

ДОСЛІДЖЕННЯ УРЕАЗНОЇ АКТИВНОСТІ ВУГЛЕЦЕВИХ СОРБЕНТІВ

Досліджено ферментоподібну (уреазну) активність вихідних та модифікованих (окиснених у H^+ -формі) зразків вугілля типу СКН та КАВ, а також адсорбційно іммобілізованої на їх поверхні уреазу при рН 7,2 та порівняно з активністю нативного ферменту. Застосовано закони кінетики ферментативних реакцій для кількісного оцінювання ензиматичної активності обраних об'єктів шляхом розрахунку констант Міхаеліса із кінетичних кривих розкладання сечовини в інтервалі субстрату 1–10 г/л. Показано, що окиснення поверхні вугілля збільшує його уреазну активність, а саме: для вугілля типу СКН – у більш, ніж три рази, а для вугілля типу КАВ – у два рази. Іммобілізація уреазу призводить до синтезу матеріалів, активність яких зівставна з активністю ферменту, при цьому у випадку іммобілізації уреазу на вугіллі КАВ₀ його активність навіть більша за активність ензиму. Досліджено каталітичну активність ферменту та вугілля СКН₀ із іммобілізованою уреазою в інтервалі рН 6,2–7,8. Показано, що іммобілізація уреазу на вугіллі СКН₀ призводить до збільшення ферментативної активності сорбенту у кислої ділянці, що є перспективним для створення ефективних масообмінних пристроїв для лікування уремічних захворювань сорбційними методами (гемо- та ентеросорбція) на основі вугілля марок СКН та КАВ.

Ключові слова: каталіз, розкладання сечовини, вуглецеві адсорбенти, уреазу.

Вступ

Розвиток біотехнології в останні десятиріччя сприяє зростанню кількості біотехнологічної продукції, яка використовується в медицині, фармацевтиці, сільському господарстві та виробництві хімікатів. В основі цього розвитку є здатність біологічних систем до розпізнавання і виконання каталітичних функцій. Переваги біотехнологічних методів обумовлені спрямованою специфічною дією ферментів, яка дозволяє здійснювати надзвичайно тонкі перетворення з використанням простих систем, у той час як аналогічні хімічні перетворення потребують багатостадійних синтезів; легко відтворюваними умовами дії ферментів, оскільки вони зазвичай функціонують у водних середовищах і при температурах не вище 80 °С; невеликою кількістю побічних продуктів і шкідливих для біосфери відходів [1].

Основні напрями сучасної біотехнології передбачають розробку сорбційних матеріалів із метою подальшого їх використання при конструюванні високоефективних препаратів іммобілізованих ферментів, що можуть застосовуватись у медицині як гемо- і ентеросорбенти та біотехнології як каталізатори нового покоління [2].

Ферменти та ферментні системи відіграють важливу роль в життєдіяльності людини. Недостатність або надмірна кількість того чи іншого ферменту може призвести до тяжкого захворювання (дібет, фенілкетонурія тощо). Поповнити відсутні ферменти можна або ін'єкційним шля-

хом, або із застосуванням екстракорпоральних масообмінників із іммобілізованими ферментами [3–45]. Сучасні детоксикаційні технології широко використовують такий матеріал, як активоване вугілля. Його терапевтична дія зумовлена не тільки адсорбційною здатністю поглинати шкідливі й токсичні речовини, а й каталітичною активністю [6]. Оцінити внесок каталітичної дії у детоксикаційні процеси, навчитися керувати каталітичною дією сорбентів шляхом модифікування їхньої поверхні ферментами, розробити методи оцінки та регуляції каталітичної здатності вуглецевих матеріалів є важливою проблемою розвитку сучасних сорбційних детоксикаційних технологій. Актуальною є розробка ефективних масообмінників з іммобілізованою уреазою для розкладання уремічних токсинів, які накопичуються в організмі хворих на ниркову недостатність для їх лікування [7].

Метою студії є дослідження ферментативної активності нативної уреазу, вугілля медичного призначення типу СКН та КАВ, іммобілізованої на поверхні вугілля уреазу, в модельній реакції розкладання сечовини.

