



УДК 577.152.110*32.03:541.128.135

БЕЗДЕТЕРГЕНТНЫЕ МИКРОЭМУЛЬСИИ КАК СРЕДА
ДЛЯ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ: КАТАЛИТИЧЕСКИЕ
СВОЙСТВА ЛАККАЗЫ В ТРЕХКОМПОНЕНТНОЙ СИСТЕМЕ
ГЕКСАН — ПРОПАНОЛ-2 — ВОДА

Хмельницкий Ю. Л., Гладилли А. К., Неверова И. Н.*,
Левашов А. В.*, Мартинек Е.***

Институт биохимии им. А. Н. Баха Академии наук СССР, Москва;

** Кафедра химической энзимологии Московского государственного
университета им. М. В. Ломоносова;*

*** Институт органической химии и биохимии ЧСАН,
Прага, ЧССР*

Изучены каталитическая активность и стабильность лакказы, растворенной в трехкомпонентной системе гексан — пропанол-2 — вода. В области бездетергентной микроэмульсии каталитическая активность и стабильность фермента максимальны по сравнению с другими областями на фазовой диаграмме трехкомпонентной системы и сопоставимы с соответствующими характеристиками фермента в водном растворе. Для оценки природы микросреды внутри микроэмульсионных капель была использована спектральная метка — витрат-анион. Установлено, что микросреда внутри микроэмульсионных капель по полярности соответствует 75%-ному водному раствору пропанола-2. Показана принципиальная возможность многократной регенерации лакказы из бездетергентной микроэмульсии с сохранением каталитической активности.

В последнее время значительно возрос интерес исследователей к конструированию биокаталитических систем в органических растворителях с низким содержанием воды (см. обзоры [1—10]). Применение таких систем дает ряд преимуществ по сравнению с традиционно используемыми водными растворами. Во-первых, решается проблема растворения гидрофобных субстратов. Во-вторых, термодинамическое равновесие многих ферментативных реакций сдвигается в сторону требуемых продуктов. В первую очередь это относится к тем реакциям, одним из продуктов которых является вода, в частности, к реакциям синтеза сложноэфирных, пептидных и амидных связей. В-третьих, применение органических растворителей во многих случаях позволяет решить проблему защиты от бактериального заражения технологических установок, которая весьма остро стоит при использовании водных растворов.

Широкое практическое использование неводных биокаталитических систем в значительной степени ограничивается тем обстоятельством, что органические растворители, как правило, оказывают на ферменты денатурирующее воздействие. Для защиты ферментов от инактивации под действием органических растворителей разработан ряд подходов, таких, как использование двухфазных систем, иммобилизация, включение ферментов в обращенные мицеллы поверхностно-активных веществ (ПАВ) и т. д. (см. обзоры [1—10]). Недавно нами был предложен новый подход к конструированию биокаталитических систем в неводных растворителях, основанный на использовании бездетергентных микроэмульсий [11, 12]. Бездетергентные микроэмульсии [13, 14] образуются в тройных системах, состоящих из углеводорода, пропанола-2 (или *n*-пропанола) и воды, и представляют собой термодинамически стабильные и оптически прозрачные дисперсии водных микрокапель в углеводородном растворителе. Микрокапли стабилизированы молекулами спирта, адсорбированными на их поверхности, и обладают сферической симметрией. Ранее нами было

