

ЛІпаЗОПОДІБНІ ВЛАСТИВОСТІ НАНОПОРУВАТИХ ВУГЛЕЦЕВИХ МАТЕРІАЛІВ

А.А. Дабіжа, К.В. Войтко, О.М. Бакалінська, М.Т. Картель

*Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України,
вул. Генерала Наумова 17, Київ, 03164, Україна; e-mail: kvoitko@gmail.com*

*Досліджені ліпазоподібні властивості нанопоруватих вуглецевих матеріалів (активоване вугілля типу СКН та КАУ і їхні окиснені форми) в порівнянні із активністю нативного та адсорбційно іммобілізованого ферменту ліпаза в модельній реакції каталітичного гідролізу *n*-нітрофенілпальмітату за рН 6,0–8,0. Знайдено, що окиснені форми вугілля СКНок та КАУок виявляють власну каталітичну активність, яка складає відповідно 25 % та 12 % від активності нативного ферменту. Ліпаза *Candida rugose*, фізично іммобілізована на поверхні нанопоруватих вуглецевих матеріалів, зберігає 30–50 % активності. Як допущення вуглецевої поверхні гетероатомами, так і структурні характеристики носія впливають на активність іммобілізованого ензиму.*

Ферментативний каталіз (біокаталіз) – процес, що широко використовується в багатьох галузях промисловості та має ряд переваг перед традиційним каталізом, зокрема, високу швидкість та селективність, біодеградаційність та м'які умови проведення реакції. Однією з груп промислово важливих ферментів є ліпази (триацилгліцерол гідролази, К.Ф. 3.1.1.3), що прискорюють процеси гідролізу естерів у водних та естерифікації/трансестерифікації – в органічних [1, 2] середовищах. Таке різноманіття реакцій, а також висока хемо-, регіо- та енантіоспецифічність ліпаз робить їх одними з найпоширеніших ферментів, що використовуються у харчовій, фармацевтичній, текстильній, паперовій та хімічній промисловості [3–5]; для синтезу жирних кислот та очищення стічних вод від відпрацьованих олій/жирів. Конверсія олій/жирів зазвичай відбувається при високих температурах та тисках, тоді як ферментативний гідроліз є енергозберігаючим процесом, що дає можливість підвищити селективність реакції та чистоту продукту [6–8]. Дослідження особливостей структури та функціонування ліполітичних ферментів стає особливо актуальним через їх біологічну роль – ліпази беруть участь у розчиненні та фракціонуванні нейтральних жирів в організмі людини.

Ліпаза складається із гідрофільного неметалічного реакційного центру (в переважній більшості ліпаз це послідовність амінокислотних залишків (так звана «каталітична тріада») Ser-His-Asp) та гідрофобної α -спіральної олігопептидної «кришки» («домену»). Зазвичай фермент перебуває у «закритій» конформації – каталітичний центр заблокований гідрофобною «кришкою» і недоступний для субстрату [9]. Необхідною умовою активації ферменту є присутність в реакційному розчині гідрофобної поверхні, яка взаємодіє із «доменом» та відкриває доступ до каталітичної тріади ліпази. Цей феномен отримав назву «поверхнева активація» і є визначальною характеристикою всіх ліпаз [10, 11]. Очевидно, рухливість «домену» залежить від природи розчинника [12] та рН мікрооточення активного центру [13, 14]. Незважаючи на складну організацію структури, ліпази належать до стабільних ферментів і зберігають свою активність в інтервалі температур 40–60 °С при рН від 4,0 (панкреатична ліпаза) до 8,0 [3].

Використання іммобілізованих ферментів у промисловості дає можливість: а) стабілізувати ензим та зменшити вплив на нього денатуруючих агентів; б) повторно або ж безперервно використовувати біокаталізатор; в) виділяти з реакційної суміші

каталізатор та продукти реакції; г) впливати на перебіг ферментативної реакції шляхом зміни умов проведення процесу. Вибір оптимального носія для іммобілізації ферменту є важливим етапом створення біокатализаторів, оскільки активність ензиму суттєво залежить від типу носія та взаємодій із ним. Такі матеріали повинні мати розвинену порувату структуру та велику питому поверхню, високу термостабільність, хімічну та механічну стійкість, низьку вартість. Крім того, носій повинен мати спорідненість до ферменту – певну хімію поверхні, якісний та кількісний склад якої забезпечує максимальну каталітичну здатність ферменту та сприяє взаємодії «ензим–субстрат» [14].

На сьогодні ліпаза успішно іммобілізована на різноманітних носіях: оксиді алюмінію, діоксиді кремнію, поруватому склі, сефарозі, целюлозі, цеолітах, поліетилені, поліпропілені, полістиролі, нейлоні, а також на активованому вугіллі (АВ) [15]. Активоване вугілля стійке до бактеріального, хімічного та механічного впливу, не набухає в рідинах, має розвинену поверхню; поверхню АВ можливо модифікувати, створювати на ній різноманітні функціональні групи, що значно підвищує кількість іммобілізованого ферменту та його стійкість до впливу середовища. Такі характеристики носія ферменту є передумовою створення біосумісних та біоселективних препаратів із широким спектром використання в харчовій та фармацевтичній промисловості і медицині.

