

Огурцов А.Н., Близнюк О.Н., Клещев Н.Ф., Масалитина Н.Ю.

**ХИМИКО-ФИЗИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ТЕРМИЧЕСКОЙ ИНАКТИВАЦИИ ПРОЦЕССОВ ЭКСИТОННОГО ДЕФЕКТООБРАЗОВАНИЯ И ОБРАЗОВАНИЯ БИОМОЛЕКУЛЯРНЫХ НАНОКОМПЛЕКСОВ В РАДИАЦИОННОЙ ТЕХНОЛОГИИ, БИОТЕХНОЛОГИИ И БИОФИЗИКЕ: СПЕКТРОСКОПИЯ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ**

**Постановка и актуальность задачи.** Химическая физика элементарных актов энергетических и структурных преобразований материалов в качестве одной из основных проблем химической динамики рассматривает разнообразные способы активации и инактивации химических процессов, что очевидным образом может быть использовано при разработке технологий модификации уже существующих и синтеза новых материалов [1]. Физические основы механизмов термоактивации и термической инактивации химических процессов являются универсальными для широкого спектра химических процессов, что позволяет использовать единообразный формализм для описания их кинетики и энергетики [2].

В химической кинетике минимальную энергию, которой должна обладать молекула, чтобы вступить в химическую реакцию, называют энергией активации,  $E_a$ , а зависимость скорости реакции от температуры обычно описывают уравнением Аррениуса, которое в простейшем виде можно записать как  $k_w = k_0 \exp(-E_a/RT)$ , где  $k_0$  – это константа скорости, которую имела бы реакция при нулевой энергии активации. Поскольку  $k_0$  слабо зависит от температуры, то характер температурной зависимости скорости реакции определяет второй сомножитель – экспоненциальный: с увеличением температуры этот сомножитель быстро увеличивается, причём тем быстрее, чем больше энергия активации  $E_a$ . Такой экспоненциальный вид зависимости скорости реакции от температуры называется аррениусовским. Для аррениусовского характера термоактивации энергию активации реакции можно получить, определив тангенс угла наклона зависимости логарифма константы скорости реакции,  $\ln k_w$ , измеренной в начальный момент реакции, от обратной абсолютной температуры,  $T^{-1}$ . Если аррениусовская термоактивация является единственным термическим фактором, определяющим кинетику процесса, то энергию активации  $E_a = RT_1 T_2 (T_2 - T_1)^{-1} \ln(k_2/k_1)$  рассчитывают, измеряя константу скорости  $k_1$  и  $k_2$  при двух температурах  $T_1$  и  $T_2$  [2].

Однако гораздо более важной является разработка методики анализа температурно-зависимых процессов, в которых одновременно сосуществуют процессы низкотемпературной термоактивации и высокотемпературной термической инактивации. Многофакторный анализ такого рода процессов существенно упрощается, если удаётся перенормировать аналитические выражения в пределах  $T \rightarrow 0$  и  $T \rightarrow \infty$  так, что становится возможным определение термодинамических и кинетических параметров процессов по линеаризованным экспериментальным кривым в соответствующих координатах [3].

В настоящей работе использована универсальная аналитическая методика [4] для определения термодинамических параметров процесса температурной инактивации дефектообразования в ван-дер-ваальсовых атомарных криокристаллах в радиационной технологии и биокаталитической активности наноконплексов фермент-субстрат в биофизике и биотехнологии.

**Модель термической инактивации.** В общем случае процесс активации–инактивации может быть представлен в виде обратимой реакции:



с константой равновесия

$$K_{inact} = \frac{n_{inact}}{n_{act}} = \exp\left(-\frac{\Delta G_i}{RT}\right) = \exp\left(-\frac{\Delta H_i}{RT}\right) \cdot \exp\left(\frac{\Delta S_i}{R}\right), \quad (2)$$

где  $\Delta G_i$ ,  $\Delta H_i$  и  $\Delta S_i$  – энергия Гиббса, энтальпия и энтропия инактивации, соответственно, а  $m$  – концентрация исследуемых центров [3]. Используя уравнение Гиббса-Гельмгольца для переходного состояния,

