

АМІЛАЗОПОДІБНА АКТИВНІСТЬ ВУГЛЕЦЕВИХ МАТЕРІАЛІВ ТИПУ СКН ТА КАВ

Досліджено, кількісно оцінено та порівняно каталітичну активність нативного ферменту амілаза, активованого та модифікованого (окисненого у Н-формі) вугілля марок СКН та КАВ, деяких сольових форм вугілля СКН₀, ферменту амілаза, адсорбційно іммобілізованого на вугіллі, в реакції розкладання (гідролізу) крохмалю різних концентрацій (0,4–1,2 %). Застосовано закони кінетики ферментативних реакцій для кількісної оцінки амілазної активності вуглецевих сорбентів, зокрема розраховано константи Міхаеліса. Показано, що активоване вугілля і його модифіковані та сольові форми виявляють амілазну активність. Встановлено, що адсорбційна іммобілізація амілази на поверхні зразків вугілля збільшує каталітичну активність КАВ₀ та СКН. Іммобілізація ферменту на поверхні сорбентів КАВ та СКН₀ призводить до інактивації комплексу вугілля-фермент. Визначено, що наявність іонів (H⁺, K⁺, Na⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺) на поверхні вугілля відіграє суттєву роль у маніфестації амілазоподібної каталітичної активності. Показано, що найактивнішими є мідна та цинкова форми.

Ключові слова: каталіз, амілазна активність, вуглецеві адсорбенти, ферменти.

Вступ

Активоване вугілля (АВ) є широко розповсюдженим матеріалом, застосування якого зумовлено його фізичними та хімічними властивостями. Зокрема, достатньо великою питомою поверхнею, розвиненою пористою структурою та наявністю різноманітних функціональних груп, здатних до хімічних перетворень. Активоване вугілля застосовують як нерозчинний носій при проведенні іммобілізації ферментів для підвищення їхньої стабільності та активності. Вуглецеві сорбенти займають провідне місце серед сорбентів медичного призначення, а саме – гемо- та ентеросорбентів [1–3]. Багаторічний досвід використання медичних сорбентів вказує на те, що їхня терапевтична активність пов'язана не тільки із сорбцією шкідливих та отруйних речовин із біологічних середовищ, а й з впливом на метаболічні шляхи, включаючи ензиматичні процеси (гідроліз білків, жирів, складних ефірів, інверсія сахарози тощо). При цьому сорбенти можуть виконувати різні функції. По-перше, вони самі можуть проявляти ферментативну активність в окисно-відновних реакціях. По-друге, вуглецеві сорбенти можна модифікувати, зокрема, шляхом окиснення та подальшого введення лігандів на їхню поверхню, підсилюючи таким чином їх каталітичну активність.

Метою дослідження є вивчення та порівняння каталітичної активності нативного ферменту амілаза, активованого та модифікованого (окисненого в Н-формі) вугілля марок СКН та КАВ, ферменту амілаза, адсорбційно іммобілізованого

го на вугіллі, в реакції розкладання (гідролізу) крохмалю.

Експериментальна частина

Об'єкти дослідження

α -Амілаза *Bacillus Subtilis*, 3.2.1.1.

Однорідний колоїдний розчин (клейстер) крохмалю одержували з водного розчину водорозчинного крохмалю виробництва фірми «Міранда» шляхом кип'ятіння.

Вугілля медичного призначення типу СКН та КАВ, а також їх окиснені аналоги (окиснення азотною кислотою у рідкій фазі до певних значень статичної обмінної ємності (СОЄ) [4]) та сольові форми [5]. Було визначено структурно-сорбційні характеристики сорбентів: об'єм сорбційних пор (V_s) за бензолом – ексикаторним методом [6], площу питомої поверхні ($S_{\text{пит}}$) – методом термічної десорбції аргону [7], статичну обмінну ємність [8].

Використовували хімічні реактиви марки «ч.д.а».

Характеристики досліджених зразків вугілля наведено в табл. 1.