Простим та зручним методом іммобілізації ферменту на поверхні є його фізична адсорбція. Метод довів свою ефективність при нанесенні ліпази в реакторах безперервної дії на мезопорувате активоване вугілля. Мезопори створюють для ферменту «ампульний» простір, що перешкоджає десорбції ліпази із поверхні АВ і водночас зберігає її активність [14]. Аналіз робіт, присвячених дослідженню біокатализаторів на основі АВ та ліпази, показує, що активність створених зразків вища ніж для нативного ферменту [14, 16 17]. Результат пояснюють зміною конформації ліпази із «закритої» на «відкрито» під час її іммобілізації на носії. Проте цей феномен може бути пов'язаний із виявленням власної ензимоподібної активності носія.

Робота присвячена дослідженню ліпазоподібної активності нанопоруватих вуглецевих матеріалів (активованого вугілля) та їхніх модифікованих форм в порівнянні із активністю нативного та іммобілізованого ферменту в модельній реакції гідролізу п-нітрофенілпальмітату при різних значеннях рН.

Матеріали та методи дослідження

В роботі використовували ліпазу з *Candida rugosa* (Sigma, активність – 819 од/мг), концентрацією 0,1 мг/мл; п-нітрофенілпальмітат (п-НФП) (Fluka); поверхнево-активну речовину Triton X-100 (Aldrich); 2-пропанол; 0,067 М фосфатний буфер (ФБ) ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$) із значенням рН 6,0–8,0.

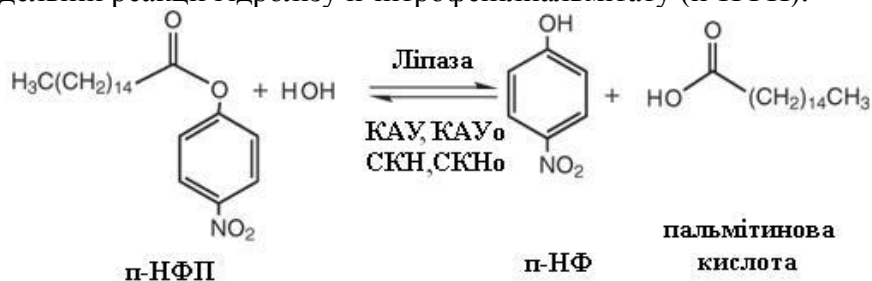
Носіями іммобілізованої ліпази обрано нанопоруваті вуглецеві матеріали (НВМ) – кісточкове (КАУ) та синтетичне азотвмісне (СКН) активоване вугілля. Модифікування носіїв проводили шляхом їх окиснення азотною кислотою (СКНок, КАУок). Для цього АВ масою 5 г нагрівали на водяній бані (100 °С) з 25 % азотною кислотою (V=37,5 мл) впродовж 3–4 год. Потім вугілля відмивали дистильованою водою до рН 6–7, обробляли 5%-ним розчином NH_4OH з наступним кип'ятінням зразків у дистильованій воді. Операцію повторювали 6–9 разів до отримання над вугіллям безбарвного розчину (видалення гумінових кислот). Переведення окиснених зразків в Н-форму проводили обробкою 3%-ним розчином HCl в об'ємному співвідношенні «вугілля:кислота» 1:3 при постійному перемішуванні впродовж доби. Після цього вугілля відмивали дистильованою водою до рН 6–7 та висушували при температурі 100–105 °С.

Для дослідження структурно-сорбційних характеристик нанопоруватих вуглецевих матеріалів використовували метод термічної адсорбції/десорбції азоту при

T=298 °K. Із отриманих ізотерм визначали об'єм (V_s , $\text{см}^3/\text{г}$) та діаметр (d , нм) пор, величину питомої поверхні ($S_{\text{пит}}$, $\text{м}^2/\text{г}$). Якісну та кількісну характеристику поверхневих функціональних груп проводили методом титрування за Бьомом [18]. До чотирьох наважок масою 0,1 г досліджуваного зразка активованого вугілля додавали по 50 мл 0,05 М розчинів NaHCO_3 , Na_2CO_3 , NaOH та HCl і струшували впродовж 24 год. Рівноважну концентрацію розчинів над вугіллям визначали титруванням відібраних аліквот 0,05 М HCl/NaOH . Кількість кисеньвмісних груп визначали з урахуванням того, що розчин NaOH нейтралізує карбоксильні, лактонні та фенольні групи; Na_2CO_3 – карбоксильні та лактонні, тоді як NaHCO_3 – лише карбоксильні.

Імобілізацію ферменту на поверхні вихідних та окиснених зразків вугілля СКН та КАУ проводили адсорбційним методом при контакті вугілля (наважка 0,04 г) із 20 мл розчину ферменту (0,060 г ліпази у 260 мл фосфатного буфера $\text{pH}=7,4$) впродовж 24 год ($T = 4 - 6$ °C). Після іммобілізації розчин декантували, а отримані зразки промивали фосфатним буфером ($\text{pH} = 7,4$, $V = 10$ мл).