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger, \quad (3)$$

связь энергии активации  $E_a$  реакции с энтальпией активации  $\Delta H^\ddagger$

$$E_a = \Delta H^\ddagger + RT, \quad (4)$$

и тот факт, что центры могут быть либо активированными, либо инактивированными,  $n = n_{act} + n_{inact}$ , мы для уравнения скорости реакции  $w(T) = k_w(T) \cdot n_{act}$ , в котором константа скорости  $k_w(T)$  связана с термодинамическими потенциалами уравнением Аррениуса-Эйринга [5]

$$k_w(T) = \alpha \cdot \frac{kT}{h} \cdot \exp\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right) \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right), \quad (5)$$

получим соотношение

$$w(T) = \beta \cdot \frac{T \cdot \exp\left(-\frac{E_a}{kT}\right)}{1 + \exp\left(\frac{\Delta S_i}{k}\right) \cdot \exp\left(-\frac{\Delta H_i}{kT}\right)}. \quad (6)$$

В формулах (5) и (6)  $k$  – постоянная Больцмана,  $h$  – постоянная Планка,  $R$  – универсальная газовая постоянная,  $\alpha$  и  $\beta$  – не зависящие от температуры характеристические константы.

Если представить зависимость  $w(T)$  в координатах  $\ln(w)$  и  $T^{-1}$ , то значения энергии активации  $E_a$  и энтальпии инактивации  $\Delta H_i$  достаточно просто могут быть определены из тангенсов угла наклона в пределах  $T^{-1} \rightarrow \infty$  и  $T^{-1} \rightarrow 0$ , поскольку соотношение (6) принимает вид – в первом случае

$$\ln(w(T)) = -\frac{E_a}{k} \cdot \frac{1}{T}, \quad (7)$$

а во втором случае

$$\ln(w(T)) = -\frac{\Delta H_i - E_a}{k} \cdot \frac{1}{T}. \quad (8)$$

Варьируя значения  $E_a$  в формуле (7), а затем, используя  $\Delta H_i$  в качестве подгонного коэффициента, можно подобрать значения  $E_a$  и  $\Delta H_i$ , при которых соответствующие прямые наилучшим образом аппроксимируют экспериментальные данные в пределах  $T^{-1} \rightarrow \infty$  и  $T^{-1} \rightarrow 0$ , соответственно.

Величину  $\Delta S_i$  можно определить, используя тот факт, что в максимуме

$$\frac{d}{dT} \ln(w(T_{\max})) = 0. \quad (9)$$

Следовательно, константа равновесия (2) может быть записана в виде

$$\frac{E_a + kT_{\max}}{\Delta H_i - E_a - kT_{\max}} = K_{inact} = \exp\left(-\frac{\Delta H_i}{kT}\right) \cdot \exp\left(\frac{\Delta S_i}{k}\right). \quad (10)$$

Здесь  $T_{\max}$  – положение максимума кривой  $w(T)$ .

**Результаты и обсуждение.** Эффекты термической активации и инактивации определяют особенности модификации спектров кристаллов криптона (рис. 1) [6].

