

ОЦІНКА ЕНЗИМОПОДІБНОЇ КАТАЛАЗНОЇ АКТИВНОСТІ АКТИВОВАНОГО ВУГІЛЛЯ СКН ТА КАУ

К.В. Глевацька, О.М.Бакалінська, М.Т. Картель

Інститут хімії поверхні ім. О.О.Чуйка Національної академії наук України
бул. Генерала Наумова 17, 03164 Київ-164

Досліджено каталітичну активність біокатализаторів на основі зразків вугілля типу СКН та КАУ в реакції розкладання H_2O_2 . Проведено кореляційний аналіз між реакційною здатністю, дифузією та структурними характеристиками носіїв. Для кількісного аналізу ефективності зразків застосовано закономірності кінетики гетерофазних реакцій: теорії Тіле – Зельдовича та осциляційну. Показано, що дифузія не є визначальним фактором каталітичної активності досліджуваних вуглецевих сорбентів; це необхідно враховувати при створенні сорбційних препаратів, а також масообмінників для медицини та/або біотехнології.

Вступ

Біокатализ – одна з перспективних галузей біотехнології, що широко використовується в промисловості, сільському господарстві, тонкому органічному синтезі, медичній діагностиці та екологічній практиці. Для розробки лікарських препаратів на основі ферментів використовують вуглецеві сорбенти, які можуть виявляти як власну каталітичну активність, так і слугувати носіями для іммобілізації ферментів [1]. Ефективність вуглецевих біокатализаторів залежить від природи сорбенту, його структурно-сорбційних властивостей та хімії поверхні [2]. Знання цих особливостей необхідно для створення сорбентів спрямованої терапевтичної дії, а також розробці біокатализаторів на основі ензимів, іммобілізованих на поверхні твердих тіл, для біотехнологічних процесів та потреб біосенсорики.

Проте дослідження каталітичних процесів на порутонах тілах ускладнене тим, що в них (разом з хімічною взаємодією) важливу роль відіграє дифузія компонентів та продуктів реакції. Нарізна оцінка цих факторів майже неможлива. Оскільки швидкості хімічних та дифузійних стадій суттєво відрізняються, то їх вплив на загальний процес визначає як підходи до створення, так і умови практичного використання біокатализаторів [3].

Метою дослідження є встановлення кореляційних зв'язків між реакційною здатністю, дифузією та структурними характеристиками зразків активованого вугілля медичного призначення типу СКН та КАУ в реакції розкладання пероксиду водню. Ефективність кінцевого каталітичного процесу аналізували із застосуванням закономірностей кінетики ферментативних реакцій, зокрема за допомогою розрахованих констант Міхаеліса – Ментен. Оцінку впливу дифузійних факторів на загальну активність зразків проводили за допомогою двох загальноприйнятих теорій масоперенесення – Тіле – Зельдовича та осциляційної (коливальної). Співставлення швидкості дифузійних процесів із каталітичною здатністю матеріалів дає можливість оцінити хімічну та дифузійну складові у сумарному каталітичному процесі.

Матеріали і методи дослідження

Обладнання, реагенти та об'єкти дослідження. Реакцію розкладання пероксиду водню було вибрано як модель процесів перетворення пероксидних сполук, які можуть

відбуватися в живих організмах при проведенні гемо- або ентеросорбційної детоксикації. Крім того, ця реакція перебігає з газовиділенням і тому зручна саме для моделювання дифузійних процесів, що відбуваються на поверхні та в порах катализаторів.

Розкладання пероксиду водню (2 % H₂O₂ при pH 7,2) досліджували при 298 K в термостатованій комірці з перемішуванням, що нівелює зовнішнє дифузійне гальмування. Об'єм розчину пероксиду водню в кожному досліді становив 50 мл, маса наважки вуглецевого сорбенту – 0,1 г. Аналіз зміни концентрації пероксиду водню в часі проводили при періодичному відборі проб. Досліди проводили протягом 30 хв, оскільки протягом цього часу спостерігається максимальна активність катализатора. Концентрацію розчинів H₂O₂ визначали перманганатометричним методом [4], використовуючи розчини 0,4 н KMnO₄ та H₂SO₄конц. (роздедені дистильованою водою до співвідношення 1:4).