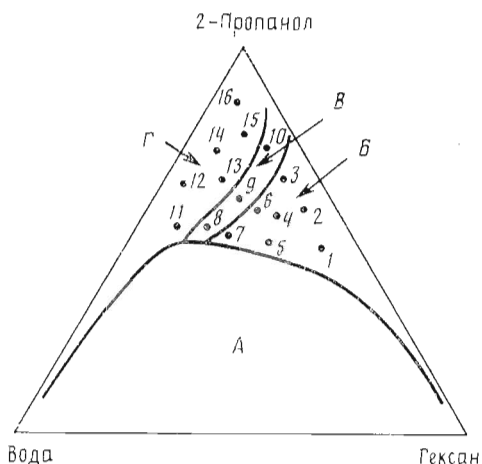


Рис. 1. Фазовая диаграмма трехкомпонентной системы гексан — пропанол-2 — вода (2 мМ цитрат натрия, рН 4,5) при 20° С. Концентрации компонентов приведены в мольных долях. Пронумерованные точки представляют системы, изученные в данной работе (таблица). Области на диаграмме: А — расслоения; В — бездетергентных микроэмульсий; В — ассоциатов молекул воды и пропанола-2, соединенных водородными связями; Т — истинных тройных растворов. Границы областей определены кондуктометрическим титрованием по методике [13]

показано, что различные ферменты, такие, как трипсин [11, 12], химотрипсин [11], холестеролоксидаза и каталаза [15], сохраняют каталитическую активность и стабильность при растворении в бездетергентных микроэмульсиях, состоящих из гексана, пропанола-2 и воды. Сохранение каталитической активности обеспечивается благодаря тому, что молекулы фермента включаются внутрь водных микрокапель и защищены против денатурации органическим растворителем слоем воды толщиной 5–7 Å [16]. В этом отношении бездетергентные микроэмульсии аналогичны широко используемым в качестве среды для ферментативных реакций системам обратенных мицелл [8–10]. Однако в отличие от последних бездетергентные микроэмульсии полностью свободны от ПАВ, что существенно упрощает процедуру отделения продуктов реакции и регенерации фермента [15].

Целью настоящей работы явилось исследование возможности использования бездетергентных микроэмульсий в качестве среды для реакций, катализируемых лакказой (КФ 1.10.3.2). Этот фермент способен катализировать окисление самых разнообразных органических соединений, в том числе плохо растворимых в воде [17]. В последнем случае применение неводной реакционной среды особенно предпочтительно. В задачу работы входило также изучение свойств микроокружения фермента внутри микроэмульсионных капель и исследование возможности регенерации лакказы из бездетергентной микроэмульсии для повторного использования.

Согласно Смиту и Бардену [13], структуры фаз в различных областях фазовой диаграммы тройной системы гексан — пропанол-2 — вода описываются следующими четырьмя областями (рис. 1). Область А соответствует нестабильным непрозрачным макроэмульсиям, которые при стоянии самопроизвольно разделяются на две фазы. Растворы, соответствующие трем другим областям на диаграмме (В, В и Г), стабильны и оптически прозрачны. В области Г существуют нормальные тройные растворы гексана, пропанола-2 и воды, не содержащие каких-либо микроструктур. Область В соответствует микроэмульсиям, состоящим из водных микрокапель, диспергированных в среде с высоким содержанием гексана. Существование в области В дисперсной фазы, обладающей свойствами объемной воды, было подтверждено методом ЯМР [14]. Область В — промежуточная между областями В и Г; в ней присутствуют диспергированные в органической фазе агрегаты молекул воды и пропанола-2, соединенные водородными связями.

Каталитическая активность и стабильность лакказы в трехкомпонентных системах гексан — пропанол-2 — вода. Важнейшим результатом работы является тот факт, что при растворении лакказы в бездетергентной микроэмульсии с низким содержанием воды фермент сохраняет каталитическую активность. Значения каталитической активности лакказы (V/V_0), растворенной в трехкомпонентных системах гексан — пропанол-2 — вода различного состава (см. таблицу), свидетельствуют, что каталити-

**Каталитическая активность и стабильность лакказы, растворенной
в трехкомпонентных системах гексан — пропанол-2 — вода**