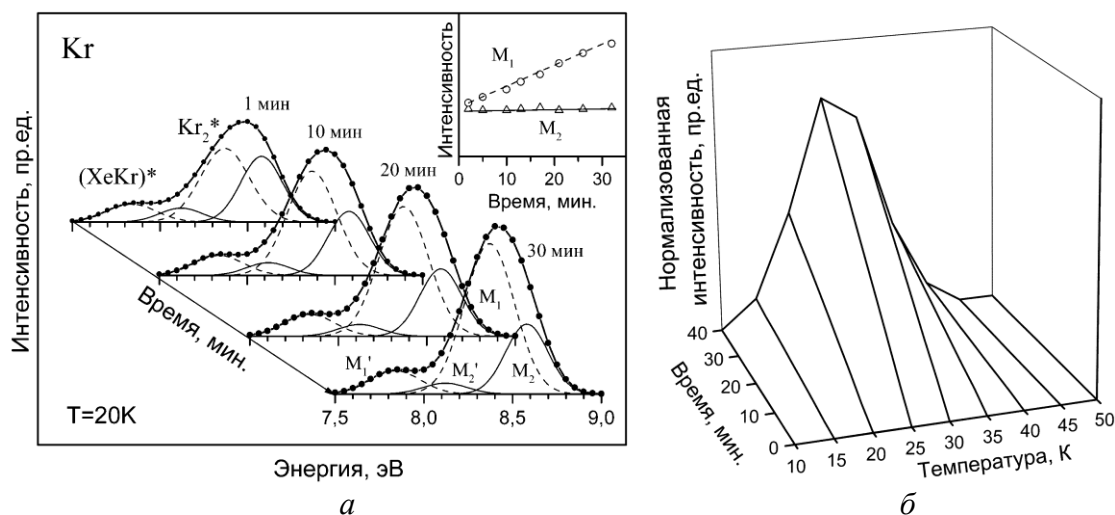


Рисунок 1 – Временная эволюция спектра катодолуминесценции твёрдого Kr:  
 а – модификация спектра при  $T = 20$  К с течением времени облучения;  
 на вставке – дозовые зависимости компонент  $M_1$  и  $M_2$  при данной температуре;  
 б – дозовые зависимости полосы  $M_1$  твёрдого Kr при разных температурах

На рис. 1(а) представлена эволюция во времени спектра квазимолекулярной ка-

тодолюминесценции кристаллов Кг при  $T = 20$  К при стационарном облучении образцов пучком низкоэнергетичных электронов с энергией 1000 эВ, которая была существенно ниже порога образования дефектов по ударному механизму при плотности тока пучка  $j = 100$  мкА/см<sup>2</sup>. В спектре доминирует полоса  $M$ , формируемая переходами в центре  $Kr_2^*$ , красное плечо  $M'$  вблизи 8 эВ связано с радиационным распадом гетероядерных эксимерных комплексов  $(XeKr)^*$  [6]. Наклон дозовых кривых дефектной компоненты  $M_1$  демонстрирует немонотонное поведение с температурой (рис. 1(б)) [7].

Образование точечного дефекта вследствие автолокализации экситона на мелких ловушках в кристаллической решётке криптона происходит путём формирования квазиэксимерного centrosymmetricного состояния (рис. 2(а)→(б)) с последующим смещением квазиэксимера (конфигурационное смещение) вдоль оси  $\langle 110 \rangle$  в неcentrosymmetricное положение (рис. 2(б)→(в)) и переориентацией его (стабилизация дефекта) вдоль направления  $\langle 100 \rangle$  (рис. 2(г)) [8]. При этом после излучательного распада стабилизированного центра (рис. 2(г)) в решётке остаётся стабильный дефект в виде вакансии и междоузельного атома в гантельной конфигурации, расстояние между которыми порядка 1 нм, в то время как излучательный распад квазиэксимера в нестабилизированном состоянии (рис. 2(в)) возвращает решётку в исходное бездефектное состояние [9]. Поэтому, конфигурация (рис. 2(в)) может рассматриваться как метастабильный короткоживущий дефект решетки, который, наряду со стабильными наноразмерными дефектами, даёт вклад в интенсивность "дефектной" полосы  $M_1$ , но не накапливающийся в решётке [7].