Кatalітичне розкладання пероксиду водню проводили з використанням синтетичного нітрогенвмісного (СКН) та природного кісточкового (КАУ) вугілля, а також зразків вугілля цих типів з адсорбційно іммобілізованим на його поверхні (у кількості 5–6 мг/г сорбенту) ферментом – каталазою. Іммобілізацію ферменту проводили шляхом фізичної сорбції каталази (активність 329300 о.а.) при контакті розчину ферменту (pH 7,2) з вугіллям протягом 24 год. (t = 4–6 °C). Кількість іммобілізованого ферменту визначали спектрофотометрично ($\lambda = 280$ нм) за різницюю вмісту його в розчині над наважкою сорбенту до та після іммобілізації з використанням калібрівки за бичачим сироватковим альбуміном.

Було проаналізовано активність чотирьох фракцій ґранул обраних катализаторів, що мають середній діаметр – 1,50; 0,75; 0,375 та 0,125 мм. Основні структурні характеристики фракцій вугілля наведено в табл. 1.

Таблиця 1. Структурні характеристики фракцій вихідного вугілля.

d _{гранул.} , мм	S _{пінт} , м ² /г	V _s , см ³ /г	d _{пор} · 10 ⁹ , м
СКН			
1,50	1580	1,18	2,99
0,75	1100	0,73	2,66
0,375	980	0,46	1,89
0,125	920	0,44	1,92
КАУ			
1,5	935	0,70	2,97
0,75	960	0,75	3,15
0,375	1050	0,95	3,55
0,125	1040	0,95	3,65

Вплив дифузійного фактору на сумарний процес розкладання H₂O₂ аналізували за допомогою розрахованих коефіцієнтів дифузії. Коефіцієнт дифузії кисню у воді для каталітичної реакції H₂O₂ $\xrightarrow{\text{cat}}$ H₂O + 0,5 O₂ розраховували із використанням даних, наведених в табл. 2.

Таблиця 2. Основні параметри реакції розкладання H_2O_2 вугіллям СКН.

Активоване вугілля марки СКН [5]:	
Активний компонент	C (92 – 95%)
Густина частинок каталізатору ($\rho_{част.}$), г/м ³	$2,246 \cdot 10^6$
Коефіцієнт звивистості (τ_p) для мікропористих тіл	3
Кінетичні дані:	
Швидкість реакції (r_v), моль/с·м ³	$r_v = k_v C_{H_2O_2}$
Концентрація пероксиду водню	$C_{H_2O_2} = 2\%$
Фізичні константи [6]:	
Коефіцієнт Генрі O_2 /вода (H)	$2,92 \cdot 10^{-2}$
Коефіцієнт дифузії O_2 у воді ($D_{O_2,p}$), м ² /с	$2,41 \cdot 10^{-9}$
Поверхневий натяг води (σ), Н/м	$72,8 \cdot 10^{-3}$
В'язкість рідини (μ), Па·с	$0,96 \cdot 10^{-3}$

Оцінка швидкості дифузійних процесів. Активоване вугілля – пористий матеріал, внутрішня поверхня його зерен може бути більше 99 % від загальної поверхні кatalізатора. Для того, щоб досягти поверхні всередині зерна, молекули субстрату повинні дифундувати крізь пори кatalізатора, на поверхні яких власне відбувається реакція, після чого продукти реакції повинні залишити активний центр і дифундувати в гомогенну фазу [7]. Якщо продуктами реакції є газоподібні речовини, то вони можуть залишати пори двома шляхами: перший – утворений газ розчиняється у рідкій фазі і виходить з пори за механізмом молекулярної дифузії; другий – виникнення бульбашок у випадку, коли концентрація газу в рідині перевищує межу розчинності (рис.1).



Рис. 1. Схематичне зображення процесів транспорту кисню в порах кatalізатора.

Критерієм вибору механізму, за яким відбувається дифузія, є число Дамклера:

$$Da_{пора,газ} = y_{гранул}^2 r_s \frac{\nu R T}{D_{O_2,p} \sigma H}, \quad (1)$$

де $y_{гранул} = \frac{1}{2} d_{гранул} \tau_p$ – середня довжина пори кatalізатора; $r_s = \frac{r_v}{\rho_{гранул} S_{num}}$ – швидкість

реакції, віднесена до площині поверхні кatalізатора; ν – стехіометричний коефіцієнт в реакції розкладання пероксиду водню ($\nu = 0,5$); R – універсальна газова стала ($R = 8,314$ Дж/моль·К); T – абсолютна температура в реакторі ($T = 298$ К).

