

УДК 551.49

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ ГИДРОЛИЗАЦИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

А. С. Бирюков¹, В. Ф. Гавриков², Л. О. Никифорова³, В. А. Щеглов

Рассмотрены кинетические механизмы ферментативного гидролиза органических соединений. Определены характерные времена развития процесса. Обсуждается схема многостадийного процесса гидролиза.

Природные, сточные, питьевые и другие воды являются исключительно сложными системами как по составу, так и по биологическим, химическим и физическим механизмам превращений, происходящих в них. Качество воды во многом определяется органическими и неорганическими примесями и их состоянием.

Органические соединения в природных водах присутствуют в виде гумусовых соединений, которые образуются при разложении растительных остатков. Органика сточных вод исключительно многообразна и в зависимости от условий содержит фенолы, сложные эфиры, нефтепродукты, красители, гербициды и др.

Очистка и поддержание экологического баланса водных систем тесно связаны с окислительно-восстановительными процессами, происходящими в них. Окислительные процессы в водных системах, в свою очередь, связаны с расходом питательных ресурсов (органики) для роста и деления бактериальных клеток – прироста клеточной массы, утилизации необходимой энергии, внутриклеточного дыхания или эндогенной респирации, приводящей к окислению материала (см., например, [1, 2]).

Органические соединения (питательная среда) в сточных водах находятся в растворенном, нерастворенном и коллоидном состояниях. Микроорганизмы после сорбционного изъятия загрязнений из сточных вод активным илом или биопленкой могут использовать для своего роста (синтеза бактериальных клеток) питательные вещества лишь

¹ Институт общей физики РАН.

² НПО "Астрофизика".

³ ГНЦ "НИИ ВОДГЕО".

в виде молекул-мономеров. Обычно же органические загрязнения, являясь питательной средой для бактерий, представляют собой крупные частицы веществ со сложной химической структурой. Эти частицы не могут проникнуть в клетку через ее оболочку. Поэтому процесс очистки воды осуществляется поэтапно.

На первом этапе сорбционное изъятие загрязнений активным илом происходит быстрее процесса их биохимического окисления. Затем наступает важный промежуточный этап – внеклеточная переработка загрязнений бактериями с помощью пищеварительных ферментов (экзоферментов), выделяемых бактериями. Контакт ферментов (в основном гидролитических) с крупными частицами органики осуществляет гидролитическое внеклеточное расщепление сложных молекул органических веществ до небольших (более простых, в частности, мономерных) молекул, которые проникают через оболочку клетки в ее протопласт. Процесс их гидролитического расщепления осуществляется по стадиям с помощью ферментов, которые выделяются бактериями.

Ферменты – это специфические катализаторы белковой природы, синтезируемые в клетках. Практически все биохимические реакции, происходящие в живой природе (биологии) и определяющие метаболизм, катализируются соответствующими ферментами. Как и все катализаторы (в частности, небелковой природы), ферменты снижают энергию активации, необходимую для данной химической реакции (в нашем случае – для разрыва углеродной связи органических соединений). В соответствии с современной концепцией роли ферментов считается, что белок фермента связывается с молекулой субстрата (органическим веществом) в одной или нескольких ее точках и растягивает субстрат таким образом, что внутримолекулярные связи ослабевают. Синтез ферментов происходит внутри бактериальной клетки.

Различают шесть основных классов ферментов [1]: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы и лигазы. На сегодня полный состав белков-ферментов, необходимых для очистки сточных вод, строго говоря, не известен, а тем более, пока не ясна индивидуальная (специфическая) роль представителей каждого класса. Но здесь можно отметить важный (чисто эмпирический) факт (см., например, [1]), а именно: для процессов окисления органических соединений исключительно важны оксидоредуктазы как один из шести классов ферментов. К этой группе ферментов относятся дегидрогеназы, отнимающие водород от окисляемого субстрата; каталазы, расщепляющие перекись водорода; пероксидазы, использующие активированные перекиси для окисления различных соединений.

На третьем этапе реализуется внутриклеточная переработка (ассимиляция) органи-

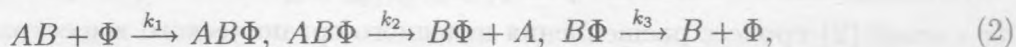
ческих веществ. Необходимая энергия для развития процесса обеспечивается за счет внутренних пищеварительных ферментов (эндоферментов), в результате образуются вода, двуокись углерода и окисленные формы азота.