Система *	Состав системы, % (по объему)			V/[E], мин ⁻¹	k · 10 ² ***, ч ⁻¹
	гексан	пропанол-2	вода **		
Бездетергентные микроэмульсии					
1	59,8	38,6	1,6	1398	—
2	49,9	49,0	1,1	413	—
3	40,4	58,1	1,5	784	3,2
4	47,5	49,8	2,7	1544	—
5	49,2	46,5	4,3	2140	5,1
6	40,3	55,7	4,0	1362	—
7	39,2	54,1	6,7	2067	—
Переходная область					
8	30,0	61,7	8,3	1642	12,9
9	33,5	61,5	5,0	1350	9,2
10	30,3	68,1	1,6	711	—
Нормальные тройные растворы					
11	20,2	68,7	11,1	1501	—
12	9,0	82,2	8,8	421	—
13	23,6	70,8	5,6	761	—
14	14,7	80,6	4,7	625	—
15	19,6	77,8	2,6	299	22,3
16	8,9	89,1	2,0	96	—
—	—	—	100	10 600	0,5

* Номер системы соответствует номеру точки на рис. 1.

** 2 мМ цитрат натрия, pH 4,5.

*** Константа скорости реакции инактивации первого порядка.

ческая активность фермента достигает максимального значения в области микроэмульсий. В точке максимума (точка 5 на рис. 1) величина каталитической активности составляет около 20% от наблюдаемой в водном растворе, хотя общее содержание воды в этой микрогетерогенной системе не превышает 7% (по объему).

Будучи растворенной в бездетергентной микроэмульсии, лакказа не только проявляет максимальную по сравнению с состоянием в других областях фазовой диаграммы каталитическую активность, но и обладает наибольшей стабильностью. Этот вывод следует из сопоставления констант скорости реакции инактивации первого порядка, приведенных в таблице для ряда систем гексан — пропанол-2 — вода.

Каталитическая активность и стабильность лакказы сохраняются, очевидно, благодаря тому, что молекула фермента находится внутри микрокапли воды, взвешенной в среде органического растворителя. Водная капля при этом стабилизирована адсорбированными на ее поверхности молекулами пропанола-2, как это показано на рис. 2. Такое строение ферментсодержащих микроэмульсионных капель было установлено нами ранее [16] на примере бездетергентных микроэмульсий, содержащих растворенный трипсин.

Каталитическая активность и стабильность лакказы в двойных смесях пропанол-2 — вода. Для того чтобы выяснить, дает ли введение третьего компонента (гексана) какой-либо выигрыш с точки зрения каталитической активности и стабильности лакказы, мы изучили поведение этого фермента в двойных смесях пропанол-2 — вода. Зависимость относительной активности и константы скорости реакции инактивации первого порядка от концентрации пропанола-2 в смеси (рис. 3) и сопоставление этих данных со значениями, представленными в таблице, показывает, что при сравнимых концентрациях воды каталитическая активность и стабильность лакказы гораздо выше в трехкомпонентных системах, чем в двойных смесях вода — пропанол-2. Таким образом, использование трехкомпонентных систем гораздо предпочтительнее.