Якщо $Da > 1$, швидкість молекулярної дифузії утвореного газу менша за швидкість реакції. Це призводить до виникнення бульбашок, які виштовхують рідину з пори, в результаті чого в ній виникає осциляційний (коливальний) рух рідини. Якщо ж $Da < 1$, утворений газ не накопичується, а дуже швидко виходить з реакційної зони і тому процес можна описати за механізмом молекулярної дифузії Тіле – Зельдовича. Залежно від отриманого значення числа Дамклера ефективний коефіцієнт дифузії (основний критерій впливу цього фактора на сумарний перебіг реакції) можна розрахувати за осциляційною теорією, або ж за теорією Тіле – Зельдовича.

Розрахунок ефективного коефіцієнта дифузії за теорією Тіле – Зельдовича. Теорія Тіле та Зельдовича [8, 9] пов'язує параметри взаємодії між реагуючими речовинами та поруваюю структурою каталізатора. Відповідно до неї масоперенесення реагуючих речовин має суттєвий молекулярну природу. Це означає, що реакційні частинки дифундують крізь нерухому рідину до активних центрів дуже повільно. Основний наслідок теорії – кореляція між реакційною здатністю, дифузією та розміром пор – чим менша швидкість реакції. Модель показує, що лише певна частина пор, розташованих біля поверхні каталізатора, приймають участь в реакції, тому через низьку швидкість дифузії майже вся поверхня каталізатора є неактивною.

За уявленням Зельдовича структура пор каталізатора в першому наближенні не розглядається. Зерно каталізатора описується як середовище, в якому перенесення речовини відбувається з деяким ефективним коефіцієнтом дифузії D^* , а каталітична реакція проходить з ефективною константою швидкості k^* , що віднесена до одиниці об'єму зерна, причому ці значення постійні по всьому об'єму зерна. Таким чином реакція за цією моделлю проходить нібито гомогенно в масі каталізатора, а реагент надходить з іншої фази.

Швидкість реакції, віднесена до одиниці зовнішньої поверхні зерна (r_s), в цьому випадку дорівнює дифузійному потоку, що проходить крізь зовнішню поверхню зерна:

$$r_s = -D^*(\partial c / \partial x)_{x=0} = \sqrt{\frac{1}{n+1} D^* k C_s^{n+1}} = k_{\text{eff}} C_s^{(n+1)/2}, \quad (2)$$

де n – порядок реакції; D^* – ефективний коефіцієнт дифузії; k – константа швидкості реакції; C_s – приповерхнева концентрація субстрату ($C_s = C_0$).

З рівняння (2) одержуємо формулу для розрахунку ефективного коефіцієнта дифузії в разі молекулярного механізму дифузії продуктів реакції:

$$D_{\text{eff, mol}} = \frac{2r_s^2}{k C_s^2}. \quad (3)$$

Розрахунок ефективного коефіцієнта дифузії за осциляційною теорією. Коливальний рух рідини в порах під час перебігу мультифазної реакції буде відбуватися лише за умови немолекулярного механізму виведення продуктів реакції. Відомо, що максимально можливий тиск в порі еквівалентний сумі тисків в реакторі та капілярах (рис. 2).

Під час перебігу реакції, продуктом якої є газ, парціальний тиск газу зростає. Якщо тиск газу досягає максимально можливого значення тиску в порі каталізатора, то виникає бульбашка, що починає виштовхувати рідину з пори. В частині пори, що зайнята бульбашкою, реакція припиняється і тиск в порі повертається до початкового значення (тиск у реакторі). Після виходу бульбашки нова порція реагуючих речовин потрапляє в пори (завдяки капілярному ефекту) і процес формування бульбашки починається знову. Рідина в порах каталізатора може періодично рухатися зі швидкістю, більшою ніж 100 м/с при частоті 1 Гц. Це явище було названо осциляційною

(коливальною) поведінкою і запропоноване як альтернативний молекулярній дифузії рух рідини в порах каталізатора [10].