Данная работа посвящена исследованию кинетики процессов, связанных с внеклеточной переработкой органических соединений (второй этап очистки). Рассмотрены кинетические механизмы ферментативного гидролиза. Определены характерные времена развития процесса.

Постановка задачи. Процесс гидролитического расщепления исходного органического материала идет с участием ферментов через промежуточные реакции, требующие меньшей энергии активации [3]. Реакция расщепления



требует высокой энергии активации, и поэтому в обычных условиях идет крайне медленно. Фермент (Φ) упрощает проблему, резко ускоряя процесс по схеме



поскольку каждый из трех подпроцессов имеет низкую энергию активации. При этом фермент, "спровоцировав" химическую реакцию, по окончании ее сохраняется.

Простейшим примером процесса (2) является гидролиз сахарозы, в результате которого образуются глюкоза (A) и фруктоза (B). Для осуществления гидролиза без фермента требуется энергия активации 32 ккал/моль. Если же реакция катализируется ферментом сахарозой, то необходимая энергия активации составляет 9.4 ккал/моль (эта энергия порядка энергии слабых водородных связей).

Наиболее простое математическое моделирование процесса исходит из схемы (2). Соответствующая система кинетических уравнений записывается в виде

$$d(AB)/dt = -k_1(AB)(\Phi),$$

$$d(AB\Phi)/dt = k_1(AB)(\Phi) - k_2(AB\Phi),$$

$$d(B\Phi)/dt = k_2(AB\Phi) - k_3(B\Phi), \quad (3)$$

$$d(A)/dt = k_2(AB\Phi),$$

$$d(B)/dt = k_3(B\Phi),$$

$$d(\Phi)/dt = -k_1(AB)(\Phi) + k_3(B\Phi),$$

где k_1, k_2, k_3 – константы скорости реакций (2).

Из (3) автоматически следуют интегралы движения (законы сохранения элементов)

$$(AB) + (AB\Phi) + (A) = L_0, (AB) + (AB\Phi) + (B\Phi) + (B) = L_0, (AB\Phi) + (B\Phi) + (\Phi) = \Phi_0, \quad (4)$$

где L_0 и Φ_0 – соответственно начальные концентрации исходного органического соединения и фермента.

С учетом (4) система (3) сводится к трем уравнениям

$$dx/dt = k_2(L_0 - x - z), \quad dy/dt = k_3(x - y), \quad dz/dt = -k_1z(z + y + \Phi_0 - L_0), \quad (5)$$

где $x = (A)$, $y = (B)$, $z = (AB)$. Начальные условия записываются в виде

$$x(0) = y(0) = 0, \quad z(0) = L_0. \quad (6)$$

Рассмотрим два характерных случая.

Одноканальный механизм расщепления органического субстрата. В соответствии со схемой (2) процесс расщепления исходного органического вещества AB реализуется по двум каналам – с образованием продукта A и продукта B . Если скорость наработки продукта B мала, то система (5) упрощается и принимает вид ($k_3 \ll k_1\Phi_0, k_1L_0, k_2$)

$$dx/dt = k_2(L_0 - x - z), \quad dz/dt = -k_1z(z + \Phi_0 - L_0). \quad (7)$$

При равных начальных концентрациях субстрата и фермента ($L_0 = \Phi_0$) из (7) находим решение

$$Z = z/L_0 = 1/(1 + k_1L_0t) = 1/(1 + \alpha\theta), \quad X = x/L_0 = 1 - \left(1 + \int_0^\theta \frac{e^\theta}{1 + \alpha\theta} d\theta\right) \exp(-\theta), \quad (8)$$

где $\theta = k_2t$ и $\alpha = k_1L_0/k_2$.

В случае, когда начальные концентрации не равны, т.е. $\beta = \Phi_0/L_0 \neq 1$, имеем

$$z/L_0 = (\beta - 1)/[\beta \exp(\alpha\theta) - 1],$$

$$x/L_0 = 1 - \left[1 + (\beta - 1) \int_0^\theta \frac{e^\theta}{(\beta e^{\alpha\theta} - 1)} d\theta\right] \exp(-\theta), \quad (9)$$

где $\theta = k_2t$ и $\alpha = k_1(\Phi_0 - L_0)/k_2$.