Каталітичну активність досліджуваних зразків НВМ та ферменту ліпази оцінювали в модельній реакції гідролізу п-нітрофенілпальмітату (п-НФП):



Емульсію субстрату отримували змішуванням наважки п-НФП з поверхнево-активною речовиною Triton X-100, 20 мл 2-пропанолу та 200 мл ФБ із необхідним значенням pH . Об'єм доданого Triton X-100 змінювали пропорційно наважці п-НФП (концентрація субстрату варіювалась в інтервалі 0,193–0,965 ммоль/л) до утворення стабільної в часі емульсії. До 50 мл попередньо підготовленого субстрату додавали 0,4 мл розчину ліпази, або 0,04 г досліджуваного зразка НВМ, або носіїв із іммобілізованим ферментом. Швидкість гідролізу п-НФП у реакційній суміші визначали за накопиченням забарвленого продукту реакції – п-нітрофенолу (п-НФ) шляхом періодичного відбору проб. Реакцію проводили при кімнатній температурі впродовж 2 год при різних значеннях pH (6,0; 6,5; 7,0; 7,4; 8,0) та концентрації субстрату.

Із наважки п-нітрофенолу готували розчини з концентрацією від 0,008 до 0,08 г/л, оптичну густину яких визначали спектрофотометрично ($\lambda=400$ нм, $L=0,2$ см) проти розчину порівняння (ФБ). За одержаними даними було побудовано калібрувальний графік залежності оптичної густини від концентрації п-нітрофенолу (рис. 1).

Кількісну оцінку та порівняння ліпазної активності нативного ензиму, вихідних і окиснених НВМ, носіїв із іммобілізованим ферментом проводили за константою Міхаеліса (K_m), яку розраховували згідно закономірностей кінетики ферментативних реакцій з рівняння Міхаеліса–Ментен:

$$V = V_{\text{max}} \frac{C}{K_m + C},$$

де V – початкова швидкість реакції гідролізу (моль/г·с); V_{max} – максимальна швидкість реакції гідролізу (моль/г·с); K_m – константа Міхаеліса; C – концентрація п-НФП (моль/л). Для цього знаходять початкову швидкість реакції при різних концентраціях п-НФП. Всі інші умови досліді (pH , температура, іонний склад тощо) не змінюються. За

отриманими результатами будують графік залежності початкової швидкості реакції від концентрації субстрату у подвійних обернених координатах Лайнуївера–Берка ($1/V - 1/[C]$), з якого шляхом екстраполяції прямої до перетину з віссю абсцис визначають величини K_m и V_{max} .

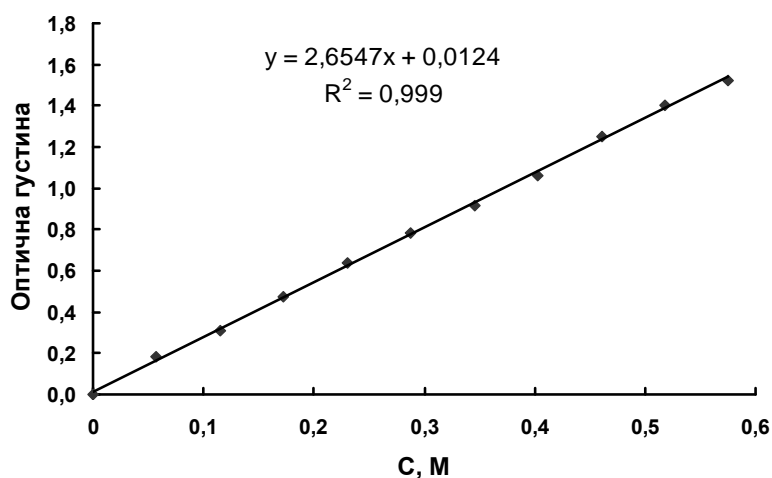


Рис. 1. Калібрувальний графік визначення концентрації розчинів п-нітрофенолу за їхньою оптичною густиною.

Важливо зазначити, що процеси, які відбуваються на межі поділу фаз «олія/вода» не підкоряються класичному рівнянню Міхаеліса–Ментен, тому що швидкість такої реакції залежить не від концентрації субстрату в реакційному розчині, а від кількості субстрату на межі поділу фаз [19]. Отже, для розрахунку кінетичних констант за класичними законами ферментативної кінетики необхідно збільшувати не лише концентрацію субстрату, але й кількість поверхнево-активної речовини таким чином, щоб їх співвідношення залишалось постійним. В такому випадку каталітичний процес можна зобразити схемою (рис. 2):

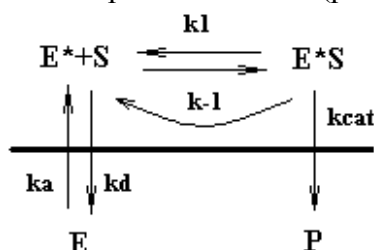


Рис. 2. Схема взаємодії ферменту (E) та субстрату (S) на межі поділу фаз.