Таблиця 1. Характеристики дослідженого вугілля

Марка вугілля	СОЄ, мг-екв/г	V_s , см ³ /г	$S_{\text{пит}}$, м ² /г
КАВ	0,25	0,50	1070
КАВ ₀	1,30	0,85	1850
СКН	1,20	1,25	1950
СКН ₀	1,40	1,15	1930

Методи дослідження

Реакцію розкладання крохмалю досліджували при 298 К у термостатованій комірці з перемішуванням. Об'єм розчину крохмалю в кожному досліді становив 100 мл, об'єм розчину ферменту – 0,1 мл, наважки вугілля – 0,5 г, кількість вугілля з адсорбційно іммобілізованою амілазою – 0,2 г.

У кінетичних експериментах використовували водні розчини крохмалю різних концентрацій (%): 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2.

Аналіз зміни концентрації крохмалю в часі аналізували при періодичному відборі проб (по 0,5 мл), дослід тривав 40–180 хв. Концентрацію крохмалю у кінетичних експериментах визначали колориметричним методом у реакції між крохмалем та йодом з утворенням забарвленої сполуки синього кольору, при дослідженні активності сольових форм вугілля СКН – за збільшенням концентрації продукту реакції гідролізу крохмалю – глюкози. Для визначення концентрації глюкози використовували глюкозооксидазний метод.

Під час дослідження припускали, що в реакції розкладання крохмалю активоване вугілля та його модифіковані форми виступають як ферменти, тому розрахунки активності сорбентів проводили згідно із законами ферментативної кінетики. Активність зразків кількісно оцінювали константою Міхаеліса [9], яку визначали за кінетичними кривими зміни концентрації крохмалю у реакційному середовищі. Для визначення константи Міхаеліса знаходили початкову швидкість реакції за різних концентрацій субстрату. З графіка залежності $1/V_0$ від $1/[C]$ шляхом екстраполяції прямої до перетину з віссю абсцис розраховували величини K_m і V_{\max} за формулою:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[C]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Амілазну активність вуглецевих сорбентів порівнювали з активністю нативної амілази.

Результати та їх обговорення

Для виявлення амілазоподібної активності вуглецевих матеріалів було досліджено кінетику розкладання крохмалю вихідним (а), окисненим (б), та у сольовій формі (в) вугіллям СКН залежно від рН-розчину (рис. 1). Встановлено, що найбільш активним у цій реакції є вугілля СКН-Н⁺ при рН 7,5. Вже за 60 хв вугілля гідролізує крохмаль до вмісту глюкози 0,9 ммоль/л. Для порівняння, за тих самих умов, 0,5 мл ферменту α -амілази із активністю 103 од.ак/мл гідролізує крохмаль до вмісту глюкози приблизно 3,5 ммоль/л. Активоване вугілля проявляє меншу амілазну активність із максимумом при рН 4,7. За тих самих умов вміст глюкози сягає 0,2 ммоль/л. СКН-К⁺ також проявляє найбільшу

активність при рН 7,5. Активність цієї форми вугілля практично така ж, як у попереднього матеріалу. З наведених даних (виходячи із залежності амілазної активності від рН-розчину) можна зробити висновок, що механізм амілазної активності у вугілля СКН-Н⁺ та СКН-К⁺ схожий. Швидше за все, наявність іонів Н⁺ та К⁺ на поверхні вугілля відіграє суттєву роль у маніфестації амілазної активності. Аналогічним чином дослідили активність сольових форм Na⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ вугілля СКН. Показано, що найактивнішими є мідна та цинкова форми.

