



УДК 577.151.4 : 541.182

© 1990 г.

Н. Л. Клячко, Н. Г. Богданова, К. Мартинек,
А. В. Леваков*

ЗАМЕНА ВОДЫ НА ВОДНО-ОРГАНИЧЕСКУЮ СМЕСЬ В СИСТЕМАХ ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛ — ПУТЬ К ПОВЫШЕНИЮ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова;
* Институт органической химии и биохимии ЧСАН, Прага*

Изучены закономерности катализа α -химотрипсином, пероксидазой и лакказой в системах обращенных мицелл поверхностно-активных веществ (ПАВ), сольватированных водно-органическими смесями на основе глицерина, бутандиолов, DMSO. В качестве мицеллообразующих ПАВ использованы натриевая соль бис-2-этилгексилового эфира сульфоянтарной кислоты (Аэрозоль ОТ) в октане и бромистый цетилтриметиламмоний в смеси октан — хлороформ (1 : 1). Показано, что зависимость каталитической активности от степени сольватации ПАВ имеет колоколообразный вид, причем оптимум каталитической активности сольобилизованных в таких системах ферментов наблюдается в условиях геометрического соответствия размеров внутренней полости мицеллы молекуле белка. Найдено, что при снижении доли воды в водно-органической смеси (вплоть до 5 об.%) уровень оптимальной каталитической активности исследованных ферментов существенно увеличивается.

Общим приемом регуляции каталитической активности ферментов в системах гидратированных обращенных мицелл поверхностно-активных веществ (ПАВ) в органических растворителях служит изменение степени гидратации ПАВ ($w_0 = [H_2O]/[ПАВ]$). Как правило, зависимость каталитической константы от величины параметра w_0 , контролирующего размер мицелл, имеет колоколообразный вид (см. например, обзоры [1, 2]), причем оптимум каталитической активности наблюдается в условиях геометрического соответствия внутренней полости обращенной мицеллы молекуле фермента.

Иными словами, в случае катализа ферментами в системах обращенных мицелл геометрический фактор выступает на первый план, тогда как характеристики микроокружения фермента, в частности содержание воды, становятся менее существенными (в отличие от известной картины, наблюдаемой в водном растворе — см., например, [3]). В пользу такого вывода свидетельствуют факты, обнаруженные нами недавно [4] при изучении влияния на каталитическую активность α -химотрипсина замены воды во внутренней полости обращенных мицелл на глицерин: увеличение содержания глицерина в исследованной системе (вплоть до 95%) приводит к смещению оптимумов в сторону меньших значений степени гидратации ПАВ и повышению каталитической активности фермента. Данная работа направлена на детальное изучение этого явления, выявление общности наблюдаемых закономерностей при использовании различных растворителей и ферментов.

Используемые сокращения: ПАВ — поверхностно-активное вещество, АОТ, Аэрозоль ОТ — натриевая соль бис-2-этилгексилового эфира сульфоянтарной кислоты, СТАВ — бромид цетилтриметиламмония, DMSO — диметилсульфоксид, ВТНА — *n*-нитроанилид *N*-бензоил-*L*-тирозина.

Катализ α -химотрипсином в системах обращенных мицелл ПАВ, сольватированных водно-органическими смесями изучен в реакции гидролиза специфического субстрата этого фермента — BTNA [5]. В первую очередь в специальном эксперименте мы убедились, что как в водном растворе, так и в исследованных системах обращенных мицелл BTNA не подвергается гидролизу под действием химотрипсиногена — структурного аналога и предшественника α -химотрипсина. Этот факт означает, что наблюдаемая на опыте скорость реакции гидролиза BTNA в присутствии α -химотрипсина целиком обусловлена действием активного центра фермента и не осложнена дополнительным участием других функциональных групп белковой глобулы. Выбор субстрата обусловлен тем, что скоростелимитирующей стадией его гидролиза как в водном растворе, так и в исследованных системах обращенных мицелл является ацилирование фермента, характеризующееся константой скорости k_2 . Иными словами, определяемая на опыте величина каталитической константы, $k_{кат} = k_2$, не осложняется эффектами возможного влияния органического растворителя как дополнительного нуклеофильного агента (см., например, [6]). Здесь отметим, что на величины $k_{кат}$ или максимальной скорости реакции, V , в отличие от K_m в системах обращенных мицелл не влияет характер распределения реагентов [7—9], а сами величины $k_{кат}$ или V отражают истинную реакционную способность фермента.