Такий механізм каталізу передбачає наявність певного часу активації ферменту на межі поділу фаз (перехід E до E*) із константою швидкості k_a , що і спостерігається в експерименті. Утворення «фермент-субстратного» комплексу (E*S) та продуктів реакції відбувається на межі поділу фаз і підкоряється класичному закону Міхаеліса–Ментен. Таку константу Міхаеліса прийнято називати «поверхневою» (K_m^*). Для спрощення інтерпретації одержаних даних була введена константа афінності (спорідненості) K_{af} – величина, обернена до K_m^* .

Результати та їх обговорення

Дослідження ліпазної активності ферменту. Всі відомі на сьогодні ліпази можна умовно класифікувати на 2 категорії – специфічні, активність яких, головним чином, залежить від природи субстрату, та неспецифічні, каталітична здатність яких залежить від природи розчинника та рН реакційного розчину. Ліпаза роду *Candida rugosa* є ферментом неспецифічним, що діє на переважну більшість естерових зв'язків R-C(O)-OR з утворенням кислот, спиртів або ж нових естерів (реакції естерифікації та трансестерифікації).

Встановлено, що на активність неспецифічних ліпаз впливає довжина ланцюга субстрату, оскільки фермент у своїй структурі має L-подібний поліпептидний тунель, довжина якого є оптимальною для C₁₂–C₁₈ ланцюгів [19, 20]. Саме тому для дослідження було обрано п-нітрофенілпальмітат із довжиною ланцюга C₁₅. Реакція гідролізу п-НФП залежить також від природи розчинника – каталіз можна проводити як в органічних, так і у водних середовищах із використанням буферних розчинів [21]. Проте в органічних середовищах спостерігається значне зниження активності внаслідок того, що: а) повністю активується на межі поділу фаз обмежена кількість молекул ферменту; значна кількість ензиму інактивована органічним розчинником; б) молекули води навколо каталітичного центру розподіляються нерівномірно, через що «тріада» не досягає максимуму своєї активності. З урахуванням цього в роботі досліджували активність нативної ліпази у фосфатному буфері із значенням рН, що наближається до рН оптимуму ферменту та біологічних середовищ, в яких працює ліпаза. Важливо зазначити, що на швидкість реакції гідролізу впливають ряд органічних речовин (зокрема, спиртів), що пов'язують із зростанням розчинності продуктів реакції у водних середовищах, які можуть адсорбуватися на межі поділу фаз, знижуючи активність ферменту [22].

Більшість ліпаз (виняток становить панкреатична ліпаза) мають інтервал рН оптимуму від 6,5 до 7,5, що не суперечить отриманим результатам (рис. 3).

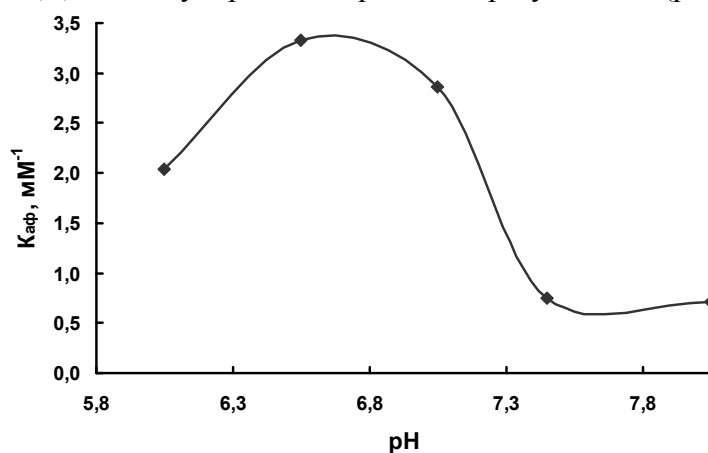


Рис. 3. Залежність активності ліпази в реакції гідролізу п-НФП від рН.

Екстремальну залежність активності ліпази від рН із максимумом рН = 6,5 можна пояснити результатами дослідження механізму каталітичної дії ліпаз (рис. 4). Гідроліз естерів активним центром ліпази складається з таких етапів: (I) активування залишку серину його депротонуванням під дією залишків аспарагіну та гістидину; (II) атака карбонільної групи субстрату за допомогою нуклеофільного гідроксильного залишку Ser і формування «ацил-ферментного» перехідного комплексу та оксіаніонної діри; (III) деацилювання перехідного стану за допомогою молекули води [11, 14]. Отже, активність ліпази зростає із підвищенням нуклеофільності гідроксильного залишку серину, тобто тоді, коли активний центр має негативний потенціал (нейтральне або лужне середовище). Отримані дані також підтверджуються результатами потенціометричного титрування ліпази роду *Candida rugosa*, що вказують на різке зростання негативного потенціалу ферменту в інтервалі рН 5,0–8,0 [23].