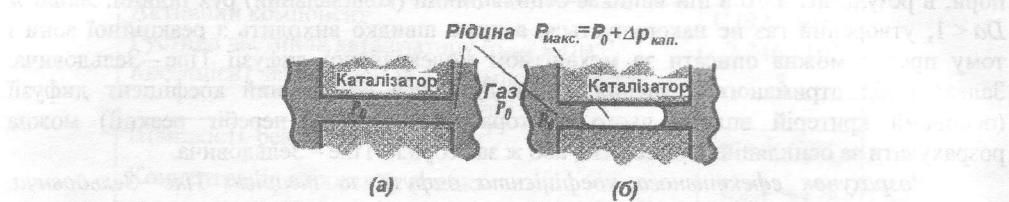


Рис. 2. Тиск кисню у порах каталізатора: (а) – пори, заповнені рідиною; (б) – бульбашка в порі каталізатора.

Згідно з осциляційною теорією ефективний коефіцієнт дифузії можна визначити за формулою [11]:

$$D_{\text{еф,осцил.}} = \frac{y_{kp}^2}{\Delta \tau_{\Sigma}}, \quad (4)$$

де y_{kp} – є відстанню осциляційного проникнення, тобто це та відстань, на якій починає

утворюватися бульбашка всередині пори, $y_{kp} = \sqrt{\frac{D_{O_2,p} \sigma H \rho_{\text{газу}} S_{\text{пум}}}{r_V v R T}}$; $\Delta \tau_{\Sigma}$ – сумарний час

одиничного коливання рідини, тобто час, який необхідний для заповнення та витіснення рідини з пори – $\Delta \tau_{\Sigma} = \Delta \tau_{\text{вимін}} + \Delta \tau_{\text{заповн.}}$.

Якщо прийняти швидкість, з якою бульбашка виштовхує рідину з пори за $U_{\text{вимін}} = \frac{d_{\text{пори}} r_V v R T}{\sigma \rho_{\text{газу}} S_{\text{пум}}}$, та відстань, яку вона проходить за $y_{\text{вимін}} = \frac{d_{\text{пори}}^2 C_{H_2O_2} v R T}{\sigma}$, то час витіснення буде дорівнювати:

$$\Delta \tau_{\text{вимін}} = \frac{y_{\text{вимін}}}{U_{\text{вимін}}} \quad (5)$$

за умови, що $y_{\text{вимін}} < y_{kp}$ рідина лише частково заповнює пору. Тоді

$$\Delta \tau_{\text{заповн.}} = \frac{y_{kp}^2 - (y_{kp} - y_{\text{вимін}})^2}{2 H D_{O_2,p}}, \quad (6)$$

а швидкість заповнення $U_{\text{заповн.}} = \frac{y_{\text{вимін}}}{\Delta \tau_{\text{заповн.}}}$.

Оцінка швидкості хімічних процесів. Швидкість перебігу каталітичної реакції на поруватому тілі можна пов'язати з хімічною (хімічною взаємодією субстрату з активним центром на поверхні) та дифузійною складовими рівнянням (7):

$$\frac{1}{K_m} = \frac{1}{K_{\text{хим}}} + \frac{1}{K_{\text{диф}}}, \quad (7)$$

де K_m – константа Міхаеліса – Ментен, $K_{\text{хим}}$ – константа швидкості хімічної реакції, $K_{\text{диф}}$ – константа швидкості зумовлено дифузійними процесами. Тоді швидкість перебігу хімічних процесів можна визначити з швидкостей сумарного процесу та дифузії. Швидкість дифузійних процесів ототожнювали із розрахованими ефективними коефіцієнтами дифузії, тоді як сумарну швидкість процесу оцінювали з даних прямих вимірювань швидкості реакції за розрахованою величиною константи Міхаеліса – Ментен [12]. Константа Міхаеліса – Ментен є важливою характеристикою оцінки активності ферменту.

Результати та їх обговорення

Для визначення механізму дифузії продуктів реакції було проведено розрахунок чисел Дамклера для всіх фракцій об'єктів дослідження (табл. 3).

Таблиця 3. Значення чисел Дамклера для досліджуваних фракцій вугілля.

Тип вугілля	d _{гранул} , мм	1,50	0,75	0,375	0,125
СКН	94,4	34,8	9,79	1,08	
СКН+кат.	19,6	8,1	4,9	0,52	
КАУ	7,72	3,5	0,63	0,036	
КАУ+кат.	54,3	10,8	2,43	0,036	

Показано, що процес розкладання H_2O_2 вугіллям СКН описується осциляційною теорією, оскільки всі значення чисел Дамклера, окрім для найдрібнішої фракції з іммобілізованою каталазою, є більшими за одиницю. Для вугілля типу КАУ осциляційна поведінка притаманна лише крупним фракціям вихідного вугілля (1,5 та 0,75 мм). Найменші фракції із іммобілізованим ферментом для обох типів вугілля мають значення числа Дамклера менші за одиницю, що свідчить про молекулярний механізм виходу продуктів реакції з пори, тому коефіцієнти дифузії для них необхідно розраховувати за теорією Тіле – Зельдовича.