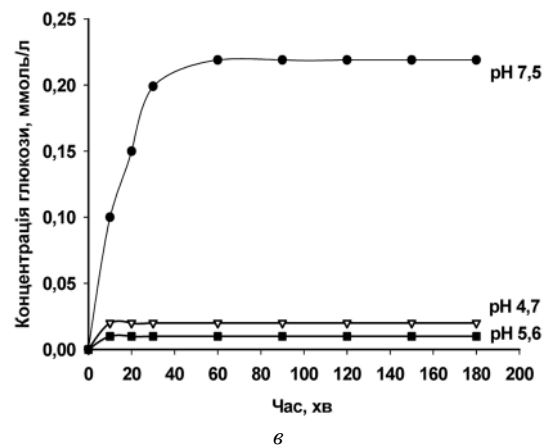
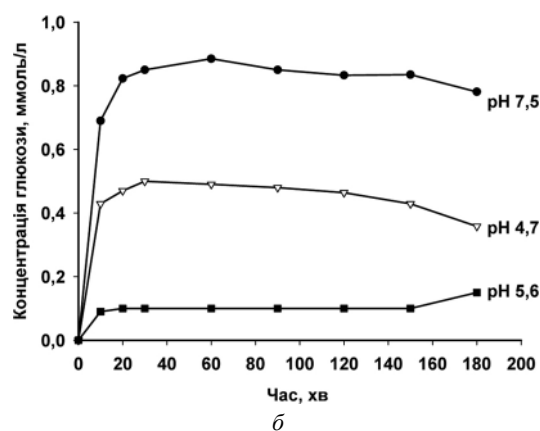
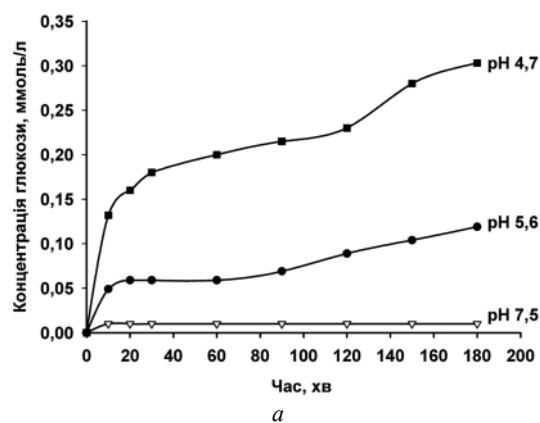


Рис. 1. Кінетика утворення глюкози при гідролізі крохмалю вугіллям СКН (а), СКН-Н⁺ (б), СКН-К⁺ (в) залежно від рН-розчину

Проведені дослідження спонукали авторів до кількісної оцінки та порівняння активності досліджуваних об'єктів із застосуванням законностей ферментативного каталізу.

Кінетика розкладання крохмалю об'єктами дослідження

Було досліджено кінетику розкладання крохмалю нативною амілазою (рис. 2) та досліджуваними об'єктами. Як приклад наведено кінетичні криві розкладання крохмалю вугіллям СКН (рис. 3) та іммобілізованою на ньому амілазою (рис. 4). Аналіз кінетичних кривих показав, що на перших хвилинах крохмаль взаємодіє із поверхнею адсорбенту, і його концентрація в розчині знижується. В процесі взаємодії крохмаль з вугіллям відбувається його гідроліз до макрочастинок, кожна з яких самостійно взаємодіє з розчином йоду. Тому спостерігається збільшення концентрації крохмалю в розчині. Через деякий час продукти гідролізу стають настільки малими, що не утворюють забарвлену сполуку при взаємодії з йодом [10].

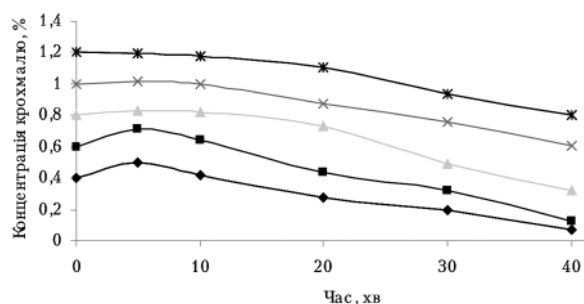


Рис. 2. Кінетика гідролізу крохмалю нативною амілазою

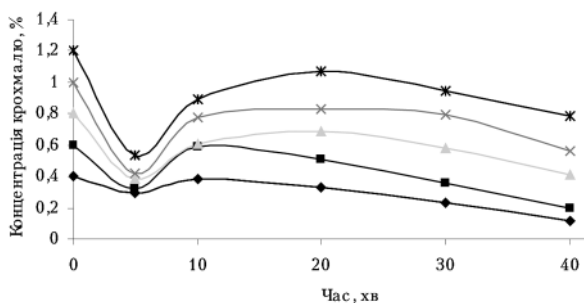


Рис. 3. Кінетика гідролізу крохмалю вугіллям СКН

Із кінетичних кривих гідролізу крохмалю було розраховано K_m (наведено у табл. 2) досліджених катализаторів, що дозволило розташувати їх у порядку зниження активності:

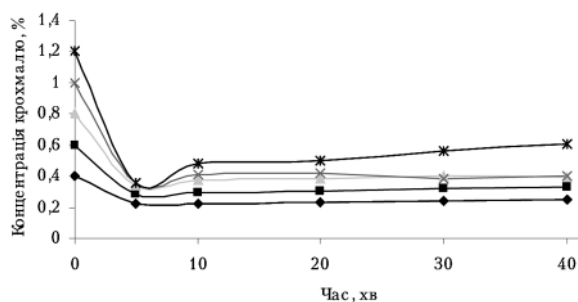
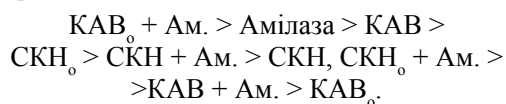


Рис. 4. Кінетика гідролізу крохмалю вугіллям СКН з адсорбційно іммобілізованою амілазою

Таблиця 2. Константи Міхаеліса–Ментен для досліджуваних систем

Вугілля	K_m , мМ
СКН	200 ($R^2=0,995$)
СКН + Амілаза	150 ($R^2=0,980$)
СКН ₀	125 ($R^2=0,943$)
СКН ₀ + Амілаза	200 ($R^2=0,930$)
Амілаза	99 ($R^2=0,954$)
КАВ	117 ($R^2=0,930$)
КАВ + Амілаза	286 ($R^2=0,951$)
КАВ ₀	333 ($R^2=0,950$)
КАВ ₀ + Амілаза	75 ($R^2=0,860$)

Встановлено, що всі досліджені зразки вугілля виявляють амілазну активність. При цьому, вугілля КАВ активніше, ніж СКН₀, СКН та КАВ₀. Окиснення вуглецевої поверхні призводить до збільшення амілазоподібної активності вугілля типу СКН, тоді як окиснення поверхні вугілля типу КАВ зменшує його каталітичну активність у реакції розкладання (гідролізу) крохмалю. Адсорбційна іммобілізація амілази підвищує активність КАВ₀ та СКН. При цьому іммобілізація на поверхні КАВ та СКН₀ призводить до інактивації комплексу вугілля-фермент.

Ймовірно, внаслідок того, що КАВ – макропористий матеріал, на відміну від СКН, амілаза при іммобілізації дифундує в пори і стає недоступною для макромолекул крохмалю. При цьому доступна поверхня вугілля зменшується і не бере участі в гідролізі. При іммобілізації амілази на окисненій поверхні КАВ₀ інактивація ферменту внаслідок конформаційних змін, радше за все, не відбувається або відбувається меншою мірою, ніж на поверхні активованого КАВ. Таким чином, окиснення запобігає конформаційним змінам ферменту на поверхні внаслідок наявності електростатичної взаємодії кисневмісних груп сорбенту із зарядженими групами ферменту.

Висновки

Досліджено, кількісно оцінено та порівняно каталітичну активність нативного ферменту амі-

лаза, активованого та окисненого вугілля марок СКН та КАВ, сольових форм вугілля СКН, ферменту амілаза, адсорбційно іммобілізованого на вугіллі в реакції розкладання (гідролізу) крохмалю різної концентрації.

Встановлено, що наявність іонів H^+ , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} на поверхні вугілля відіграє суттєву роль у маніфестації амілазної активності. Показано, що найактивнішими є мідна та цинкова форми.

Застосовано закони кінетики ферментативних реакцій для кількісного оцінювання амілазної активності обраних об'єктів шляхом розрахунку констант Міхаеліса із кінетичних кривих

розкладання крохмалю в інтервалі концентрації субстрату 0,4–1,2 %.

Показано, що як активоване вугілля, так і його окиснені форми виявляють амілазну активність. Досліджені каталізатори розташовано у порядку зниження активності $КАВ_0 + Ам. > Амілаза > КАВ > СКН_0 > СКН + Ам. > СКН, СКН_0 + Ам. > > КАВ + Ам. > КАВ_0$.