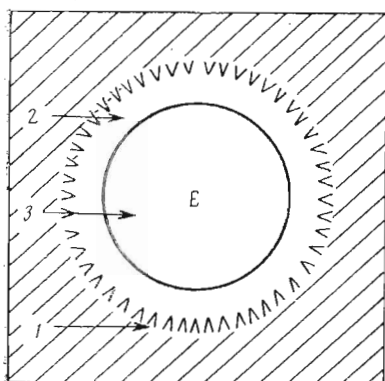


Рис. 2

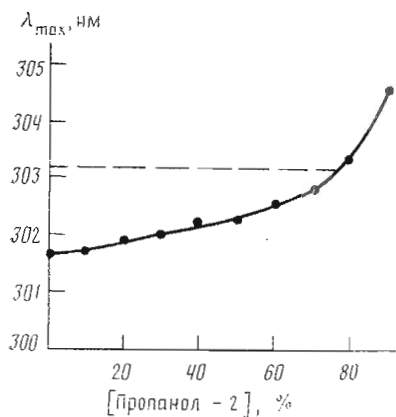


Рис. 4

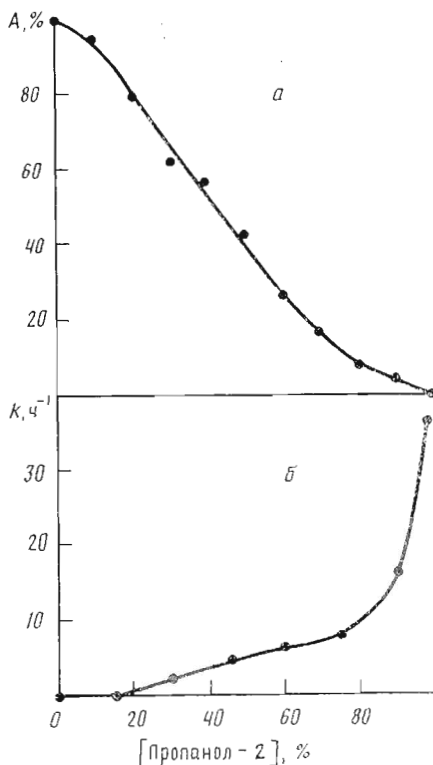


Рис. 3

Рис. 2. Схематическое изображение водной микроэмульсионной капли с включенной в нее молекулой фермента: 1 — молекула пропанола-2, 2 — водная микрокапля, 3 — молекула фермента. Штриховкой обозначен органический растворитель

Рис. 3. Зависимость относительной каталитической активности (а) и константы скорости реакции инактивации первого порядка (б) лакказы, растворенной в двойных смесях вода (2 мМ цитрат натрия, рН 4,5) — пропанол-2, от концентрации пропанола-2 (% по объему)

Рис. 4. Зависимость длины волны максимума поглощения нитрат-аниона от концентрации пропанола-2 в двойных смесях вод (2 мМ цитрат натрия, рН 4,5) — пропанол-2. Штриховкой отмечена длина волны максимума поглощения нитрат-аниона, растворенного в бездетергентной микроэмульсии состава, соответствующего точке 7 на рис. 1. Концентрация нитрат-аниона составила 0,1 М в расчете на объем имеющейся в системе воды

Природа микроокружения лакказы, солибилизированной в бездетергентной микроэмульсии. Для оценки природы среды внутри микроэмульсионных капель, где располагается солибилизированный фермент (рис. 2), мы воспользовались методом, основанным на применении низкомолекулярной метки — нитрат-аниона, спектральные свойства которого зависят от полярности его окружения [18]. При растворении в бездетергентных микроэмульсиях нитрат калия локализуется исключительно внутри водных микрокапель, поскольку, как мы убедились в отдельном эксперименте, нитрат калия нерастворим в двойных смесях гексан — пропанол-2, соответствующих по составу дисперсионной среде микроэмульсий. Следовательно, спектральные характеристики нитрат-аниона, растворенного в микроэмульсии, несут информацию о природе среды именно внутри микроэмульсионных капель, а не отражают некую усредненную полярность всей системы в целом.

Длина волны максимума поглощения нитрат-аниона, определенная в точке 7 области микроэмульсий на фазовой диаграмме (см. рис. 1), со-

ставляет 303,2 нм. Чтобы соотнести найденное положение максимума поглощения с полярностью микроокружения метки, необходимо изучить спектральные свойства той же метки, растворенной в некоторой стандартной среде известного состава. В качестве такой стандартной среды удобно использовать двойные смеси вода — пропанол-2, поскольку этот спирт, присутствуя в бездетергентных микроэмульсиях в высокой концентрации и обладая способностью неограниченно смешиваться с водой, должен присутствовать внутри водных микроэмульсионных капель [16]. Иными словами, водно-пропанольные смеси можно рассматривать как модель среды внутри водных микрокапель, существующих в бездетергентных микроэмульсиях.