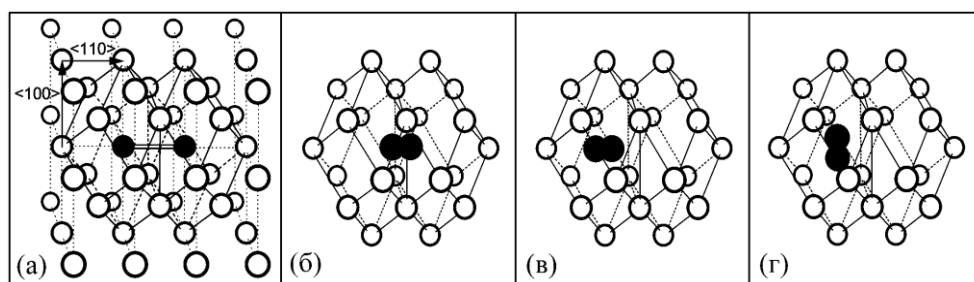


Рисунок 2 – Схема экситонно-стимулированного образования дефектов в твёрдом Кг

Скорость накопления дефектов, которая характеризуется изменением интенсивности полосы  $M_1$  в единицу времени (наклоном дозовых кривых), немонотонно зависит от температуры. Для твёрдого криптона существует температура  $T = 27$  К, при которой скорость накопления дефектов максимальна [6]. Выше этой температуры скорость накопления дефектов падает, и при  $T = 50$  К процесс накопления стабильных дефектов прекращается (рис. 3(а)).

Применим к случаю экситонно-стимулированного дефектообразования в твёрдом криптоне предложенную модель, предполагая, что при низких температурах преобладают процессы термоактивации смещения квазиэксимера в неcentrosymmetricное положение, а при повышении температуры интенсифицируется обратный процесс метастабильных дефектов обратно в centrosymmetricное состояние, иными словами, происходит инактивация процесса дефектообразования. Предложенная модель (формулы (6–8, 10) и соответствующие кривые на рис. 3(а) и рис. 3(б)) хорошо описывает экспериментально измеренные значения, изображённые на рис. 3(а) и рис. 3(б) точками, при значениях параметров  $T_{\max} = 27$  К,  $E_a = 4$  мэВ,  $\Delta H_i = 30$  мэВ,  $\Delta S_i = 1$  мэВ·К<sup>-1</sup>.

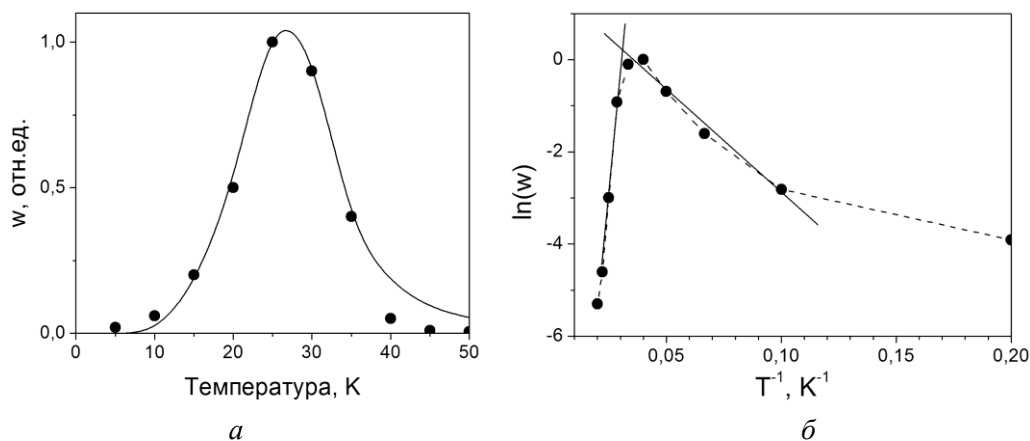


Рисунок 3 – Температурная зависимость экситонно-стимулированного образования дефектов в твёрдом Кг:

$a$  – экспериментальные точки и рассчитанная по (6) кривая;  $b$  – представление температурной зависимости скорости дефектообразования в координатах  $\ln[w(T)]$  и  $T^{-1}$