Из (9) ясно, что нарастание концентрации продукта расщепления A характеризуется двумя временными масштабами $\tau_1 = 1/(k_1|\Phi_0 - L_0|)$ и $\tau_2 = 1/k_2$.

Если начальная концентрация фермента существенно превышает концентрацию исходного органического субстрата ($\beta \gg 1$), то соотношения (9) упрощаются

$$z/L_0 = \exp(-\alpha\theta),$$

$$x/L_0 = 1 - \exp(-\theta) - [\exp(-\alpha\theta) - \exp(-\theta)]/(1 - \alpha), \quad (10)$$

где $\alpha = k_1\Phi_0/k_2$. Для характерных времен имеем $\tau_1 = 1/(k_1\Phi_0)$ и $\tau_2 = 1/k_2$.

В пределе $t \rightarrow \infty$ стационарные значения $z/L_0 \rightarrow 0$ и $x/L_0 \rightarrow 1$, а значение концентрации продукта B ($y/L_0 \rightarrow 1$) устанавливается за времена порядка τ_3 : $\tau_3 \geq 1/k_3 \gg \max(\tau_1, \tau_2)$.

Квазистационарный подход. Рассмотрим другой предельный случай, когда практически одновременно "срабатывают" оба канала, с наработкой как продукта A , так и продукта B . Необходимое условие для реализации этого случая связано с выполнением неравенства

$$\mu = k_2/k_3 \ll 1. \quad (11)$$

Тогда в квазистационарном приближении из третьего уравнения (3) определяется связь между концентрациями промежуточных продуктов ($AB\Phi$) и ($B\Phi$): $(AB\Phi) = k_3(B\Phi)/k_2$, что позволяет из третьего уравнения (4) получить зависимость ($B\Phi$) от концентрации фермента (Φ): $(B\Phi) = (\Phi_0 - \Phi)/(1 + 1/\mu) \cong \mu(\Phi_0 - \Phi)$.

С помощью этого соотношения система (3) сводится к системе двух нелинейных уравнений

$$d(AB)/dt = -k_1(AB)\Phi, \quad d\Phi/dt = -k_1(AB)\Phi + k_2(\Phi_0 - \Phi). \quad (12)$$

Используя преобразование $\tilde{\Phi} = \Phi - k_2t$, нетрудно найти первый интеграл движения системы (12): $\Phi = \Phi_0(1 + k_2t) + L_0(1 - z) - (k_2/k_1)\ln z$, где $z = (AB)/L_0$. Тогда первое уравнение (12) приобретает вид $dz/dt = -k_1z[\Phi_0(1 + k_2t) + L_0(1 - z) - (k_2/k_1)\ln z]$. Из этого уравнения несложно получить асимптотические решения

$$\begin{aligned} \text{при } t \rightarrow 0 \quad z &\cong [1 - (t/\tau_0)], & \tau_0 &= 1/(k_1\Phi_0), \\ \text{при } t \rightarrow \infty \quad z &\sim \exp[-(t/\tau_\infty)^2], & \tau_\infty &= [2/(k_1k_2\Phi_0)]^{1/2}. \end{aligned}$$

При выполнении неравенства $\mu = k_2/(k_1L_0) \ll 1$ в квазистационарном приближении система (12) сводится к одному уравнению $dz/d\vartheta = -z/(\mu + z)$, где $z = (AB)/L_0$, $\vartheta = \Phi_0k_2t/L_0$. Это уравнение легко решается:

$$\vartheta = 1 - z - \mu \ln z. \quad (13)$$

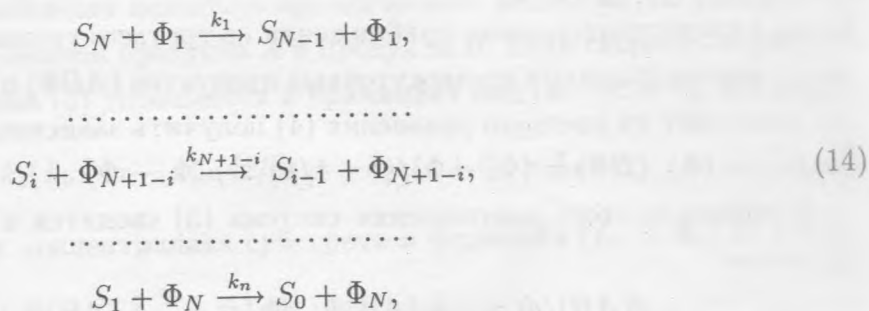
Очевидно, что характерное время развития процесса $\tau \sim L_0/(\Phi_0 k_2)$.

