

2. ЕКОЛОГІЯ ТА ДОВКІЛЛЯ



Науковий вісник НЛТУ України
Scientific Bulletin of UNFU

<http://nv.nltu.edu.ua>

<https://doi.org/10.15421/40280513>

Article received 08.05.2018 р.

Article accepted 31.05.2018 р.

УДК 628.54



ISSN 1994-7836 (print)
ISSN 2519-2477 (online)

@ ✉ Correspondence author

V. V. Katysheva

katyshevakt@gmail.com

В. В. Дячок, В. В. Катишева

Національний університет "Львівська політехніка", м. Львів, Україна

ВСТАНОВЛЕННЯ ВИДУ ІНГІБІЮВАННЯ БІОХІМІЧНОГО ПРОЦЕСУ ПОГЛИНАННЯ ВУГЛЕКИСЛОГО ГАЗУ

На шляху до прогресивного суспільства постало питання регулювання обсягу забруднювальних речовин у навколишньому середовищі. Здійснювати це можна завдяки застосуванню технологій очищення, в яких поєднуються три елементи – фізичні, хімічні та біологічні. Прикладом таких технологій є біотехнології із застосуванням фотосинтезувальних мікрободоростей. Мікрободорості, на відміну від наземних рослин, поглинають у 7–10 разів більше діоксиду карбону за однаковий проміжок часу та володіють здатністю адаптуватися у вкрай несприятливих умовах. У продуктах спалювання палива, окрім діоксиду карбону, завжди містяться й інші оксиди, зокрема діоксид сульфуру через присутність сполук сірки у паливі. Відтак потрібно дослідити процес очищення промислових газових викидів за участі хлорофілсинтезувальних мікрободоростей у присутності SO_2 , що адекватно вивченню впливу діоксиду сульфуру на процес фотосинтезу. Представлено результати експериментальних досліджень з вивчення впливу діоксиду сульфуру на динаміку поглинання вуглекислого газу хлорофілсинтезувальними мікрободоростями типу *Chlorella*. Опрацьовані експериментальні дані згідно з теорією Лайнуївера-Берка підтверджують випадок зворотного неконкурентного інгібування. Встановлено допустимі значення концентрацій діоксиду сульфуру для процесу поглинання вуглекислого газу хлорофілсинтезувальними мікрободоростями.

Ключові слова: діоксид сульфуру (SO_2); діоксид карбону (CO_2); мікрободорості; фотосинтез; інгібування зворотне; незворотне; константа нестійкості.

Вступ. Нещодавно науковці вперше розробили математичне рівняння опису впливу людської діяльності на Землю. На основі нього дослідники з Australian National University встановили, що люди провокують зміну клімату в 170 разів швидше за природні чинники. Останні 60 років показали, що людська діяльність "привела до неймовірно швидких темпів зміни біогенних процесів системи Землі" і започаткувала період Антропоцену (TSN.ua, 2017).

Наукова спільнота наполегливо стверджує, що відходи сучасних виробництв становлять серйозну загрозу цивілізації, а отже, потребують утилізації. Технології утилізації мають бути близькими до тих, що існують у природних умовах – біосфері. Відомо, що природному середовищу притаманна циклічність процесів. Запозичення такої здатності біосфери має стати основою процесів, які пов'язані з рециклізацією і знешкодженням забруднювач.

Напрямок в екології, що передбачає використання живих організмів для знешкодження антропогенних забруднювач, називають біологічним очищенням. Відтак до біологічного очищення від діоксиду карбону можна віднести фотосинтез.

Мікрободорості, як і інші зелені рослини, потребу-

ють діоксид карбону для приросту біомаси. На відміну від наземних рослин, вони ростуть у 7–10 разів швидше та відповідно "вбивають" більше діоксиду карбону та володіють здатністю адаптуватися у вкрай несприятливих умовах (Stepan et al., 2002; Miyachi et al., 2003). Такі властивості мікрободоростей є об'єктивною умовою розроблення та впровадження у практику технологічних процесів очищення промислових газових викидів від діоксиду карбону. Проте у продуктах спалювання завжди містяться й інші оксиди, зокрема діоксид сульфуру, як наслідок присутності сполук сірки у природних покладах палива. За своєю будовою молекули діоксиду сульфуру та діоксиду карбону подібні, а тому, можна припустити, що на етапі транспортування CO_2 у внутрішній об'єм клітини мікрободорості, за цим самим механізмом потрапляє і SO_2 . Потрапивши у внутрішній об'єм клітини мікрободорості, молекули SO_2 блокують процес фотосинтезу. Тому існує нагальна потреба дослідження процесу очищення промислових газових викидів за участі хлорофілсинтезувальних мікрободоростей за умови присутності SO_2 , що адекватно вивченню впливу діоксиду сульфуру на процес фотосинтезу (Dyachok et al., 2017; Singh & Singh, 2014).