Функциональные биомакромолекулы белков могут быть отнесены к наночастицам. Объем  $V$  в кубических нанометрах ( $\text{нм}^3$ ) вещества с молекулярной массой  $M$  и плотностью  $\rho$  вычисляется по формуле  $V = 0,001661M/\rho$ , где  $M$  выражается в г/моль, а  $\rho$  – в г/см<sup>3</sup>. В качестве приблизительной оценки размера наночастицы (в нанометрах), которая называется размерным параметром  $d$ , обычно используют длину ребра куба, в который вписана эта частица,  $d = 0,1184(M/\rho)^{1/3}$  [10]. Плотность аминокислот и белков может быть вычислена с использованием кристаллографических данных. Так, например, плотность аланина, глицина, валина и воды составляет 1,43, 1,607, 1,316 и 1 г/см<sup>3</sup>, соответственно. Структура белковых глобул более рыхлая, чем у кристалла, выращенного из аминокислот, поэтому для белков характерны меньшие значения  $\rho$ , чем для составляющих их аминокислот ( $\rho \rightarrow 1$ ). Используя большой набор данных, было подобрано эмпирическое соотношение для оценки размеров биологических макромолекул  $d = 0,12(M)^{1/3}$ , например, белок гемоглобин с молекулярной массой  $M = 68000$  г/моль имеет характерный размер (размерный параметр)  $d = 4,8$  нм, что подтверждает отнесение белков к наночастицам [11]. Ферментами называются белки, ускоряющие химические реакции, а вещество, на которое действует фермент, называется субстратом [фк]. В процессе биокатализа фермент связывается с субстратом, образуя фермент-субстратный наноконплекс, в результате чего ферментативные реакции ускоряются в  $10^6$ – $10^{12}$  раз по сравнению с неферментативными. Так, например, скорость реакции разложения перекиси водорода  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$  с ферментом каталаза увеличивается в  $10^{11}$  раз по сравнению с неферментативным разложением [12].

В современной биотехнологии для сравнения результатов биотрансформаций, для расчётов биореакторов и сроков годности биопрепаратов необходимы точные количественные характеристики стабильности биомакромолекул, причём важно, чтобы эти характеристики соответствовали реальным условиям промышленного использования биомакромолекул, как правило, в водных средах, в присутствии специфических добавок и при промышленных значениях таких физико-химических параметров среды, как температура, кислотность, концентрация компонентов и режим барботирования [13]. Скорость снижения каталитической активности является одной из основных характеристик ферментов при их практическом использовании. Прежде всего, это относится к процессам, в которых фермент используется в течение длительного времени,

например, в проточных реакторах длительного действия. В подобных ситуациях полезное время жизни ферментного биокатализатора может определять экономическую целесообразность всего процесса [14].

Многие реакции, катализируемые ферментами, подчиняются аррениусовской зависимости константы скорости реакции от температуры, но только в узком температурном диапазоне, охватывающем только диапазон физиологически приемлемых температур, поскольку при повышении температуры начинается тепловая денатурация белковых молекул. Денатурация большинства белков начинается в диапазоне температур от 45–50 °С и завершается очень быстро при 55 °С (исключение составляют ферменты термофильных микроорганизмов, обитающих в горячих источниках, они сохраняют стабильность до 80–85 °С) [15]. Пример инактивации фермент-субстратного наноконплекса каталаза-перекись водорода при повышении температуры представлен на рис. 4 [16].

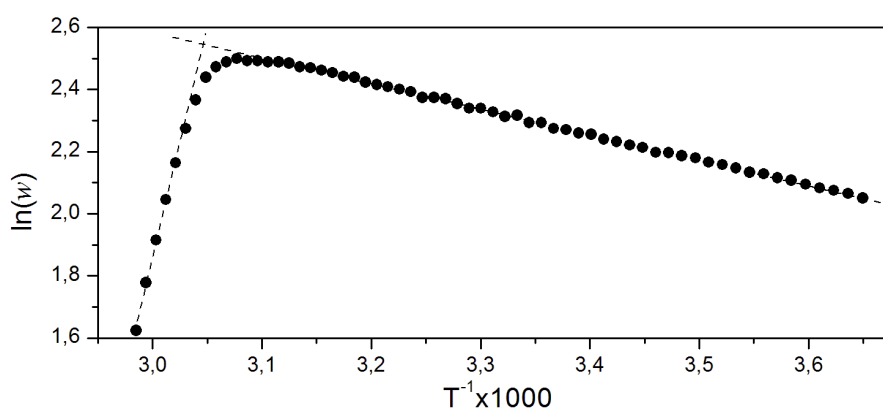


Рисунок 4 – Температурная зависимость логарифма скорости разложения перекиси водорода ферментом каталаза