Анализ зависимости длины волны максимума поглощения нитрат-аниона в смесях вода — пропанол-2 от состава смеси (рис. 4) показывает, что в бездетергентной микроэмульсии максимум поглощения нитрат-аниона наблюдается при такой же длине волны (303,2 нм), как в двойной водно-спиртовой смеси с содержанием пропанола-2 около 75% (по объему). На этом основании можно заключить, что микросреда внутри микроэмульсионных капель по полярности соответствует 75%-ному водному раствору пропанола-2. Этот результат совпадает с выводами, полученными нами ранее в экспериментах по определению полярности среды микроэмульсионных капель с использованием флуоресцентной метки [16].

Необходимо отметить, что истинное содержание пропанола-2 в микрокаплях составляет около 20% [16], т. е. намного меньше, чем следует из экспериментов по определению полярности. Это кажущееся противоречие можно объяснить, если учесть, что полярность среды внутри микроэмульсионных капель различной природы всегда намного ниже полярности той жидкости, из которой они образованы [19, 20]. В целом можно заключить, что по своим свойствам микросреда, в которой находится молекула фермента, включенная внутрь микроэмульсионной капли, существенно отличается от объемной воды. Именно этим, по-видимому, можно объяснить различие в каталитических свойствах и стабильности лакказы, растворенной в бездетергентной микроэмульсии и в воде (см. таблицу).

Регенерация фермента из бездетергентной микроэмульсии. Основная идея метода регенерации лакказы из бездетергентной микроэмульсии (рис. 5) состоит в том, что добавление избытка гексана к тройной системе, описываемой любой точкой в области *B*, *B* и *Г* фазовой диаграммы, приводит к перемещению этой точки в область *A* (см. рис. 1), которая соответствует нестациональным тройным смесям. Такие смеси легко расслаиваются на две несмешивающиеся фазы, состоящие в основном из воды и гексана соответственно [13]. Лакказа при этом остается в водной фазе и может быть использована повторно.

Фермент сохраняет значительную активность после осуществления нескольких циклов регенерации (рис. 6). Этот факт обеспечивает принципиальную возможность многократного использования фермента при проведении реакций в бездетергентных микроэмульсиях в реакторах периодического действия.

Экспериментальная часть

Материалы. Лакказа (КФ 1.10.3.2), выделенная из культуральной жидкости грибов *Coriolus versicolor*, представлена лабораторией ферментов сектора биокатализа армянского филиала «ИРЕА». Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически (610 нм), используя молярный коэффициент поглощения $4,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ [17]). Пирокатехин марки ч. Харьковского завода химреактивов очищали методом возгонки. Для приготовления растворов использовали перегнаный гексан марки ч. (Союзреактив) и пропанол-2 (Сhemapol, ЧССР, марки «для спектроскопии»). В качестве водной фазы для всех экспериментов применяли 2 мМ натрий-цитратный буфер, pH 4,5. Нитрат калия (Союзреактив, марки ос. ч.) использовали без очистки.

Тройные системы готовили путем смешивания рассчитанных количеств гексана, пропанола-2 и водного буфера. Смесь интенсивно встряхи-

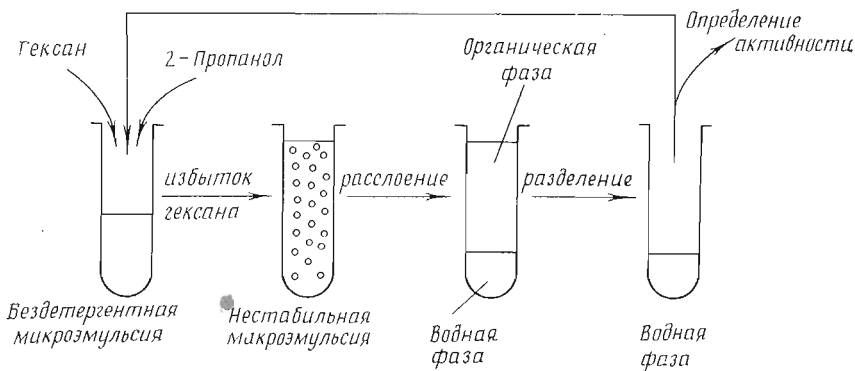


Рис. 5

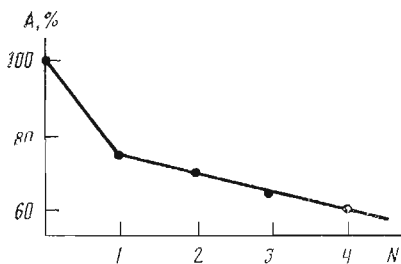


Рис. 6

Рис. 5. Последовательность операций при регенерации лакказы из бездетергентной микроэмульсии

