виникнення значного стрибка потенціалу C - O на межі розподілу фаз [11, 12, 13], тобто на його поверхні перенесення електронів до субстрату проходить важче, ніж за відсутності кисневмісних груп. Введення на поверхню окисненого вугілля КАУ іонів заліза практично відновлює ензимоподібну здатність матеріалу до рівня вихідного вугілля. Це можна пояснити зникненням електронегативності окисненої поверхні

вугілля та утворенням поверхневих координаційних сполук, які в таких умовах сприяють перенесенню електронів з вугілля, тобто каталітичній дії. Це узгоджується з добре відомим фактом збільшення каталітичної активності іонів заліза (III) в гомогенних умовах, якщо вони утворили хелатні сполуки з винною, саліциловою та іншими органічними кислотами [8].

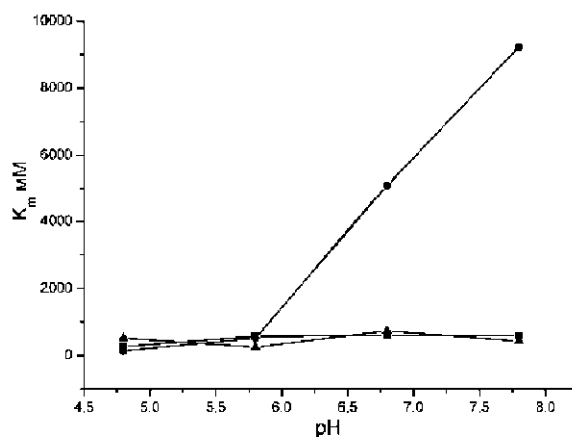


Рис. 2. Залежність константи Міхаеліса-Ментен від pH: (■) – КАУ; (●) – КАУ₀; (▲) – КАУ₀-Fe

Вугілля типу СКН проявляє значно більшу активність у реакції розкладання пероксиду водню, ніж вугілля типу КАУ (рис. 1). Це пов'язується з будовою графітоподібної ґратки та з присутністю в СКН атомів азоту, які збільшують основність сорбентів, що змінює заряд поверхні вугілля та збільшує ємність подвійного електричного шару [3, 5, 8]. З аналізу кінетичних кривих можна зробити висновок, що окиснення вугілля типу СКН призводить до незначного погіршення його здатності розкласти H_2O_2 , але присутність заліза в сольовій формі не відновлює активність до значень вихідної форми вугілля

На рис. 3 наведено залежність від pH для вугілля типу СКН та його модифікованих форм. Видно, що окиснення сорбенту типу СКН не змінює вигляд кривої залежності від pH. Ці матеріали проявляють приблизно однакову активність в інтервалі pH від 5 до 7. Модифікування СКН іонами Fe^{3+} значно звужує цей інтервал. Можна сказати, що сольова форма вугілля активна при pH нижче 5,2. У той же час в інтервалах pH 5,2-6,3 та >6,8 ензимоподібна каталазна функція такого вуглецевого матеріалу значно знижена. Вочевидь, тут слід більш ретельно вивчити форми утворення комплексів заліза на поверхні вугілля при іонному обміні - аніонообмінні властивості вугілля СКН залишаються досить сильними і достатніми для утворення на поверхні гідроксидних кластерів заліза (III), які пасивують електронодонорну здатність поверхні вугле-

цевого матеріалу. З рис. 3 видно, що залежність константи Міхаеліса-Ментен від рН у залізної форми вугілля СКН⁰ досить складна для аналізу і потребує додаткових досліджень.

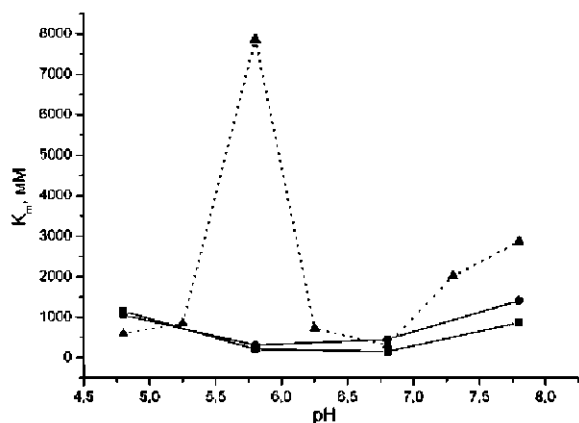


Рис. 3. Залежність константи Міхаеліса-Ментен від рН: (■) – СКН; (●) – СКН⁰; (▲) – СКН⁰-Fe

2.3. Порівняльний аналіз каталазної активності вуглецевих сорбентів

Каталітичну здатність вуглецевих сорбентів розкласти пероксид водню було порівняно з даними для каталази, активність якої вивчено в тих само умовах, що й для сорбентів. Показано, що каталаза має найнижчі показники константи Міхаеліса-Ментен в усьому дослідженому інтервалі рН (рис. 4-6).