Експериментальна частина

Об'єкти дослідження

Уреазу *Jack Beans*, 3.5.1.5, активність 791 од./мл.
Вугілля медичного призначення типу СКН та КАВ, а також їх окиснені аналоги (окиснення

азотною кислотою у рідкій фазі до певних значень статичної обмінної ємності (СОЄ) [8]). Було визначено структурно-сорбційні характеристики сорбентів: об'єм сорбційних пор (V_s) за бензолом ексікаторним методом, площу питомої поверхні ($S_{\text{пит}}$) методом термічної десорбції аргону, статичну обмінну ємність.

Використано хімічні реактиви марки «ч.д.а».

Характеристики досліджених зразків вугілля наведено в табл. 1.

Таблиця 1. Характеристики дослідженого вугілля

Марка вугілля	V_s , см ³ /г	$S_{\text{пит}}$, м ² /г	СОЄ, мг-екв/г
КАВ _{акт}	0,50	1070	0,25
КАВ _о	0,85	1850	1,30
СКН _{акт}	1,25	1930	0,25
СКН _о	1,15	1930	1,40

Методи дослідження

Реакцію розкладання сечовини досліджували при 298 К у термостатованій комірці з перемішуванням. Об'єм розчину сечовини в кожному досліді становив 50 мл, маса наважки вуглецевих сорбентів дорівнювала 1 г, кількість уреазу – 10 мкл.

У кінетичних експериментах використовували водні розчини сечовини концентрацією 1, 2, 4, 6, 8 та 10 г/л. Для вугілля марки СКН_о та нативної уреазу досліді проводили при значеннях рН-розчину сечовини 6,2, 6,8, 7,2 та 7,8, які стабілізували фосфатним буфером 1/15 н.

Аналіз змін концентрації сечовини в часі проводили при періодичному відборі проб, дослід тривав 40 хв. Концентрацію розчинів сечовини визначали за накопиченням йонів амонію, які утворюються при розкладанні сечовини, а також фотоколориметричним методом за інтенсивністю забарвлення при реакції йонів амонію із реактивом Несслера [9].

У ході дослідження припускали, що в реакції розкладання сечовини активоване вугілля та його модифіковані форми виступають як ферменти, тому всі розрахунки проводили згідно із законами ферментативної кінетики. Активність зразків кількісно оцінювали константою Міхаеліса [10], яку визначали за кінетичними кривими утворення йонів амонію у реакційному середовищі. У всіх випадках при визначенні активності брали середнє значення трьох паралельних дослідів. Похибка визначення активності уреазу не перевищує 10 %. Константу Міхаеліса визначають за початковою швидкістю реакції при різних концентраціях субстрату. З графіка залежності $1/V_0$ від $1/[C]$ шляхом екстраполяції прямої до перетину з віссю абсцис розраховують величини K_m і $V_{\text{макс}}$ за формулою:

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

Уреазну активність вуглецевих сорбентів порівнювали з активністю нативної уреазу.

Результати та їх обговорення

Кінетика розкладання сечовини об'єктами дослідження

Нами було досліджено кінетику розкладання сечовини за накопиченням концентрації йонів амонію у реакційному середовищі нативною уреазою (рис. 1), досліджуваними об'єктами. На рис. 2 та рис. 3, як приклад, наведено кінетику розкладання сечовини вугіллям СКН_о та уреазою, іммобілізованою на ньому.

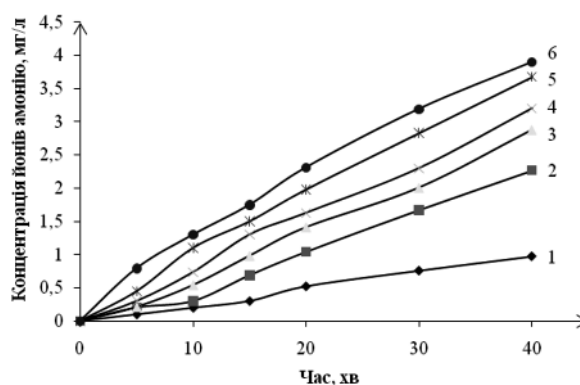


Рис. 1. Кінетичні криві розкладання сечовини нативною уреазою при рН 6,2 для різних вихідних концентрацій сечовини, г/л: 1 – 1,0; 2 – 2,0; 3 – 4,0; 4 – 6,0; 5 – 8,0; 6 – 10,0