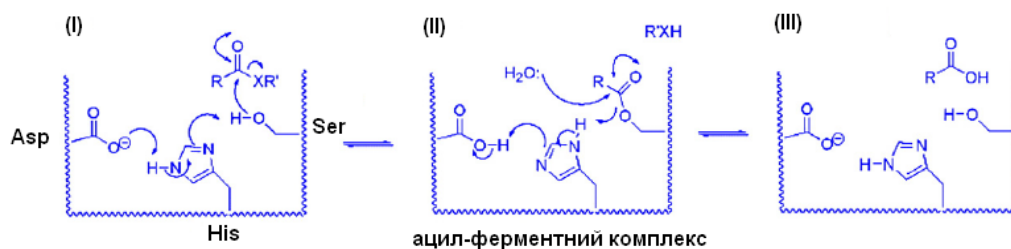


Рис. 4. Схема каталітичного гідролізу субстрату R-C(O)-XR' ліпазою [11].

Значення рН реакційного розчину впливає і на дифузію продуктів реакції з мікрооточення каталітичного центру ліпази. Депротоновані в нейтральному або лужному середовищі щойно утворені кислоти та спирти від'єднується від негативно зарядженого активного центру згідно із механізмом електростатичної взаємодії, який отримав назву «електростатична катапульта» [23].

Очевидно, що для активації ліпази та забезпечення її максимальної активності необхідною умовою є не лише наявність межі поділу фаз, але й відтворення оптимального рН середовища. За умови відсутності ПАР та рН < 5 активність ліпази з *Candida rugosa* інструментальними методами не визначається.

Ліпазоподібні властивості нанопоруватих вуглецевих матеріалів.

Структурно-сорбційні параметри досліджуваних зразків НВМ представлено в табл. 1, з якої видно, що активоване вугілля КАУ та СКН є нанопоруватими вуглецевими матеріалами, діаметр пор яких знаходиться в межах 0,95–2,15 нм. Модифікування (окиснення) зразків приводить до незначного збільшення діаметру пор, питомого об'єму та площі поверхні, що свідчить про часткову деструкцію НВМ під час процесу окиснення. Результати елементного аналізу зразків вугілля показують, що окиснення збільшує кількість атомів кисню в 20 разів для вугілля КАУ та майже вдвічі – для СКН. Підвищення вмісту азоту пов'язане із частковим нітруванням поверхні НВМ.

Таблиця 1. Елементний склад та структурно-сорбційні параметри досліджених НВМ

НВМ	Елементний склад (мас. %)				V _s , см ³ /г	d _{пор} , нм	S _{пит} , м ² /г
	С	Н	О	Н			
КАУ	99,4	0,2	0,1	0,3	0,50	2,10	1070
КАУ _{ок}	96,3	1,1	2,0	0,6	0,85	2,15	1850
СКН	91,2	1,0	6,5	1,3	0,75	0,95	1970
СКН _{ок}	85,8	0,9	11,3	2,0	0,80	1,30	2140

Якісний та кількісний склад поверхневих груп визначали титруванням за Бьомом (табл. 2). Встановлено, що сумарна кількість кислотних груп зростає практично у 20 разів після окиснення зразків НВМ і майже не відрізняється для матеріалів обох типів. Проте вугілля СКН має на поверхні групи основного характеру, що пов'язано із присутністю в його структурі азотвмісних груп. Раніше було встановлено, що такі зразки мають на поверхні азот у складі пірольних та піридинових кілець, гетероциклічних та конденсованих поліароматичних систем, аміногруп та N-оксидів [24].

Ферментоподібні властивості зразків активованого вугілля в реакції гідролізу п-НФП було досліджено вперше і показано, що вихідні зразки КАУ та СКН не каталізують реакцію в рН інтервалі 6,0–8,0. Імовірно, емульсія субстрату адсорбується на гідрофобній поверхні НВМ, що перешкоджає перебігу реакції [25]. Проте окиснені зразки виявляють ліпазоподібні властивості при рН 7,4. Для вугілля СКН_{ок} K_{аф} становить 0,185 мМ⁻¹; для КАУ_{ок} – 0,087 мМ⁻¹, що складає лише, відповідно, 25 % та 12 % від активності нативного ферменту.

Таблиця 2. Вміст поверхневих груп НВМ

НВМ	Групи, ммоль/г				
	Карбоксильні	лактонні	фенольні	Σ кисл. груп	основні
КАУ	0,04	0,06	0,02	0,12	-
КАУ _{ок}	0,84	0,20	1,39	2,43	-
СКН	0,08	0,02	0,02	0,12	0,12
СКН _{ок}	1,04	0,10	1,01	2,15	-

Наявність ліпазоподібної здатності модифікованих зразків можна пояснити присутністю на їхній поверхні кисеньвмісних функціональних груп, які: 1) знижують адсорбцію емульсії субстрату на поверхні; 2) беруть участь у молекулярному механізмі реакції подібно до залишків Asp, His, Ser каталітичної «тріади» ліпази (див. рис. 4); 3) сприяють ефективній електростатичній взаємодії продуктів реакції та поверхні за рахунок присутності на ній негативного заряду при рН 7,4 («електростатична катапульта»). Варто зазначити, що активність азотвмісних зразків СКН_{ок} вдвічі перевищує активність КАУ_{ок}, що може бути пов'язано як із структурно-сорбційними характеристиками (площа поверхні СКН_{ок} більша ніж у КАУ_{ок}), так і з наявністю поверхневих азотвмісних функціональних груп.