Рис. 6. Зависимость относительной каталитической активности (A) лакказы от числа регенераций (N) из бездетергентной микроэмульсии, соответствующей по составу точке 5 на рис. 1

вали до образования стабильного прозрачного раствора. Дальнейшего уравнивания систем не требовалось. Лакказу и пирокатехин вводили в систему в виде концентрированных растворов в воде и пропанол-2 соответственно.

Измерение каталитической активности лакказы. К системе, состоящей из рассчитанных количеств гексана, пропанола-2 и водного буферного раствора, добавляли раствор фермента так, чтобы концентрация последнего составила $2 \cdot 10^{-8}$ М на весь объем системы. Реакцию инициировали путем добавления раствора пирокатехина в пропанол-2 в таком количестве, чтобы концентрация субстрата составила $3 \cdot 10^{-2}$ М на весь объем системы. Такая концентрация субстрата является насыщающей в данных условиях. Реакцию регистрировали при 25°C по изменению оптического поглощения при 385 нм с помощью спектрофотометра «Beckman-25» (США), снабженного термостатируемым кюветным отделением. Для расчета скорости реакции использовали определенный в независимом эксперименте молярный коэффициент поглощения продукта реакции, бензохинона, равный $515 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Каталитическую активность фермента в двойных смесях пропанол-2 — вода определяли аналогично.

Определение стабильности лакказы. Фермент инкубировали при 20°C в трехкомпонентной системе гексан — пропанол-2 — вода (2 мМ цитрат натрия, pH 4,5). Содержание активного фермента в смеси определяли через заданные промежутки времени методом отбора проб, измеряя каталитическую активность лакказы в реакции окисления пирокатехина, как описано выше. Стабильность лакказы в двойных смесях пропанол-2 — вода определяли аналогично.

Изучение спектров поглощения нитрат-аниона. В кювету спектрофотометра «Hitachi U-3400» (Япония) вносили рассчитанные для точки 7 на рис. 1 количества гексана, пропанола-2 и водного раствора нитрата калия. В кювету сравнения помещали аналогичную трехкомпонентную систему, но водная фаза в этом случае не содержала соли. Спектры поглощения нитрат-аниона, растворенного в двойных смесях пропанол-2 — вода, регистрировали аналогично. Концентрация нитрата калия во всех случаях составляла 0,1 М в расчете на объем имеющейся в системе воды. Определенный нами молярный коэффициент поглощения нитрат-аниона