Механизм термической денатурации белка состоит в том, что по мере повышения температуры атомы в молекуле белка приобретают все более высокую энергию, в том числе кинетическую, и, в конце концов, становится возможным разрушение слабых связей, стабилизирующих глобулярную структуру белка, что и приводит к его инактивации [15]. Однако причинами инактивации белка могут стать факторы, не вызывающие денатурационных последствий, например, взаимодействие макромолекул, модификация функционально важных аминокислот или изменение характера взаимодействий в фермент-субстратном наноконплексе [14]. Поэтому инактивацией в широком смысле считают любое изменение, приводящее к необратимой или обратимой утрате определённой биологической функции [3].

Термическая инактивация фермент-субстратных наноконплексов может быть обратимой, необратимой или смешанной. Зависимость скорости реакции ферментативного катализа от температуры в достаточно широком диапазоне температур может быть описана с помощью изложенной выше модели обратимой термической инактивации. Согласно этой модели неактивная и активная формы фермент-субстратных наноконплексов находятся в равновесии (1). Константу равновесия реакции (1) можно выразить в виде (2). Хотя изолированные водородные связи сравнительно слабы (их энергия обычно 0,1–0,3 эВ), энтальпия инактивации фермент-субстратных наноконплексов  $\Delta H_i$  достаточно высока, составляя, например, для трипсина и лизоцима белка куриных

яиц, соответственно, 2,9 и 3,3 эВ. Инактивация этих ферментов сопровождается изменением энтропии, равным  $9,1 \text{ эВ} \cdot \text{К}^{-1}$ . Благодаря высокой энтальпии денатурации уже небольшие изменения температуры существенно изменяют относительное количество активной формы фермента. При таких высоких значениях  $\Delta H_i$  фермент инактивируется практически полностью в диапазоне тридцати градусов.

Для частного примера разложения перекиси водорода ферментом каталаза [16] применение предложенной методики позволяет хорошо описать экспериментально измеренные значения, изображённые на рис. 4 точками, при значениях параметров  $T_{\max} = 326 \text{ К}$ ,  $E_a = 150 \text{ мэВ}$ ,  $\Delta H_i = 2,38 \text{ эВ}$ ,  $\Delta S_i = 7,22 \text{ эВ} \cdot \text{К}^{-1}$ .

**Выводы.** Таким образом, на основе теории переходного состояния предложена модель термодинамического описания процессов термической инактивации с использованием графического метода аппроксимации экспериментальных данных при экстремальных значениях температуры линейными функциями. В рамках предложенной модели определены такие термодинамические параметры процесса инактивации, как энергия активации, энтальпия и энтропия инактивации в таких процессах, как термическая инактивация экситонных ловушек в криокристаллах криптона и термическая инактивация фермент-субстратных наноконплексов каталаза-перекись водорода. Такой подход позволяет проводить качественный и количественный анализ и сертификацию процессов экситонного дефектообразования и образования биомолекулярных наноконплексов в радиационной технологии, биофизике и биотехнологии.

#### Литература

1. Itoh N. Materials modification by electronic excitation / N. Itoh, M. Stoneham. – Cambridge : Cambridge University Press, 2000. – 536 p.
2. Atkins P. Physical Chemistry / P. Atkins, de Paula J. – New York : W.H. Freeman, 2010. – 1060 p.
3. Метелица Д.И. Кинетические аспекты необратимой термической инактивации ферментов / Д.И. Метелица, А.Н. Еремин // Успехи химии. – 1987. – Т. 56., Вып. 11. – С. 1921–1948.
4. Masalitina N.Yu. Thermal inactivation of excitonically-induced defect formation in rare-gas solids / N.Yu. Masalitina, O.N. Bliznjuk, A.N. Ogurtsov // HASYLAB Annual Report 2007. – Hamburg : DESY, 2008. – P. 1117–1118.
5. Glasstone S. The theory of rate processes: The kinetics of chemical reactions, viscosity, diffusion and electrochemical phenomena / S. Glasstone, K.J. Laidler, H. Eyring. – New York : McGraw-Hill, 1941. – 611 p.
6. Fugol I.Ya. Electronically induced changes in structural properties of solid Kr / I.Ya. Fugol, E.V. Savchenko, A.N. Ogurtsov, O.N. Grigorashchenko // Physica B. – 1993. – V. 190, № 4. – P. 347–351.
7. Огурцов А.Н. Модификация криокристаллов электронными возбуждениями: монография / А.Н. Огурцов. – Харьков : НТУ "ХПИ", 2009. – 368 с.
8. Ogurtsov A.N. Kinetic study of inelastic radiation-induced processes in rare-gas cryocrystals / A.N. Ogurtsov, N.Yu. Masalitina, O.N. Bliznjuk // Low Temp. Phys. – 2007. – V. 33, № 6/7. – P. 689–693.
9. Огурцов А.Н. Моделирование нестационарной кинетики радиационной модификации материалов электронными возбуждениями: Эволюция характеристической люминесценции модельных кристаллов и диссоциация биополимеров ДНК / А.Н.