Встановлено, що адсорбційна іммобілізація амілази на поверхні зразків вугілля збільшує каталітичну активність $КАВ_0$ та СКН. Іммобілізація ферменту на поверхні КАВ та СКН₀ призводить до інактивації комплексу вугілля-фермент.

- [1] Бакалинская О. Н. Получение углеродных сорбентов с биоспецифической активностью / О. Н. Бакалинская, Н. М. Коваль, Н. Т. Картель // Эфферентная терапия. – 2003. – Т. 9, № 2. – С. 16–22.
- [2] Бакалинская О. Н. Применение углеродных сорбентов с биоспецифической активностью в экстракорпоральной детоксикации / О. Н. Бакалинская, Н. М. Коваль, Н. Т. Картель // Эфферентная терапия. – 2004. – Т. 10, № 1. – С. 21–26.
- [3] Бакалинская О. Н. Синтез и исследование биоспецифических углеродных гемосорбентов на основе углей СКН, СКС и КАУ / О. Н. Бакалинская, Н. М. Коваль, Н. Т. Картель // Эфферентная терапия. – 2005. – Т. 11, № 1. – С. 33–39
- [4] А.с. СССР № 1341907 А1. МКИ С 01 В 31/16, В 01 J 20/20, А 61 К 33/44. Способ получения углеродного гемосорбента / Н. Т. Картель, В. В. Стрелко, Ю. П. Бутылин и др. (СССР). – № 1341907; заявл. 03.02.86; дата регистрации 01.06.87.
- [5] А.с. СССР № 1341821 А1. В 01 J 20/20, А 61 К 33/44. Углеродный энтеросорбент и способ его получения / В. В. Стрелко, К. С. Терновой, Ю. П. Бутылин и др. (СССР). – № 1341821; заявл. 03.02.86; дата регистрации 01.06.87.
- [6] Кельцев Н. В. Основы адсорбционной техники / Н. В. Кельцев. – М.: Химия, 1984. – 592 с.
- [7] Экспериментальные методы в адсорбции и молекулярной хроматографии / [под ред. А. В. Киселева]. – М.: Изд-во МГУ, 1973.
- [8] Айвазов Б. В. Практикум по химии поверхностных явлений и адсорбции / Б. В. Айвазов. – М.: Высшая школа, 1973. – 208 с.
- [9] Глевацька К. В. Кількісна оцінка каталазної активності вуглецевих сорбентів медичного призначення / К. В. Глевацька, О. М. Бакалінська, М. Т. Картель // Доповіді НАН України. – 2008. – Т. 8. – С. 126–131.
- [10] Химия углеводов / [Кочетков Н. К., Бочков А. Ф. Дмитриев А. И. и др.] – М.: Химия, 1967. – 672 с.

T. Dmytrenko, N. Koval, O. Bakalinska, N. Kartel

AMYLASE ENZYME-LIKE ACTIVITY OF CARBON MATERIALS OF SCN AND KAU TYPES

Catalytic activity of native enzyme amylase, activated and modified (oxidized in H-form) carbon adsorbents of SCN and KAU type, some salt forms of SCN carbon material, amylase immobilized by adsorption on carbon surface in decomposition reaction (hydrolysis) of different concentration starch (0,4–1,2 %) were investigated, numerically evaluated and compared. The kinetic of starch decomposition on selected objects is investigated by the calculation of Michaelis-Menten constant. Showed that both activated carbon and its oxidized forms reveal amylase activity. Catalysts are posted according to the decrease of their activity. It was shown that adsorptive immobilization of amylase on the surface of active carbons increases the catalytic activity of KAU_0 and SCN. Immobilization of enzyme on the surface of KAU and SCN_0 leads to inactivation of enzyme-active carbon complex. It was determined, that some ions (H^+ , K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}) on the carbon surface play essential role in manifestation of amylase like catalytic activity. Copper and Zink salt forms are more active.

Keywords: catalysis, amylase activity, carbon adsorbents.