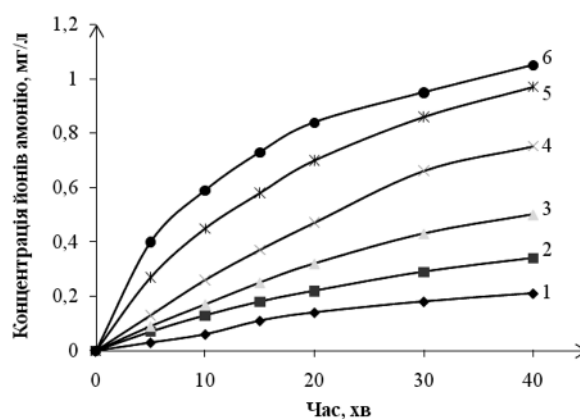


Рис. 2. Кінетичні криві розкладання сечовини вугіллям СКН_о при рН 7,2 для різних вихідних концентрацій сечовини, г/л: 1 – 1,0; 2 – 2,0; 3 – 4,0; 4 – 6,0; 5 – 8,0; 6 – 10,0

На основі кінетичних кривих було розраховано константи Міхаеліса для досліджених каталізаторів при рН 7,2 (табл. 2).

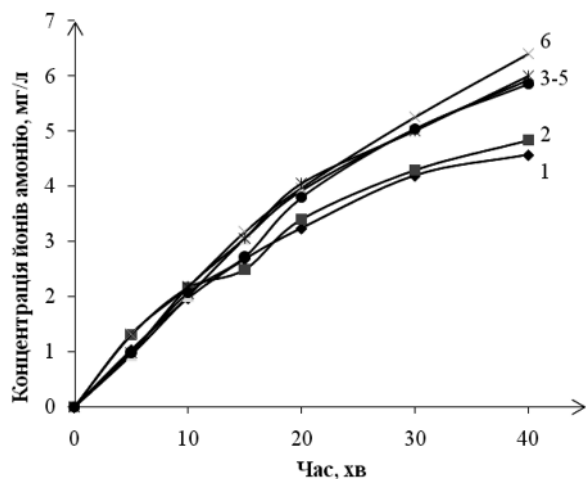


Рис. 3. Кінетичні криві розкладання сечовини вугіллям SKH₀ з іммобілізованою уреазою при pH 6,2 для різних вихідних концентрацій сечовини, г/л: 1 – 1,0; 2 – 2,0; 3 – 4,0; 4 – 6,0; 5 – 8,0; 6 – 10,0

Таблиця 2. Константи Міхаеліса для досліджених систем

Каталізатор	K_m , мМ			
	Активовані		Окиснені	
	Вихідні	Із уреазою	Вихідні	Із уреазою
Уреаза	205			
СКН	1393	268	410	289
КАВ	1275	980	616	106

Розрахунки K_m дозволили розташувати каталізатори у порядку зниження їхньої активності:

$$\begin{aligned} \text{КАВ}_0 + \text{Ур.} > \text{Уреаза} > \text{СКН}_{\text{акт}} + \text{Ур.} > \\ \text{СКН}_0 + \text{Ур.} > \text{СКН}_0 > \text{КАВ}_0 > \text{КАВ}_{\text{акт}} + \text{Ур.} > \\ \text{КАВ}_{\text{акт}} > \text{СКН}_{\text{акт}} \end{aligned}$$

Залежність активності вуглецевих сорбентів від pH-середовища

Дослідження та порівняння залежності активності вугілля типу СКН₀ із іммобілізованим ферментом та нативною уреазою від pH (рис. 4) свідчить про те, що pH-оптимум нативного ензиму перебуває в ділянці pH = 6,8, що збігається із літературними даними [11]. Іммобілізація уреаз на вугіллі СКН₀ призводить до збільшення активності сорбенту у кислої ділянці. Нанесення уреаз на вуглецеві окиснені носії [12], поліетилен із прищепленою поліакриловою кислотою [13], хітозан та альгінат [14], композитні мембрани з хітозану та поліакрилонітрилу [15], алкіламін та ариламін [16], також розширює інтервал pH-активності іммобілізованого ферменту. Функціоналізація поверхні носія, зокрема, поверхня із більшим вмістом функціональних груп із рухливим протоном сприяє ефективній іммобілізації уреаз.