Многостадийный процесс гидролиза органических соединений. Помимо рассмотренных выше случаев, на практике важную роль играют также многостадийные процессы расщепления органических соединений в воде, происходящие с участием нескольких белков-ферментов: причем каждый из ферментов включается на определенной стадии, подготавливая продукт для последующей стадии расщепления.

Типичным примером такого процесса является гидролизация целлюлозы $(C_6H_{10}O_5)_n$. Конечным продуктом является глюкоза $(C_6H_{12}O_6)$: $(C_6H_{10}O_5)_n + nH_2O \rightarrow nC_6H_{12}O_6$.

Процесс внеклеточной деструкции целлюлозы весьма важен в решении проблемы очистки промышленных сточных вод. Усвоение целлюлозы осуществляется двустадийно. На первой стадии целлюлоза ферментом целлюлазой гидролизуется в целлобиозу $(C_{12}H_{22}O_{11})$. На второй стадии фермент целлобиаза расщепляет целлобиозу на две молекулы глюкозы, которая легко проникает в клетку и усваивается ею.

Схема многостадийной внеклеточной гидролиза исходного органического соединения может быть представлена в виде



где S_i – субстраты, вступающие в реакцию расщепления на i -й стадии, Φ_k – соответствующие ферменты, катализирующие реакцию, $(i + k = N)$, N – число стадий, S_N – исходное соединение, S_0 – конечный продукт, k – константы скорости реакций. Предполагается, что ферменты подвержены распаду по экспоненциальному закону

$$\Phi_k = \Phi_{k0} \exp(-t/\tau), \quad (k = 1, 2, \dots, N). \tag{15}$$

Система кинетических уравнений, соответствующая схеме (14), записывается следующим образом:

$$\begin{aligned}
 dS_N/dt &= -k_1\Phi_1S_N, \\
 &\dots\dots\dots \\
 dS_i/dt &= k_{N-i}\Phi_{N-i}S_{i+1} - k_{N+1-i}\Phi_{N+1-i}S_i,
 \end{aligned} \tag{16}$$

$$dS_0/dt = k_N \Phi_N S_1.$$

Решение (16) несложно получить при выполнении условий $k_i \Phi_{i0} \ll k_{i+1} \Phi_{i+1,0}$, то есть условий, при которых справедлив квазистационарный подход. Простая процедура с учетом (15) дает

$$S_N/L_0 = \exp[-\alpha(1 - e^{-t/\tau})], \quad S_0/L_0 = 1 - S_N/L_0, \quad (17)$$

где L_0 – количество исходного субстрата S_N и $\alpha = k_1 \Phi_{10} \tau$. Предельное количество конечного продукта процесса гидролиза определяется выражением $S_0(\infty)/L_0 = 1 - \exp(-\alpha)$. Приняв для уровня распада исходного субстрата значение e^{-1} , при выполнении условия $\alpha > 1$ из (17) получим оценку характерного времени процесса: $t_* = \tau \ln[\alpha/(\alpha - 1)]$.

Следует отметить, что многостадийный процесс расщепления (14) идет без участия кислорода, но изучение его механизма представляется важным, поскольку соответствующий анализ может дать информацию о конечном продукте, который проникает в бактериальную клетку и, таким образом, является исходным субстратом для биохимических превращений в самой клетке. Одним из таких процессов является синтез белка.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Яковлев С. В., Карюхина Т. А. Биохимические процессы в очистке сточных вод. М., Стройиздат, 1980.
- [2] Пааль Л. Л., Кару Я. Я., Мельдер Х. А., Репин Б. Н. Справочник по очистке природных и сточных вод. М., Высшая школа, 1994.
- [3] Большая Советская Энциклопедия, 44, 625 (1956), 2-изд./Под ред. Б. А. Введенского/ Гос. научн. изд-во БСЭ.

Поступила в редакцию 18 июня 1999 г.