при длине волны максимума поглощения во всех изученных системах составил $\sim 7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Регенерация лакказы из бездетергентной микроэмульсии. К $2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ водному раствору лакказы прибавляли рассчитанные количества гексана и пропанола-2, что приводило к образованию бездетергентной микроэмульсии состава, соответствующего точке 5 на рис. 1 (см. рис. 5). К полученной системе добавляли 5-кратный избыток гексана. Образующуюся при этом непрозрачную макроэмульсию подвергали центрифугированию (5 мин при 3000 об/мин), в результате которого система разделялась на две фазы — органическую и водную (содержащую фермент). Водную фазу отделяли и цикл повторяли. Перед началом эксперимента и по завершении каждого цикла из водной фазы отбирали пробу, в которой определяли активность лакказы по вышеописанной методике, используя в качестве реакционной среды водный буфер.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Мартинек К. // Биотехнология. 1988. Т. 4. № 3. С. 292—309.
2. Khmelnitsky Yu. L., Levashov A. V., Klyachko N. L., Martinek K. // Enzyme and Microb. Technol. 1988. V. 10. № 12. P. 710—724.
3. Laane C., Tramper J., Lilly M. D. (Eds) // Biocatalysis in Organic Media. Amsterdam: Elsevier, 1987.
4. Duarte J. C. // NATO ASI Ser., Ser. A. 1987. V. 128. P. 23—41.
5. Deetz J. S., Rozzell J. D. // Trends Biotechnol. 1988. V. 6. № 1. P. 15—19.
6. Zaks A., Russell A. J. // J. Biotechnol. 1988. V. 8. № 4. P. 259—270.
7. Carrea G. // Trends Biotechnol. 1984. V. 2. № 4. P. 102—106.
8. Мартинек К., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Хмельницкий Ю. Л., Березин И. В. // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. № 7. С. 669—696.
9. Martinek K., Berezin I. V., Khmelnitsky Yu. L., Klyachko N. L., Levashov A. V. // Coll. Czech. Chem. Commun. 1987. V. 52. № 10. P. 2589—2602.
10. Luisi P. L., Giomini M., Pileni M. P., Robinson B. H. // Biochim. et biophys. acta. 1988. V. 947. № 1. P. 209—246.
11. Хмельницкий Ю. Л., Жаринова И. Н., Березин И. В., Левашов А. В., Мартинек К. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 289. № 5. С. 1178—1181.
12. Khmelnitsky Yu. L., Zharinova I. N., Berezin I. V., Levashov A. V., Martinek K. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1987. V. 501. P. 161—164.
13. Smith G. D., Barden R. E. // Solution Behaviour of Surfactants/Eds Mittal K. L., Fendler E. J. N. Y.: Plenum Press, 1982. V. 2. P. 1225—1235.
14. Keiser B. A., Varie D., Barden R. E., Holt S. L. // J. Phys. Chem. 1979. V. 83. № 10. P. 1276—1280.
15. Khmelnitsky Yu. L., Hilhorst R., Veeger C. // Eur. J. Biochem. 1988. V. 176. № 2. P. 265—271.
16. Khmelnitsky Yu. L., Van Hoek A., Veeger C., Visser A. J. W. G. // J. Phys. Chem. 1989. V. 93. № 2. P. 872—878.
17. Reinhammar B. // Copper Proteins and Copper Enzymes/Ed. Lontie R. Boca Raton: CRC Press, 1984. V. 3. P. 1—36.
18. Balasubramanian D., Kumar C. // Solution Behaviour of Surfactants/Eds Mittal K. L., Fendler E. J. N. Y.: Plenum Press, 1982. V. 2. P. 1207—1223.
19. Wong M., Thomas J. K., Grätzel M. // J. Amer. Chem. Soc. 1976. V. 98. № 9. P. 2391—2397.
20. Zinsli P. E. // J. Phys. Chem. 1979. V. 83. № 25. P. 3223—3231.

Поступила в редакцию
10.IV.1989

DETERGENTLESS MICROEMULSIONS AS MEDIA FOR ENZYMATIC REACTIONS: CATALYTIC PROPERTIES OF LACCASE IN TERNARY SYSTEMS HEXANE — PROPANOL-2 — WATER KHMELNITSKY YU. L., GLADILIN A. K.*, NEVEROVA I. N.*, LEVASHOV A. V.**, MARTINEK K.**

A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow;

* Department of Chemistry, M. V. Lomonosov State University, Moscow;

** Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of Czechoslovakia, Prague

Catalytic activity and stability of laccase dissolved in ternary systems composed of *n*-hexane, propanol-2, and water were studied. The dependence of both catalytic activity and stability on the composition of the system revealed maxima coinciding with the microemulsion region of the phase diagram, the maximal values being comparable with corresponding enzyme characteristics observed in aqueous solutions. The polarity of the microenvironment inside microemulsion droplets corresponds to the polarity of 75% aqueous solution of propanol-2. A simple procedure suitable for recovery of the enzyme was developed.