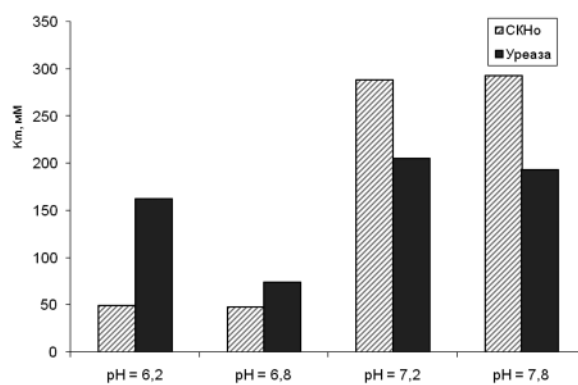


Рис. 4. Залежність активності вугілля типу СКН₀ із адсорбційно іммобілізованою уреазою та нативної уреазі від pH

Порівняльний аналіз уреазної активності вуглецевих сорбентів

Аналіз каталітичної (уреазної) активності сорбентів типу СКН показує (рис. 5), що активоване вугілля СКН_{акт} менш активне, ніж його окиснений аналог СКН₀, що може бути зумовлене наявністю кисневмісних функціональних груп на поверхні останнього. Значення K_m становить для вугілля СКН_{акт} – 1393 мМ, СКН₀ – 410 мМ, тоді як для нативної уреазі – 205 мМ, що свідчить про високу уреазну активність сорбенту СКН₀. Адсорбційна іммобілізація уреаз на поверхні вугілля типу СКН є ефективною та призводить до створення каталізаторів, активність яких зіставна з нативним ферментом. При цьому наявність кисневмісних функціональних груп на поверхні вугілля типу СКН практично не впливає на ефективність іммобілізації уреазі. Значення K_m (активність) для каталізаторів із іммобілізованою уреазою на 30–40 % відмінні від активності нативної уреазі, що свідчить про збереження активності ферменту (високу ефективність) при іммобілізації.

Аналіз каталітичної (уреазної) активності сорбентів типу КАВ показує (рис. 6), що активоване вугілля КАВ_{акт} також менш активне, ніж його окиснений аналог КАВ₀, що також може бути зумовлене наявністю кисневмісних функціональних груп на поверхні останнього. Значення K_m становить для вугілля КАВ_{акт} – 1275 мМ, КАВ₀ – 616 мМ, а для нативної уреазі – 205 мМ. Адсорбційна іммобілізація уреаз на поверхні вугілля типу КАВ є ефективною у випадку іммобілізації до поверхні сорбенту КАВ₀ (K_m = 106 мМ) і дозволяє одержати каталізатор, активність якого вища за активність нативного ферменту, та незначною мірою змінює активність активованого сорбенту при іммобілізації ферменту (K_m = 980 мМ). При цьому наявність кисневмісних функціональних груп на поверхні ву-

гілля типу КАВ збільшує ефективність адсорбційної іммобілізації уреазу.