Матеріал і методи дослідження. Для дослідження впливу діоксиду сульфуру на процес поглинання вугле-

Інформація про авторів:

Дячок Василь Володимирович, д-р техн. наук, професор, кафедра ЕЗП. **Email:** dyachokvasil@gmail.com

Катишева Вікторія В'ячеславівна, магістр, аспірант, кафедра ЕЗП. **Email:** katyshevakt@gmail.com

Цитування за ДСТУ: Дячок В. В., Катишева В. В. Встановлення виду інгібування біохімічного процесу поглинання вуглекислого газу. Науковий вісник НЛТУ України. 2018, т. 28, № 5. С. 61–64.

Citation APA: Dyachok, V. V., & Katysheva, V. V. (2018). Establishing the type of inhibition of the biochemical process of carbon dioxide absorption. *Scientific Bulletin of UNFU*, 28(5), 61–64. <https://doi.org/10.15421/40280513>

кислого газу використовували культуру зелених мікрободоростей – *Chlorella vulgaris*. Використовували базове живильне середовище, у яке поміщали однакову кількість інокулянту із культурою мікрободоростей. Водорості отримували однакову кількість відповідного спектра світла та діоксиду карбону, який барботується, рН середовища – 6,5, температура – 25^{±1}°C. Культивування проводили впродовж 12 діб у фотобіореакторах об'ємом 1,5 дм³ за умови присутності йонів HSO₃⁻² (діоксид сульфуру з водного середовища засвоюється мікрободоростями у вигляді йону HSO₃⁻²). Концентрація HSO₃⁻² у фотобіореакторах становила 0,0001 мг/мл; 0,0002 мг/мл; 0,001 мг/мл; 0,002 мг/мл; 0,003 мг/мл; 0,004 мг/мл відповідно і контрольний, який не містить HSO₃⁻².

Відбір проб біомаси мікрободоростей з фотобіореакторів здійснювали кожен день. Концентрацію мікрободоростей визначали фотоколориметричним методом при синьому світлофільтрі в кюветі з товщиною шару 10 мл. Як контрольний розчин використовували дистильовану воду. Оскільки оптична густина пропорційна концентрації мікрободоростей, що було підтверджено калібрувальним графіком, то отримані експериментальні дані накопичення біомаси мікрободоростей залежно від часу в межах досліджуваних концентрацій (HSO₃⁻²) відповідали значенням оптичних густин.

Результати та їх обговорення. Під час оброблення експериментальних даних було отримано графічні залежності, що ілюструють зміну концентрації мікрободоростей у часі за різних значень діоксиду сульфуру в розчині за одноразового його введення (рис. 1). Діоксид сульфуру у водному середовищі культивування мікрободоростей існує у вигляді йона (HSO₃⁻²). Отримані дані свідчать про те, що (HSO₃⁻²) істотноше впливає на концентрацію клітин мікрободоростей порівняно з контролем. Зі зростанням концентрації діоксиду сульфуру, приріст біомаси мікрободоростей зменшується. У контрольному зразку натомість спостерігається її стабільне збільшення. Тому, доцільним є припущення, що діоксид сульфуру в умовах експерименту виступає в ролі інгібітора процесу поглинання діоксиду карбону (фотосинтезу).

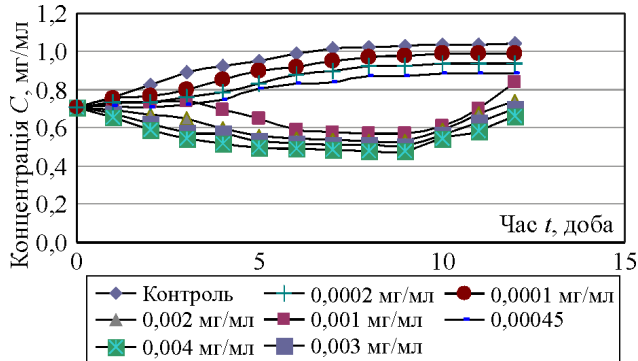


Рис. 1. Зміна концентрації клітин мікрободоростей у часі за відповідних значень концентрацій інгібітора

Докладніший аналіз даних, наведений на рис. 1, дає підстави стверджувати, що зміна чисельності клітин мікрободоростей за одиницю часу в умовах експерименту визначається кількістю народжених та відмерлих клітин. Кількісно цей процес можна описати таким відомим рівнянням

$$C = C_0 e^{\pm \mu t} \quad (1)$$

Це рівняння в координатах $\ln C/C_0 = f(t)$ дає змогу визначити коефіцієнт приросту – μ (рис. 2 та 3) (Дуах-хок et al., 2017).