В залежності від значення числа Дамклера були розраховані ефективні коефіцієнти дифузії процесу розкладання пероксиду водню фракціями вугілля типу СКН та КАУ: якщо $Da > 1$ – за осциляційною теорією, якщо $Da < 1$ – за теорією Тіле – Зельдовича – механізмом молекулярної дифузії. З метою оцінки сумарної швидкості процесу для досліджених зразків було розраховано константу Міхаеліса – Ментен (табл. 4).

Таблиця 4. Значення ефективних коефіцієнтів дифузії та констант Міхаеліса – Ментен для досліджуваних об'єктів.

	d _{гранул} , мм	1,50	0,75	0,375	0,125
Вихідне вугілля СКН	$D_{ef} \cdot 10^9$, м ² /с	1,3	1,9	2,9	3,1
	K_m , ммол/л	1740	440	195	30
Вугілля СКН із іммобілізованою каталазою	$D_{ef} \cdot 10^9$, м ² /с	23,0	25,2	39,8	$2,6 \cdot 10^{-6}$
	K_m , ммол/л	50	85	110	40
Вихідне вугілля КАУ	$D_{ef} \cdot 10^9$, м ² /с	24,5	23,1	$1,19 \cdot 10^{-7}$	$6,23 \cdot 10^{-8}$
	K_m , ммол/л	425	630	600	555
Вугілля КАУ із іммобілізованою каталазою	$D_{ef} \cdot 10^9$, м ² /с	23,1	21,9	18,6	$6,23 \cdot 10^{-8}$
	K_m , ммол/л	35	25	30	40

Отримані дані (табл. 4) свідчать, що для вихідного вугілля типу СКН при зменшенні діаметра гранул в 10 разів, коефіцієнт дифузії збільшується більш ніж у три рази, тоді як ферментативна (сумарна) активність збільшується майже на два порядки.

Таким чином, дифузія в цьому випадку не є визначальним фактором активності вугілля як катализатора. Ензимоподібна каталітична активність (K_m) гранул вугілля СКН різного розміру збільшується (оскільки значення K_m зменшуються) із зменшенням розміру гранул та корелюють з площею поверхні гранул, яка зростає із збільшенням дисперсності; ефективний коефіцієнт дифузії за осциляційною теорією корелює з діаметром пор ($R^2 = 0,9836$).

Для вугілля типу КАУ константа Міхаеліса – Ментен суттєво змінюється при переході від гранул з діаметром 1,50 мм до гранул з діаметром 0,75 мм, при подальшому зменшенні діаметру гранул активність суттєво не змінюється. Значення коефіцієнтів дифузії, на відміну від вугілля СКН, практично не змінюються, а для найменших фракцій вихідного вугілля КАУ (0,375 та 0,125) дифузія взагалі не спостерігається, що свідчить про відсутність внутрішньодифузійних ускладнень. Це може бути обумовлено макропоруватістю вугілля типу КАУ та перебіgom реакції на зовнішній поверхні гранул сорбенту.

Для носіїв з іммобілізованим ферментом каталітична ефективність визначається хімічною складовою, в даному випадку – кількістю іммобілізованого ферменту, яка є однаковою для всіх фракцій. Для найдрібнішої фракції вугілля обох типів розраховане число Дамклера та коефіцієнт дифузії свідчать про відсутність внутрішньої дифузії субстрату до активних центрів. В цілому для всіх фракцій вугілля із іммобілізованою каталазою не спостерігається суттєвої зміни а ні D_{ef} , а ні K_m . Це може означати, що як хімічна реакція, так і дифузійні процеси проходять на доступній поверхні, що вкрита ферментом.