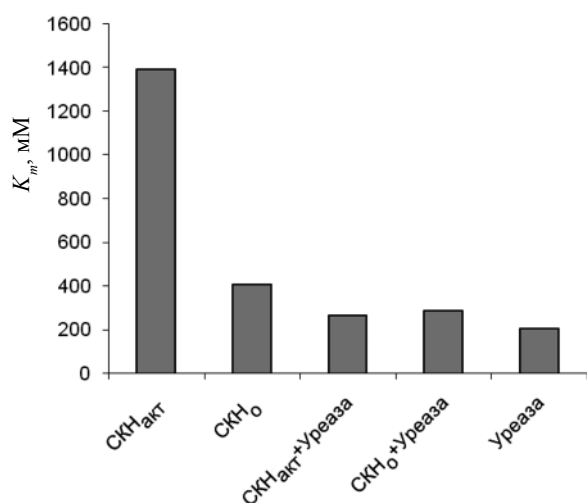


Рис. 5. Активність досліджених сорбентів типу СКН порівняно з уреазою

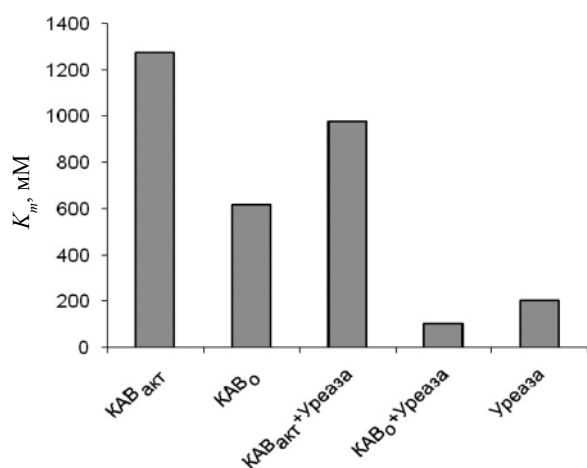


Рис. 6. Активність досліджених сорбентів типу КАВ порівняно з уреазою

При порівнянні активності немодифікованих сорбентів типу СКН та КАВ можна констатувати, що неокиснені сорбенти СКН_{акт} і КАВ_{акт} виявляють незначну уреазну активність, тоді як їхні окиснені аналоги значно активніші у реакції розкладання сечовини. При цьому активність СКН_о більша, за активність КАВ_о, та зіставна з активністю нативного ферменту.

Аналіз активності сорбентів СКН та КАВ, що вміщують фермент, свідчить, що іммобілізація уреазу успішна для всіх носіїв, крім КАВ_{акт}. При цьому, якщо іммобілізація на вугіллі СКН та СКН_о призводить до синтезу матеріалів, активність яких зіставна з активністю ферменту, то активність матеріалу КАВ_о із ферментом навіть більша за активність ензиму.

Висновки

Досліджено ферментоподібну (уреазну) активність зразків вугілля типу СКН та КАВ, їх окиснених зразків у Н⁺-формі, а також адсорбційно іммобілізованої на їх поверхні уреазу при рН 7,2 та порівняно з активністю нативної уреазу. Вперше показано, що як активоване, так і окиснене вугілля марок СКН та КАВ виявляє уреазну активність.

Застосовано закони кінетики ферментативних реакцій для кількісного оцінювання уреазної активності обраних об'єктів шляхом розрахунку констант Міхаеліса із кінетичних кривих розкладання сечовини в інтервалі субстрату 1–10 г/л.

Розрахунки K_m дозволили розташувати каталізатори у порядку зниження їхньої активності: КАВ_о+Ур. > Уреаза > СКН_{акт}+Ур. > СКН_о+Ур. > СКН_о > КАВ_о > КАВ_{акт}+Ур. > КАВ_{акт} > СКН_{акт}.

Показано, що окиснення поверхні вугілля збільшує його уреазну активність, а саме: для вугілля типу СКН – у більш, ніж три рази, а для вугілля типу КАВ – у два рази.

Іммобілізація уреазу призводить до синтезу матеріалів, активність яких зіставна з активністю ферменту ($K_m = 205$ мМ) для вугілля СКН_{акт} ($K_m = 268$ мМ) та СКН_о ($K_m = 289$ мМ), усіх носіїв, окрім КАВ_{акт} ($K_m = 980$ мМ). При цьому, у випадку іммобілізації уреазу на вугіллі КАВ_о, його активність ($K_m = 106$ мМ) навіть більша за активність ензиму.

Досліджено уреазну активність ферменту та вугілля СКН_о із іммобілізованою уреазою в інтервалі рН 6,2–7,8. Показано, що іммобілізація уреазу на вугіллі СКН_о призводить до збільшення уреазної активності сорбенту у кислій ділянці, що є перспективним для створення ефективних масообмінних пристроїв для лікування уремічних захворювань сорбційними методами (гемо- та ентеросорбція) на основі вугілля марок СКН та КАВ.

- [1] Емцов В. Рубежи биотехнологии / В. Емцов – М. : Агропромиздат, 1986. – 159 с.
- [2] Стрелко В. В. Активные угли медицинского назначения / Владимир Стрелко, Николай Картель // Научные основы разработки лекарственных препаратов. – Харьков : Основа, 1998. – С. 490–516.

- [3] Reactor development for immobilized enzyme reaction system / Vos H. J., Groen D. J., Potters J. J., Luyben K. C. (Proc. 4th Eur. Congr. Biotechnol., Amsterdam, June 14-19, 1987). – 1987. – Vol. 1. – P. 188–190.
- [4] Конвертор с иммобилизованной уреазой для разложения мочевины / Ю. А. Лейкин, Т. А. Черкасова, М. М. Янина