Було досліджено процес іммобілізації ліпази шляхом фізичної адсорбції на носіях активованого вугілля [14, 16, 17, 25, 26]. Показано, що активність створених біокаталізаторів залежить від ряду чинників.

Вплив структурно-сорбційних параметрів носія на активність іммобілізованого ферменту. Доведено, що для фізичної адсорбції ферменту діаметр пор повинен бути в 1,5 рази більше за головну вісь протеїнової молекули. У випадку ліпази ця величина повинна мати значення не менше 100 нм [25]. Очевидно, що ліпаза за рахунок гідрофобних взаємодій адсорбується на поверхні, а не у порах зразків КАУ та СКН. Як було зазначено вище, ліпази мають високу спорідненість до гідрофобних поверхонь, проте нанопорувата структура вуглецевих матеріалів створює дифузійні перешкоди, що значним чином знижує активність ферменту на їхній поверхні. Такі висновки підтверджуються отриманими результатами (рис. 5). Іммобілізована ліпаза інактивується на поверхні зразків КАУ та СКН при рН нижчих 6,25-6,50, та вищих рН 7,5. Інтервал активності іммобілізованої ліпази значно вужчий ніж у нативного ферменту.

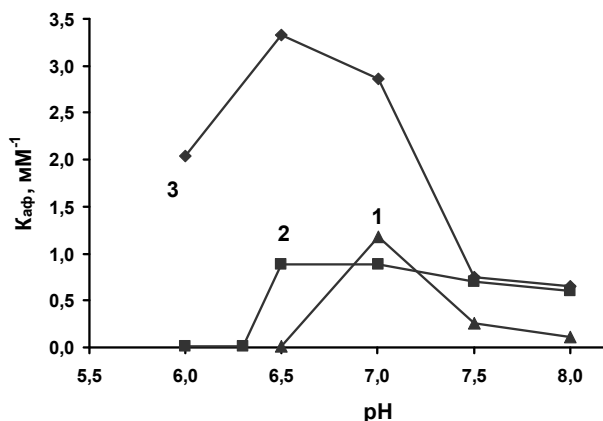


Рис. 5. Залежність активності ліпази, іммобілізованої на поверхні: 1 – КАУ, 2 – СКН в порівнянні із нативною ліпазою (3) в реакції гідролізу п-НФП від рН.

Вплив хімії поверхні носія на активність іммобілізованого ферменту. Крім дисперсійних взаємодій, між молекулою ферменту та носієм виникають специфічні взаємодії за рахунок його функціональних груп. В такому випадку виникає часткова хімічна іммобілізація ферменту, що дає можливість «вільному» гідрофобному

«домену» адсорбуватися на межі поділу фаз «олія/вода», на якій знаходиться субстрат. Крім того, за рахунок хімічної взаємодії між карбоксильними групами носія та аміногрупами ферменту зростає кількість іммобілізованої ліпази на поверхні КАУ_{ок} та СКН_{ок} [17,21]. За таких умов активність ліпази зберігається в нейтральних рН, а в лужному середовищі активність ліпази, іммобілізованої на поверхні КАУ_{ок}, дещо перевищує активність нативної ліпази (рис. 6). Максимум активності іммобілізованого ензиму зміщується і становить 7,0.

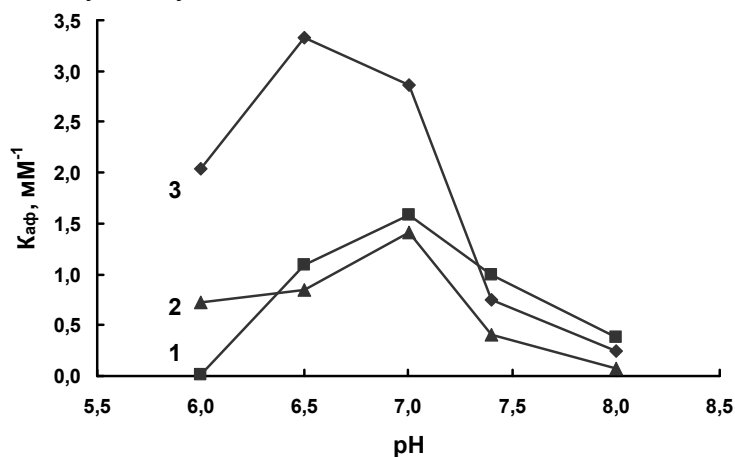


Рис. 6. Залежність активності ліпази, іммобілізованої на поверхні: 1 – КАУ_{ок}, 2 – СКН_{ок} в порівнянні із нативною ліпазою (3) в реакції гідролізу п-НФП від рН.