Коефіцієнт приросту, як впливає з рис. 2, може бути $\mu > 0$, за умови дії певної концентрації негативного зовнішнього чинника (інгібітора фотосинтезу) може набувати від'ємного значення $\mu < 0$, рис. 3, а також дорівнювати нулю.

Експериментальні дані досліджень (див. рис. 1), у координатах $\ln C/C_0 = f(t)$, графічно представлені прямими на рис. 2.

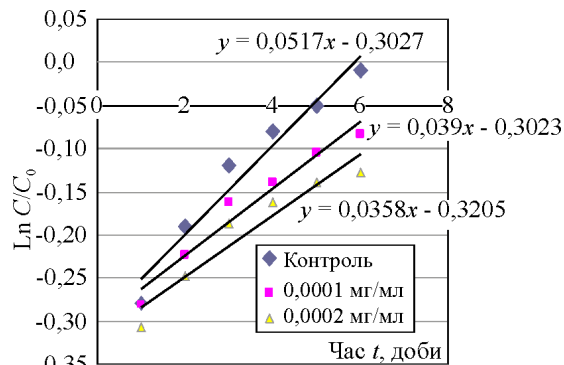


Рис. 2. Залежність зміни логарифму концентрації клітин мікрободоростей від часу за відповідних концентрацій HSO₃⁻²

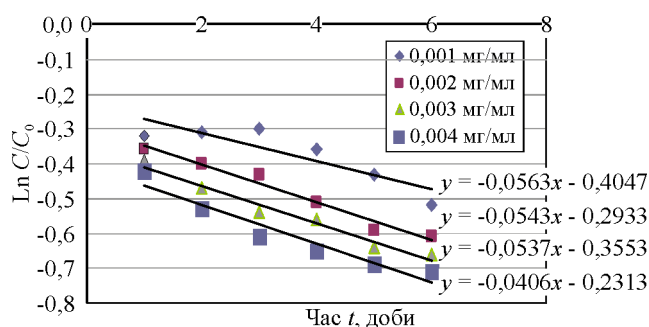


Рис. 3. Залежність зміни логарифму концентрації клітин мікрободоростей від часу за відповідних концентрацій HSO₃⁻²

Тобто чисельність клітин мікрободоростей зростає з часом і коефіцієнт приросту становить $\mu_1 = 0,0517 \text{ д}^{-1}$; $\mu_2 = 0,039 \text{ д}^{-1}$; $\mu_3 = 0,035 \text{ д}^{-1}$ (див. рис. 2). За значення концентрацій HSO₃⁻² (див. рис. 3): 0,001 мг/мл; 0,002 мг/мл; 0,003 мг/мл; 0,004 мг/мл, чисельність особин з часом спадає, коефіцієнти приросту є меншими від нуля $\mu < 0$. Числові значення цього коефіцієнта: $\mu_4 = -0,0563 \text{ д}^{-1}$; $\mu_5 = -0,0543 \text{ д}^{-1}$; $\mu_6 = -0,0537 \text{ д}^{-1}$; $\mu_7 = -0,0406 \text{ д}^{-1}$ відповідно (див. рис. 3). Отже, інгібуючі властивості діоксид сульфуру очевидні.

Швидкість біохімічних процесів залежить не лише від природи і концентрації субстрату [CO₂] і ферменту, а і від присутності інших речовин, які мають назву інгібітори та активатори. У живій клітині інгібування чи активування ферментів та їх системи є важливими чинниками регулювання метаболізму і пристосування до умов культивування.

Найпростіша схема впливу інгібітора на ферментативні перетворення субстрату CO₂ у продукт біомаси, передбачає зворотну взаємодію інгібітора з ферментом або ферментсубстратним комплексом.