Результаты экспериментов по определению величины каталитической константы скорости гидролиза BTNA α -химотрипсином, солюбилизованным в различных мицеллярных системах, приведены на рис. 1—4. Данные представлены в виде зависимости константы от степени гидратации ПАВ (w_0) — параметра, регулирующего размер внутренней полости мицеллы и каталитическую активность ферментов в системах обращенных мицелл [9] (рис. 1а—4а), — и в виде зависимости от концентрации сольватирующего мицеллу органического растворителя (рис. 1б—4б).

На рис. 1 и 2 представлены данные по влиянию соответственно глицерина и 2,3-бутандиола на каталитическую активность химотрипсина в системе АОТ/вода/октан (анионное ПАВ), на рис. 3 и 4 — аналогичные данные для глицерина и DMSO в системе СТАВ/вода/хлороформ — октан (катионное ПАВ). Введение смешивающегося с водой органического растворителя в реакционную систему вызывает существенное изменение профилей наблюдаемой зависимости каталитической активности от степени гидратации, а именно смещение кривых в сторону более «сухих» мицелл независимо от природы ПАВ и сольватирующего органического растворителя. При этом вплоть до 99% содержания смешивающегося с водой органического растворителя во внутренней полости обращенной мицеллы существенно повышается уровень каталитической активности по сравнению с уровнем, обнаруживаемым ферментом в водном растворе (штриховая линия на рис. 1—4).

Наблюдаемые эффекты можно проанализировать в рамках развиваемой нами [10, 11] концепции о том, что в системах обращенных мицелл ферменты проявляют максимальную каталитическую активность в условиях геометрического соответствия размеров молекулы белка и внутренней полости мицеллы. Так, в системе АОТ/вода/октан оптимум каталитической активности химотрипсина наблюдается при степени гидратации 10 (рис. 1а, 2а, кривые 1). Именно при этом значении w_0 реализуется геометрическое соответствие — равенство размеров внутренней полости мицеллы и молекулы α -химотрипсина (молекула химотрипсина аппроксимируется сферой с радиусом 22 Å [12]) в системах гидратированных обращенных мицелл [9—11]. Замена части воды на смешивающийся с нею органический растворитель приводит к тому, что оптимальная по размерам полость содержит меньшее количество воды. Для того чтобы продемонстрировать сохранение принципа геометрического соответствия для систем обращенных мицелл, сольватированных органическим растворителем, мы воспользовались результатами, представленными в работах Флетчера и сотр. [13, 14], по размерам обращенных мицелл АОТ и СТАВ, содержащих чистый глицерин. Согласно [13, 14], внутренняя полость ми-