Грунтуючись на отриманих даних, можна зробити висновок, що підвищення активності ліпази, іммобілізованої на поверхні КАУ_{ок} та СКН_{ок}, може бути пов'язано не лише із активацією ферменту (перехід ліпази із закритої у відкриту конформацію), але і з синергетичним (кумулятивним) ефектом дії носія та ензиму. Проте такий ефект спостерігається лише для зразків КАУ_{ок}, у лужному середовищі. Отже, на активність іммобілізованої ліпази впливають як структурні фактори, так і хімія поверхні носія.

Висновки

Досліджено ліпазоподібну активність нанопоруватих вуглецевих матеріалів, зокрема активованого вугілля СКН та КАУ та їхніх окиснених форм, нативного та іммобілізованого на зазначених НВМ ензиму ліпаза в реакції гідролізу п-нітрофенілпальмітату при рН 6,0–8,0. Показано, що немодифіковані зразки АВ не виявляють ліпазоподібних властивостей. Проте окиснені зразки СКН_{ок} та КАУ_{ок} мають каталітичну здатність в слабколужному середовищі, яка становить 25 % та 12 % від активності нативного ензиму відповідно. Іммобілізація ферменту на немодифікованих зразках НВМ призводить до його інактивації в нейтральних середовищах, а при рН 7,4 ліпаза втрачає 46 % та 7 % своєї активності на носіях СКН та КАУ відповідно. Каталітичну здатність створених біокаталізаторів можна регулювати кількістю кисеньвмісних функціональних груп на поверхні носія. При рН 7,4 активність ліпази, іммобілізованої на поверхні КАУ_{ок}, зростає на 6%, що може бути пов'язано із кумулятивною дією носія та ферменту в реакції гідролізу насичених жирів.

Література

1. Saifuddin N., Raziah A.Z. Enhancement of lipase enzyme activity in non-aqueous media through a rapid three phase partitioning and microwave irradiation // E-J.Chem. – 2008. – Vol.5. – P. 864-871.
2. Cygler M., Schrag J.D. Structure and conformational flexibility of Candida rugosa lipase // Biochim. Biophys. Acta. – 1999. – Vol. 1441. – P. 205-214.
3. Ghosh P.K., Saxena R.K., Gupta R., Yadav R.P., Davidson S. Microbial lipases: production and application // Sci. Progress. – 1996. – Vol. 79. – P. 119-157.
4. Sharma R., Chisti Y., Banerjee U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases // Biotechnol. Adv. – 2001. – Vol. 19. – P. 627–662.

5. Benjamin S., Padney A. *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology // *Yeast*. – 1998. – Vol. 14. – P. 1069–1087.
6. Ramani K., Boopathy R., Mandal A.B., Sekaran G. Preparation of acidic lipase immobilized surface-modified mesoporous activated carbon catalyst and thereof for the hydrolysis of lipids // *Catal. Commun.* – 2011. – Vol. 14. P. 82–88.
7. Murty V.R., Bhat J., Muniswaran P.K.A. Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: A Review // *Biotechnol. Bioprocess Eng.* – 2002. – Vol. 7. – P. 57-66.
8. Ramani K., Karthikeyan S., Boopathy R., Kennedy L.J., Mandal A.B., Sekaran G. Surface functionalized mesoporous activated carbon for the immobilization of acidic lipase and their application to hydrolysis of waste cooked oil: isotherm and kinetic studies // *Process Biochem.* – 2012. – Vol. 47. – P. 435–445.
9. Grochulski P., Li Y., Schrag J.D., Cygler M. Two conformational states of *Candida rugosa* lipase // *Protein Sci.* – 1994. – Vol. 3. – P. 82-89.
10. Verger R. “Interfacial activation” of lipases: facts and artifacts // *Tibtech.* – 1997. – Vol. 15. – P. 32-38.
11. Reis P., Holmberg K., Watzke H., Leser M.E., Miller R. Lipases at interfaces: A review // *Adv. Coll. Interf. Sci.* – 2009. – Vol. 147–148. – P. 237–250.
12. Tejo B.A., Salleh A.B., Pleiss J. Structure and dynamics of *Candida rugosa* lipase: the role of organic solvent // *J. Mol. Model.* – 2004. – Vol. 10. – P. 358–366.
13. Jayasundar J.J., Baddireddi S.L., Venkateshamurthy R., Mathuranthagam J.A., Pandjassaram K., Pennathur G. Insights from molecular dynamics simulations into pH-dependent enantioselective hydrolysis of ibuprofen esters by *Candida rugosa* lipase // *Protein Eng.* . – 2003. – Vol. 16. – P. 1017-1024.
14. Kandasamy R., Kennedy L.J., Vidya C., Boopathy R., Sekaran J. Immobilization of acidic lipase derived from *Pseudomonas gessardii* onto mesoporous activated carbon for the hydrolysis of olive oil // *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* – 2010. – Vol. 62. – P. 59–66.
15. Hrydziusko Z., Dmytryk A., Majewska P., Szymacska K., Liesiene J., Jarzkbki A., Bryjak J. Screening of lipase carriers for reactions in water, biphasic and pure organic solvent systems // *Acta Biochim. Polonica.* – 2014. – Vol. 61. – P. 1-6.
16. Ramani K., Boopathy R., Vidya C., Kennedy L.J., Velan M., Sekaran J. Immobilisation of *Pseudomonas gessardii* acidic lipase derived from beef tallow onto mesoporous activated carbon and its application on hydrolysis of olive oil // *Proc. Biochem.* – 2010. – Vol. 45. – P. 986–992.
17. Luangon B., Siyasukh A., Winayanuwattikun P., Tanthapanichakoon W., Tonanon N. Flow-through immobilization of *Candida rugosa* lipase on hierarchical micro-/macroporous carbon monolith // *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* – 2012. – Vol. 75. – P. 80–85.
18. Boehm H.P. Surface oxides on carbon and their analysis: a critical assessment // *Carbon.* – 2002. – Vol. 40. – P. 145-149.
19. Redondo O., Herrero A., Bello J.F., Roig M.G., Calvo M.V., Plou F.J., Burguillo F.J., Comparative kinetic study of lipases A and B from *Candida rugosa* in the hydrolysis of lipid *p*-nitrophenyl esters in mixed micelles with Triton X- 100 // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1995. – Vol.1243. – P. 15-24.
20. Lypez N., Pernas M.A., Pastrana L.M., Sónchez A., Valero F., Rúa M.L. Reactivity of pure *Candida rugosa* lipase isoenzymes (Lip1, Lip2, and Lip3) in aqueous and organic media. Influence of the isoenzymatic profile on the lipase performance in organic media // *Biotechnol. Prog.* – 2004. – Vol. 20. – P. 65-73.
21. Pencreac’h G., Baratti J.C. Hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate in *n*-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: A simple test for the determination of lipase activity in organic media // *Enz. Microb. Technol.* – 1996. – Vol. 18. P.417–422.