Висновки

В роботі кількісно охарактеризовано та оцінено вплив дифузійної та хімічної складових на ефективність біокатализаторів на основі вугілля типу СКН та КАУ. Для проведення кореляційного аналізу між реакційною здатністю, дифузією та структурними характеристиками носіїв використовували теорії Тіле – Зельдовича та осциляційну, на базі яких розраховано ефективні коефіцієнти дифузії. В роботі також використані закономірності ферментативної кінетики для розрахунку каталітичної активності сорбентів та констант Міхаеліса – Ментен. Показано, що дифузія в цьому випадку не є визначальним фактором каталітичної активності досліджуваних вуглецевих сорбентів, що необхідно враховувати при створенні сорбційних препаратів, а також масообмінників, в яких використовуються вуглецеві матеріали, для медицини та/або біотехнології.

Література

1. Бакалинская О.Н., Картель Н.Т., Стрелко В.В. Углеродные сорбенты с биоспецифической активностью. В кн.: Селективная сорбция и катализ на активных углях и неорганических носителях. – К.: Наук. думка, 2008. – С 65 – 88.
2. Ставицкая С.С., Тарковская И.А., Петренко Т.П. Основные факторы, определяющие каталитические свойства активных углей // Теорет. и эксперим. химия. – 1996. – Т. 32, № 6. – С.336 – 344.
3. Саттерфілд Ч.Н. Массопередача в гетерогенном катализе. – М.: Химия, 1976. – 315 с.
4. Бабко А.К., Пятницкий И.В. Количественный анализ. – М.: Высш. шк., 1968. – 496 с.
5. Справочник химика. Т.2. Основные свойства неорганических и органических соединений. – М: Химия, 1964. – 1165 с.
6. <http://www.h2o2.com/intro/properties.html>

7. Крылов О.В. Гетерогенный катализ. – М.: Академкнига, 2004. – 679 с.
8. Thiele E.W. Relation between catalytic activity and size particle // Ind. Eng. Chem. – 1939. – Vol. 31. – P. 916 – 92.
9. Zeldovich Y. B. To theory of the reaction on a porous or powder catalyst // J. Acta Physicochim. U.R.S.S. – 1939. – X 4. – P. 584 – 592.
10. Datsevich L.B. Some theoretical aspects of catalyst behavior in a catalyst particle at liquid (liquid – gas) reaction with gas production: oscillation motion in the catalyst pores // Appl. catal. – 2003. – Vol. 247 – P. 101 – 111.
11. Datsevich L.B. Alternating motion of liquid in catalyst pores in a liquid/liquid – gas reaction with heat or gas production // Catal. Today. – 2003. – Vol. 79 – 80. – P. 341 – 348.
12. Гlevацька К.В., Бакалінська О.М., Картель М.Т. Кількісна оцінка каталазної активності вуглецевих сорбентів медичного призначення // Доп. НАН України. – 2008. – Т. 8. – С. 126 – 131.

ОЦЕНКА ЭНЗИМОПОДОБНОЙ КАТАЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ АКТИВИРОВАННЫХ УГЛЕЙ СКН И КАУ

Е.В. Гlevацька, О.Н.Бакалинська, Н.Т. Картель

Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова, 17, 03164, м. Киев-164

Исследована каталитическая активность биокатализаторов на основе углей СКН и КАУ в реакции разложения H_2O_2 . Проанализирована зависимость между реакционной способностью, диффузией и структурными характеристиками носителей. Для количественного анализа эффективности образцов были использованы закономерности кинетики гетерофазных реакций: теории Тиле/Зельдовича и осцилляционной. Показано, что диффузия не является определяющим фактором каталитической активности исследованных углеродных сорбентов; это необходимо учитывать при создании сорбционных препаратов, а также массообменников для медицины и/или биотехнологии.

ACTIVE CARBON SCN AND KAU ENZYME LIKE CATALASE ACTIVITY ESTIMATION

K.V.Glevatska, O.M.Bakalinska, M.T.Kartel

O.O.Chuiko Institute of Surface Chemistry of National Academy of Sciences of Ukraine
General Naumov Str., 17, 03164, Kiev-164

Catalytic activity of biocatalysts that based on carbon adsorbents of SCN and KAU type in reaction of hydrogen peroxide decomposition is investigated. Correlation among reaction ability, diffusion and structural parametrs of biocatalysts was shown. For quantitative analysis of activity of investigated materials two theories were used: Thiele/Zeldovich and oscillation. It was shown, that diffusion do not limit catalytic activity of carbon adsorbents. This fact can be used in creation of sorption devices and massexchangers for medicine and/or biotechnology.