Значну теоретичну і практичну зацікавленість мають два варіанти інгібування, які отримали назву конкурентне і неконкурентне. У цих випадках константу

рівноваги з інгібітором позначимо K_I . Повне конкурентне інгібування існує, коли інгібітор перешкоджає утворенню фермент-субстратного комплексу, тобто досягнення субстратом активного центру ферменту стає неможливим. Кінетичний опис повного конкурентного інгібування зображають таким рівнянням:

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_S \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) + [S]}, \quad (2)$$

де: K_I – константа нестійкості комплексу; S – концентрація субстрату; I – концентрація інгібітора; V_{\max} – максимальна швидкість приросту; K_S – константа насиченості.

За будь-якої концентрації інгібітора, експериментальні дані залежності $\frac{1}{V} = f\left(\frac{1}{S}\right)$ повинні утворювати в координатах Лайнуївера-Берка пряму, яка пересікає вісь у точці. У серії експериментів за різних значень концентрацій інгібітора буде виходити низка прямих (рис. 4), які пересікаються в одній точці на осі ординат, відсікають відрізок.

Характерним для отриманого графіка (див. рис. 5) є змінне $1/V_{\max}$, тоді як константа K_M залишається без змін, а це означає, що за будь-якої концентрації інгібітора експериментальні криві в координатах Лайнуївера-Берка утворюють прямі, що перетинаються в точці $1/K_M$ відсікаючи відрізки $1/V_{\max}$, що дає змогу визначати значення K_M та $1/V_{\max}$ за концентрацій інгібітора – 0,0001 мг/мл, $K_M=6,2$ мг/мл, а $1/V_{\max}=24,29$ мг/мл-добу, за концентрації – 0,0002 мг/мл, $K_M=6,2$ мг/мл, $1/V_{\max}=16,54$ мг/мл-добу, для контрольного дослідження $K_M=6,2$ мг/мл, а $1/V_{\max}=3,44$ мг/мл-добу.

У серії експериментів з визначенням $1/V_{\max}$ за різних концентрацій інгібітора HSO_3^{-2} і постійних концентрацій HCO_3^- і концентрації ферменту, повинна виходити пряма в координатах $1/V_{\max}=f(I)$. За концентрацій інгібітора $[I]=0,0001$ мг/мл; $[I]=0,0002$ мг/мл, знаходимо константу нестійкості комплексу ферменту за умови неконкурентного інгібування K_I .

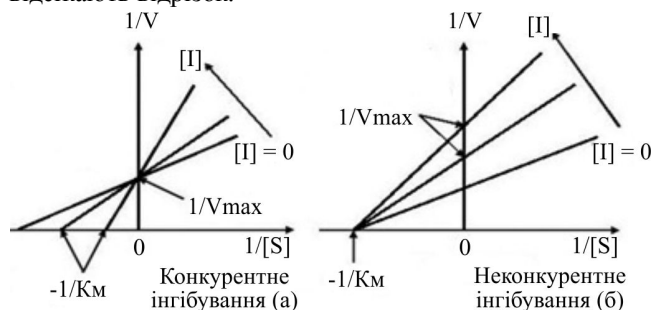


Рис. 4. Графік Лайнуївера-Берка для конкурентного (а) та неконкурентного (б) інгібування за літературними даними (Duchok, Huhlych, Katsysheva & Mandryk, 2017)

На противагу конкурентному інгібуванню, неконкурентне інгібування зменшує активність ферменту і не займає активного центру ферменту, тобто не запобігає утворенню фермент-субстратного комплексу. Математичний опис неконкурентного інгібування має такий вигляд (Manakov & Pobedimskiy, 1990):

$$V = V_{\max} S \frac{K_S + [S]}{1 + [I] / K_I}. \quad (3)$$

Рівняння (7) також подібне до рівняння Міхаеліса-Ментена, проте швидкість залежить від концентрації інгібітора $\frac{1}{V_{\max}} = f(I)$.

На цьому етапі досліджень важливо було встановити конкурентне чи неконкурентне інгібування процесу. Для цього, обробивши експериментальні дані згідно з представленою теоретичною базою, отримали графічні залежності Лайнуївера-Берка в координатах $1/V$ від $1/S$ (рис. 5).

Порівнюючи літературні дані, графік Лайнуївера-Берка (див. рис. 4,б) з побудованою графічною залежністю (див. рис. 5) за експериментальними даними (див. рис. 1), можна констатувати їх подібність. Тому вважаємо, що отримані результати підтверджують неконкурентне інгібування, цей випадок коли інгібітор приєднується до ферменту не в активному центрі, де зв'язується субстрат, а в іншому місці молекули. Тобто неконкурентний інгібітор знижує активність ферментів,

не зачіпаючи його активного центру, не перешкоджаючи утворенню фермент-субстратного комплексу, він зв'язується зворотньо, як з вільним ферментом, так і у фермент-субстратному комплексі, утворюючи неактивні комплекси.