22. Dominguez de Maria P., Sanchez-Montero J.N., Sinisterra J.V., Alcantara A.R. Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview // *Biotechn. Adv.* – 2006. – Vol.24. – P. 180 – 196.
23. Neves Petersen M., Fojan P., Petersen S.B. How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution // *J. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 85. – P. 115–147.
24. Laszlo K., Josepovits K., Tombacz E. Analysis of active sites on synthetic carbon surface by various methods // *Analytical Science.* – 2001. – Vol. 17. – P. 1741-1744.
25. Naranjo J.K., Cyrdoba A., Giraldo L., Гарсна V.S., Moreno-Pirajón J.C. Lipase supported on granular activated carbon and activated carbon cloth as a catalyst in the synthesis of biodiesel fuel // *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* – 2010. – Vol. 66. – P. 166–171.
26. Quiros M., Garcia A.M., Montes-Moran M.A. Influence of the support surface properties on the protein loading and activity of lipase/mesoporous carbon biocatalysts // *Carbon.* – 2011. – Vol. 49. – P. 406 – 415.

ЛИПАЗОПОДОБНЫЕ СВОЙСТВА НАНОПОРИСТЫХ УГЛЕРОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

А.А. Дабижа, К.В. Войтко, О.Н. Бакалинская, Н.Т. Картель

Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины, ул. Генерала Наумова 17, Киев, 03164, Украина; e-mail: kvoitko@gmail.com

*Исследованы липазоподобные свойства нанопористых углеродных материалов (образцы активированного угля типа СКН и КАУ, их окисленные формы) в сравнении с нативным и адсорбционно иммобилизованным ферментом липаза в модельной реакции каталитического гидролиза *p*-нитрофенилпальмитата при pH 6.0–8.0. Найдено, что окисленные формы углей СКНок и КАУок проявляют собственную каталитическую активность, которая составляет, соответственно, 25 % и 12 % от активности нативного фермента. Липаза *Candida rugosa*, физически иммобилизованная на поверхности нанопористых углеродных материалов, сохраняет 30–50 % активности. Как допирование углеродной поверхности гетероатомами, так и структурные характеристики носителя влияют на активность иммобилизованного энзима.*

LIPASE-LIKE PROPERTIES OF NANOPOROUS CARBON MATERIALS

A.A. Dabizha, K.V. Voitko, O.M. Bakalinska, M.T.Kartel

Chuiiko Institute of Surface Chemistry National Academy of Sciences of Ukraine, 17 General Naumov Str., Kyiv, 03164, Ukraine; e-mail: kvoitko@gmail.com

*The lipase-mimetic properties of nanoporous carbon materials (activated carbons of SKN and KAU type, their modified forms) in comparison with native and immobilized lipase the model reaction of *p*-nitrophenyl palmitate hydrolysis at pH6.0-8.0 range was studied. It was found that oxidized forms of SKNox and KAUox exhibit their own catalytic activity, which is respectively 25 % and 12 % of native enzyme activity. *Candida rugosa* lipase physically immobilized on the surface of nanoporous carbon materials retains 30-50% of its activity. Both carbon surface heteroatom doping and its structure characteristics influence on activity of immobilized enzyme.*