- и др. // Сорбционные методы детоксикации и иммунокоррекции в медицине. Тез. докл. I Всес. конф. 28–30 июня 1982г. – Харьков, 1982. – С. 302.
- [5] Membrane-immobilized urease for possible use in dialysate regeneration system of artificial kidney / В. Krajewska, M. Leszko, W. Zaborska. – Environ. Prot. Eng. – 1989 (1991). – V. 15, № 3–4. – P. 173–180.
- [6] Исследование алкогольдегидрогеназной реакции на активных углях СКН // И. Н. Мищенко, А. Б. Узиенко, А. А. Ясников // Синтез и исследование биологически активных соединений. Тезисы докладов 9 Конференции молодых ученых. Институт органического синтеза АН ЛатвССР. – Рига, 1987. – С. 87.
- [7] Анисенко О. В. Синтез сорбентов с заданными свойствами и создание на их основе биопрепаратов иммобилизованных ферментов: автореф. дис. на соиск. учен. степ. к.б.н.: спец. 03.00.23 / Анисенко Ольга Викторовна; [Ставроп. гос. ун-т]. – М.: РГБ, 2005. – Из фондов Российской Государственной Библиотеки.
- [8] А.с. СССР № 1341907 А1. МКИ С 01 В 31/16, В 01 J 20/20, А 61 К 33/44. Способ получения углеродного гемосорбента / Н. Т. Картель, В. В. Стрелко, Ю. П. Бутылин и др. (СССР). – № 1341907, заявл. 030286, дата регистрации 01.06.87.
- [9] Крешков А. П. Курс аналитической химии. Книга вторая. Количественный анализ / А. П. Крешков, А. А. Ярославцев. – М.–Л.: Химия, 1964. – 324 с.
- [10] Глевацька К. В. Кількісна оцінка каталазної активності вуглецевих сорбентів медичного призначення / К. В. Глевацька, О. М. Бакалінська, М. Т. Картель // Доповіді НАН України. – 2008. – Т. 8. – С. 126–131.
- [11] Режим доступу: www.ru.wikipedia.org
- [12] Давиденко Т. І. Адсорбція уреазы на вугіллі / Т. І. Давиденко, О. В. Севастьянова, Д. Ю. Юодвалкіте, М. Т. Картель, С. В. Михайловський, С. А. Андронаті, В. В. Стрелко, А. А. Глемжа // Доповіді АН УРСР. Серія Б. – 1984. – № 2. – С. 64–66.
- [13] Давиденко Т. І. Иммобилизация уреазы на привитых полиэтиленах / Т. И. Давиденко, С. А. Кошелев // Биотехнология. – 1988. – Т. 4. – № 2. – С. 225–230.
- [14] Kumar S. Immobilization of soybean (Glycine max) urease on alginate and chitosan beads showing improved stability: Analytical applications / S. Kumar, A. Dwevedi, A. M. Kayastha // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2009. – V. 58. – P. 138–145.
- [15] Poly(acrylonitrile)chitosan composite membranes for urease immobilization / K. Gabrovska, A. Georgieva, T. Godjevargova [et al.] Journal of Biotechnology. – 2007. – V. – 129. – P. 674–680.
- [16] Reddy K. C. Improved stability of urease upon coupling to alkylamine and arylamine glass and its analytical use / Kiravi Charan Reddy, Arvind M. Kayastha // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2006. – V. 38. – P. 104–112.

V. Kuzmenko, O. Bakalinska, M. Kartel

CARBON SORBENTS UREASE ACTIVITY RESEARCH

Ferment-like (urease) activity of carbon sorbents SCN and KAU type, their oxidized types in H⁺-form, and also adsorptionally immobilized urease at their surface at pH 7,2 in comparison with activity of enzyme urease are investigated. Enzyme kinetics laws are applied to the description of urease activity of the chosen objects by calculation of Michaelis constants from the kinetic curves of urea decomposition in substrate concentration interval 1–10 g/l. It was shown that surface oxidization of carbon increases its urease activity in three times as much for SCN and in two times for KAU type. Urease immobilization leads to the synthesis of material which has almost the same activity as the enzyme, and even bigger for carbon sorbent KAU_o. Urease activity of the enzyme and the SCN_o with immobilized urease in the pH interval of 6,2–7,8 is investigated. It was shown that urease immobilization at SCN_o causes the extension of sorbent's urease activity in acidic field of pH, which lead to the perspective of the creation of effective mass-exchange devices for curing uremic diseases by sorption methods (hemo- and entherosorption) using carbon sorbents SCN and KAU.

Keywords: catalysis, urea decomposition, carbon sorbents, urease.