Огурцов, О.Н. Близнюк, Н.Ю. Масалитина // ITE. – 2012. – № 1. – С. 43–51.

10. Poole C.P. Introduction to nanotechnology / C.P. Poole, F.J. Owens. – Hoboken : John Wiley & Sons, Inc., 2003. – 388 p.

11. Огурцов А.Н. Нанобиотехнология. Основы молекулярной биотехнологии / А.Н. Огурцов. – Харьков : НТУ "ХПИ", 2010. – 384 с.

12. Огурцов А.Н. Ферментативный катализ / А.Н. Огурцов. – Харьков : НТУ "ХПИ", 2010. – 304 с.

13. Future prospects for industrial biotechnology / Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). – Paris : OECD, 2011. – 137 p.

14. Bailey J. E. Biochemical engineering fundamentals / James E. Bailey, David F. Ollis. – New York : McGraw-Hill, 1986. – 928 p.

15. Огурцов А.Н. Введение в молекулярную биофизику / А.Н. Огурцов. – Харьков : НТУ "ХПИ", 2011. – 160 с.

16. Sizer I.W. Temperature activation and inactivation of the crystalline catalase-hydrogen peroxide system / I.W. Sizer // J. Biol. Chem. – 1944. – V. 154. – P. 461–473.

УДК 544.32; 577.322

Огурцов О.М., Близнюк О.М., Клещев М.Ф., Масалитина Н.Ю.

**ХІМІКО-ФІЗИЧНІ МЕХАНІЗМИ ТЕРМІЧНОЇ ІНАКТИВАЦІЇ ПРОЦЕСІВ  
ЕКСИТОННОГО ДЕФЕКТОУТВОРЕННЯ ТА УТВОРЕННЯ  
БИМОЛЕКУЛЯРНИХ НАНОКОМПЛЕКСІВ В РАДІАЦІЙНІЙ ТЕХНОЛОГІЇ,  
БИОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОФІЗИЦІ:  
СПЕКТРОСКОПІЯ ТА ТЕРМОДИНАМІЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ**

В рамках наближення Арреніуса-Ейрінга досліджено процеси термічної інактивації екситонних пасток екситонів в криоцисталах криптону та фермент-субстратних наноконкомплексів. Визначено такі термодинамічні параметри цих процесів, як енергія активації, ентальпія і ентропія інактивації.

Ogurtsov A.N., Bliznjuk O.N., Kleshchev N.F., Masalitina N.Yu.

**CHEMICAL-PHYSICS MECHANISMS OF THERMAL INACTIVATION OF THE  
PROCESSES OF EXCITONIC DEFECT FORMATION AND BIOMOLECULAR  
NANOCOMPLEXES FORMATION IN RADIATION TECHNOLOGY,  
BIOTECHNOLOGY AND BIOPHYSICS:  
SPECTROSCOPY AND THERMODYNAMICAL MODELING**

Within the framework Arrhenius-Eyring approach the thermal inactivation processes of excitonic traps in krypton cryocrystals and enzyme-substrate nanocomplexes were studied. Such thermodynamics parameters of these processes as activation energy, enthalpy and entropy of inactivation were determined.