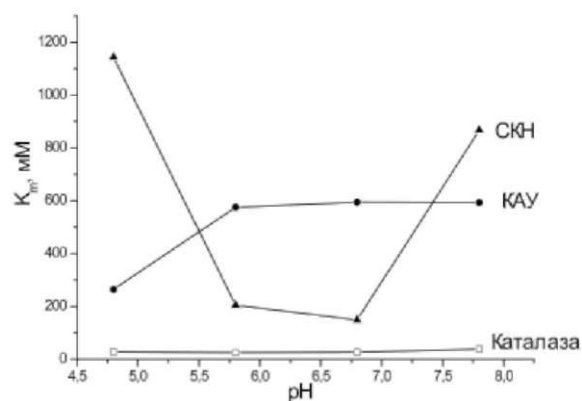


Рис. 4. Залежність константи Міхаеліса-Ментен від рН для каталази і зразків активнованого вугілля КАУ та СКН

Порівнюючи активність каталази з досліджуваними об'єктами, можна зробити висновок про те, що вугілля типу СКН⁰ та сольова форма вугілля типу КАУ проявляють активність, подібну до ферменту каталази, тоді як решта досліджених зразків активнованого вугілля типу СКН та КАУ проявляють незначну активність в реакції розкладання пероксиду водню в рН інтервалі від 4,5 до 8. Висока активність згаданих модифікованих

форм активнованого вугілля може знайти використання для створення біокаталізаторів спрямованої лікувальної дії.

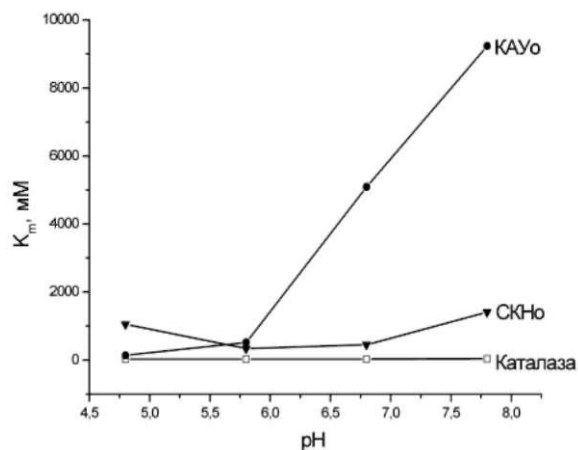


Рис. 5. Залежність константи Міхаеліса-Ментен від рН для каталази і зразків окисненого вугілля КАУ та СКН

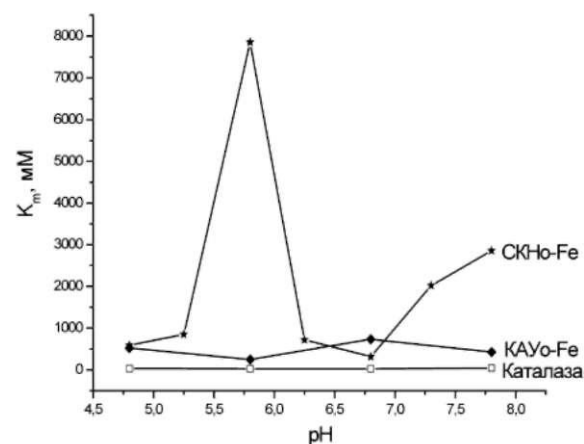


Рис. 6. Залежність константи Міхаеліса-Ментен від рН для каталази і сольових форм вугілля КАУ та СКН

Висновки

Досліджено кінетику каталітичного розкладання водних розчинів пероксиду водню різної концентрації (від 1 до 8 %) при різних значеннях рН (4,8; 5,8; 6,8 та 7,8) вуглецевими сорбентами типу СКН і КАУ та їхніми модифікованими формами (окиснені в Н- та сольовій Fe(III)-формі) порівняно з ферментом каталазою (каталаза з печінки бика, К 1.11.1.6, активність 3300 о. а.). Застосовано закони кінетики ферментативних реакцій для опису процесів каталітичного розкладання пероксиду водню та визначено залежність константи Міхаеліса-Ментен від рН для каталітичних реакцій, які прискорюються дослідженими матеріалами та каталазою. Встановлено, що з точки зору кінетики ферментативних реакцій можна дати кількісну оцінку ензимоподібної активності вугле-