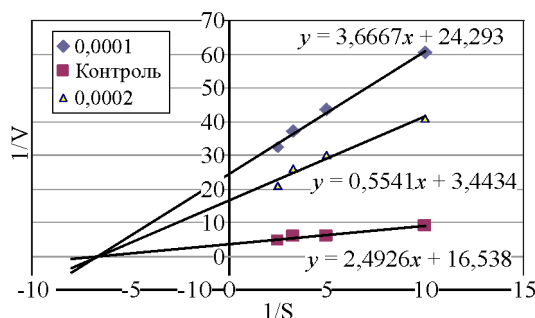


Рис. 5. Графік Лайнуївера-Берка для визначення типу інгібування SO_2 у досліджуваному об'єкті

Оскільки кожна з прямих на осі ординат відсікає відрізок рівний $1/V_{\max}$, то за допомогою ординат цих точок та певних значень концентрацій інгібітора було побудовано пряму (рис. 6), тангенс кута нахилу якої дав змогу визначити константу нестійкості $K_I=10,425$ мг/мл.

Оскільки кожна з прямих на осі ординат відсікає відрізок рівний $1/V_{\max}$, то за допомогою ординат цих точок та певних значень концентрацій інгібітора було побудовано пряму (рис. 6), тангенс кута нахилу якої дав змогу визначити константу нестійкості $K_I=10,425$ мг/мл.

Оскільки кожна з прямих на осі ординат відсікає відрізок рівний $1/V_{\max}$, то за допомогою ординат цих точок та певних значень концентрацій інгібітора було побудовано пряму (рис. 6), тангенс кута нахилу якої дав змогу визначити константу нестійкості $K_I=10,425$ мг/мл.

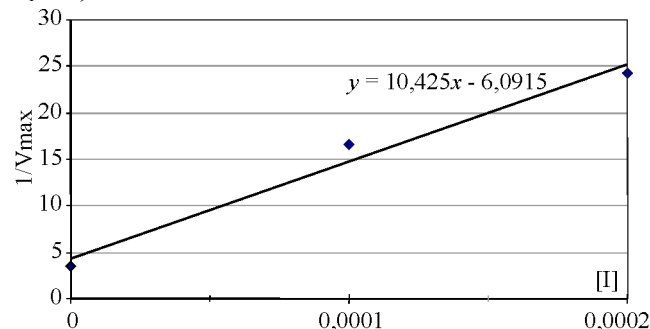


Рис. 6. Графік знаходження константи нестійкості за зворотно-неконкурентного інгібування.

Висновки. Досліджено вплив діоксиду сульфуру на динаміку поглинання вуглекислого газу хлорофілсинтезувальними мікроводоростями типу *Chlorella*. Доведено зворотне інгібування діоксином сульфуру процесу поглинання вуглекислого газу хлорофілсинтезувальними мікроводоростями відповідно до теорії Лайнуївера-Берка. Встановлено допустимі значення концентрацій інгібітора, діоксиду сульфуру, для процесу фотосинтезу мікроводоростями. Визначено константу нестійкості

комплексу ферменту та ферментсубстратного комплексу з інгібітором.

Перелік використаних джерел

- Dyachok, V., Huhlych, S., Yatchyshyn, Y., Zaporochets, Y., & Katysheva, V. (2017). About the problem of biological processes complicated by mass transfer. *Chemistry & chemical technology*, 11(1), 111–116. <https://doi.org/10.23939/chcht11.01.111>
- Dyachok, V. V., Huhlych, S. I., Katysheva, V. V., & Mandryk, S. T. (2017). Pohlynannia vuhlekysloho hazu iz sumishi povitria z dioksydom sirky. *Naukovi pratsi*, 81(1), 59–65.
- Manakov, M. N., & Pobedimskiy, D. G. (1990). *Teoreticheskie osnovy tehnologii mikrobiologicheskikh proizvodstv*. [Theoretical bases of microbiological productions technology]. Moscow: Agropromizdat. [In Russian].