цевих сорбентів, що дає змогу порівнювати їхні властивості з активністю відповідного ферменту. Зіставлення констант Міхаеліса-Ментен ряду вуглецевих матеріалів і каталази показало, що активність вуглецевих сорбентів нижча за активність каталази. Встановлено, що модифіковані форми сорбентів типу СКН та КАУ

(окиснена форма СКН та модифікована залізом форма КАУ) активніші, ніж інші досліджені адсорбенти, що має велике значення при використанні цих вуглецевих матеріалів як медичних сорбентів (гемо- та ентеросорбція), а також при створенні ефективних каталізаторів для біотехнологій.

1. Николаев В. Г., Стрелко В. В. Гемосорбция на активированных углях. - Киев: Наукова думка, 1979. - 288 с.
2. Стрелко В. В., Картель Н. Т. Активные угли медицинского назначения. - В кн.: Наукові основи розробки лікарських препаратів. - Харків: Основа, 1998. - С. 490-516.
3. Ставицкая С. С., Стрелко В. В., Цыба Н. Н. и др. Пути направленного регулирования каталазной активности углеродных материалов из разного сырья // Экотехнологии и ресурсосбережение. - 2006. - № 4. - С. 12-19.
4. Ставицкая С. С., Стрелко В. В. Каталитические свойства углеродных энтеросорбентов // Теорет. и эксперим. химия. - 1995. - Т. 31, № 2. - С. 76-80.
5. Ставицкая С. С., Тарковская И. А., Пертенко Т. П. Основные факторы, определяющие каталитические свойства активных углей // Теорет. и эксперим. химия. - 1996. - Т. 32, № 6. - С. 336-344.
6. Тарковская И. А., Ставицкая С. С., Томашевская А. Н. и др. Сорбционные и каталитические свойства модифицированных углеродных материалов // Адсорбция и адсорбенты. - 1983. - № 11. - С. 68-76.
7. Щербинский А. Б., Картель Н. Т., Михаловский С. В. Исследование закономерностей разложения перекиси водорода углеродными гемосорбентами // Адсорбция и адсорбенты. - 1983. - № 11. - С. 80-84.
8. Тарковская И. А. Окисленный уголь. - К.: Наукова думка, 1981. - 200 с.
9. Березин И. В., Клячко Н. Л., Левашов А. В., Мартинек К. В., Можяев В. В., Хмельницкий Ю. Л. - Имобилизованные ферменты. М.: Высшая школа, 1987. - 160 с.
10. Практикум по биохимии / Под ред. Н. П. Мешковой и С. Е. Северина. - М.: Изд-во МГУ им. М. В. Ломоносова, 1979. - 430 с.
11. Стражеско Д. Н. Электрофизические свойства активных углей и механизм процессов, происходящих на их поверхности // Адсорбция и адсорбенты. - 1976. - № 4. - С. 3-14.
12. Тарковская И. А., Ставицкая С. С., Стрелко В. В. Каталитические свойства азотсодержащих углей // Украинский химический журнал. - 1983. - Т. 49, № 1. - С. 16-20.
13. Стрелко В. В., Глуховский П. В., Картель Н. Т. Влияние внешней поляризации угля с иммобилизированной каталазой на эффективность разложения H_2O_2 // Украинский химический журнал. - 1994. - Т. 60, № 10. - С. 677-681.

K. Glevatska, O. Bakalinska, M. Kartel

ANALYSIS, DESCRIPTION AND COMPARISON OF CATALASE LIKE ACTIVITY OF SCN AND KAU TYPE CARBON ADSORBENTS

Kinetics of catalytic reactions of hydrogen peroxide decomposition of different concentration (from 1 up to 8 %) in water solutions by carbon adsorbents of SCN and KAU type which are used as hemo- and enterosorbents, and their modified forms (oxidized in H- and Fe(III)-form) at different values pH values (4,8; 5,8; 6,8 and 7,8) in comparison with activity of enzyme catalase is investigated. Enzyme kinetics laws are applied to the description of hydrogen peroxide decomposition process. Dependence of Michaelis-Menten constant from pH for reactions which are accelerated by the investigated materials and catalase is determined. It was shown, that oxidized form of SCN and Fe(III)-form of KAU adsorbents demonstrated higher catalytic activity from investigated adsorbents. This fact can find use in efferent medicine and biotechnology.