- Miyachi, S., Iwasaki, I., & Shiraiwa, Y. (2003). Historical perspective on microalgal and cyanobacterial acclimation to low- and extremely high-CO₂ conditions. *Photosynthesis Research*, 77, 139–153. <http://doi.org/10.1023/A:1025817616865>
- Poltorak, O. M., & Chuhray, O. S. (1972). *Fiziko-himicheskie osnovy fermentativnogo kataliza*. [Physico-chemical basis of enzymatic catalysis]. Moscow: Visshaya shkola. [In Russian].
- Singh, S. P., & Singh, P. (2014). Effect of CO₂ concentration on algal growth: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 38, 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.05.043>
- Stepan, D. J., Shockey, R. E., Moe, T. A., & Dorn, R. I. (2002). 2.3 carbon dioxide sequestration using microalgae systems. *Energy and Environmental Research Center, University of North Dakota*, 1, 27. <https://doi.org/10.2172/882000>

В. В. Дячок, В. В. Катышева

Національний університет "Львівська політехніка", г. Львів, Україна

УСТАНОВЛЕНИЕ ВИДА ИНГИБИРОВАНИЯ БИОХИМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПОГЛОЩЕНИЯ УГЛЕКИСЛОГО ГАЗА

На пути к прогрессивному обществу стоит вопрос регулирования количества загрязняющих веществ в окружающей среде. Реализовать это возможно путем использования технологий очистки, в которых объединяются три элемента – физические, химические и биологические. Примером таких технологий являются биотехнологии с использованием фотосинтезирующих микроводорослей. Микроводоросли, в отличие от наземных растений, поглощают в 7–10 раз больше диоксида углерода за одинаковый промежуток времени и обладают способностью адаптироваться в крайне неблагоприятных условиях. В продуктах сжигания топлива всегда содержатся и другие оксиды, в частности диоксид серы из-за присутствия соединений серы в его природных залежах. Следовательно, существует необходимость исследования процесса очистки промышленных газовых выбросов с участием хлорофиллсинтезирующих микроводорослей в присутствии SO₂, что адекватно изучению влияния диоксида серы на процесс фотосинтеза. Представлены результаты экспериментальных исследований по изучению влияния диоксида серы на динамику поглощения углекислого газа хлорофилл синтезирующими микроводорослями типа *Chlorella*. Обработанные экспериментальные данные по теории Лайнуивера-Берка подтверждают случай обратного неконкурентного ингибирования. Установлены допустимые значения концентраций диоксида серы для процесса поглощения углекислого газа хлорофиллсинтезирующими микроводорослями.

Ключевые слова: диоксид серы (SO₂); диоксид углерода (CO₂); микроводоросли; ингибирование обратимое; необратимое; фотосинтез; константа неустойчивости.

V. V. Dyachok, V. V. Katysheva

Lviv Polytechnic National University, Lviv, Ukraine

ESTABLISHING THE TYPE OF INHIBITION OF THE BIOCHEMICAL PROCESS OF CARBON DIOXIDE ABSORPTION

According to the Australian National University, people provoke climate changes 170 times faster than the natural factors. The scientists increasingly argue that the waste of modern industries pose a serious threat to civilization. The wastes generated as a result of technological processes come into environment and need more rigorous recycling processes. So on the way to a progressive society is the issue of regulation the amount of pollutants in the environment. The advanced technologies are those that combine three elements – physical, chemical and biological. The technology built on this principle provides the final product with minimal production costs and minimal emissions to the environment. The example of such technologies is biotechnology with the use of photosynthesis. The main condition for photosynthesis is the presence of carbon dioxide molecules, the product of combustion solid, and liquid or gaseous fuels. Microalgae, unlike terrestrial plants, absorb 7–10 times more carbon dioxide at the same period of time and have the ability to adapt in adverse conditions. Such properties of microalgae are an objective condition for the purification of industrial gas emissions from carbon dioxide by photosynthesis. The products of the fuel combustion always contain other oxides, particularly sulphur dioxide because of the presence of sulphur compounds in its natural deposits. Therefore, there is a need to study the process of purification the industrial gas emissions with participation of chlorophyllsynthesizing microalgae in the presence of SO₂, which corresponds to the study of the effect of sulphur dioxide on the process of photosynthesis. The paper presents the results of experimental studies on the influence of sulphur dioxide on the dynamics of the carbon dioxide absorption by chlorophyll synthesizing *Chlorella* microalgae. The experimental data, which were processed according to the Lineweaver – Burk theory, confirm the case of reverse uncompetitive inhibition. Valid values of concentrations of sulphur dioxide for the process of carbon dioxide absorption by chlorophyll synthesizing microalgae are established.

Keywords: sulphur dioxide (SO₂); carbon dioxide (CO₂); *Chlorella* microalgae; competitive inhibition; uncompetitive inhibition; photosynthesis; instability constant.