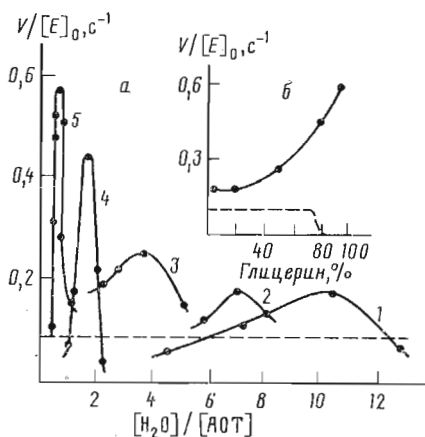


Рис. 1

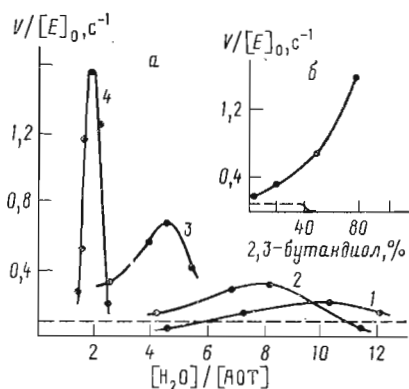


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость максимальной скорости реакции гидролиза BTNA, катализируемой α -химотрипсином; а — от степени гидратации обращенных мицелл при объемных соотношениях — вода/глицерин 1/0 (1), 4/1 (2), 1/1 (3), 1/4 (4) и 3/47 (5); б — от процентного (по объему) содержания глицерина в системе АОТ/вода — глицерин/октан. Здесь и на других рисунках штриховой линией показаны исследуемые параметры в водном растворе. Условия эксперимента: $[AOT] = 0,1 M$; 0,05 M трис-глицериновый буфер, pH 8,0; 25° C

Рис. 2. Зависимость максимальной скорости реакции гидролиза BTNA, катализируемой α -химотрипсином: а — от степени гидратации обращенных мицелл при объемных соотношениях вода/2,3-бутандиол 1/0 (1), 4/1 (2), 1/1 (3) и 1/4 (4); б — от процентного (по объему) содержания 2,3-бутандиола в системе АОТ/вода — 2,3-бутандиол/октан. Условия эксперимента см. в подписи к рис. 1

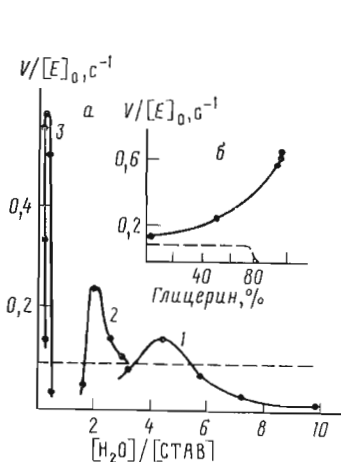


Рис. 3

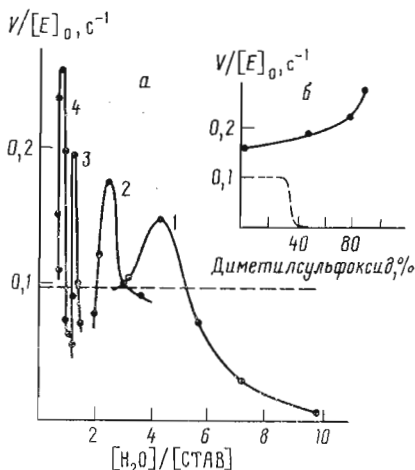


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость максимальной скорости реакции гидролиза BTNA, катализируемой α -химотрипсином: а — от степени гидратации обращенных мицелл при объемных соотношениях вода/глицерин 1/0 (1), 1/1 (2) и 1/19 (3); б — от процентного (по объему) содержания глицерина в системе СТАВ/вода — глицерин/октан: хлороформ (1 : 1). Условия эксперимента: $[СТАВ] = 0,1 M$, 0,05 M трис-глицериновый буфер, pH 8,0; 25° C

Рис. 4. Зависимость максимальной скорости реакции гидролиза BTNA, катализируемой α -химотрипсином: а — от степени гидратации обращенных мицелл при объемных соотношениях вода/DMSO 1/0 (1), 1/1 (2), 1/4 (3) и 1/9 (4); б — от процентного содержания DMSO в системе СТАВ/вода — DMSO/октан — хлороформ (1 : 1). Условия эксперимента см. в подписи к рис. 3

целлы принимает размер молекулы химотрипсина при степени сольватации, т. е. молярном соотношении глицерин/ПАВ, близком к 0,8. Представив профиль каталитической активности химотрипсина в виде зависимости от степени сольватации (рис. 5), видим, что оптимум каталитической активности химотрипсина как в системе АОТ/вода — глицерин/октан, так

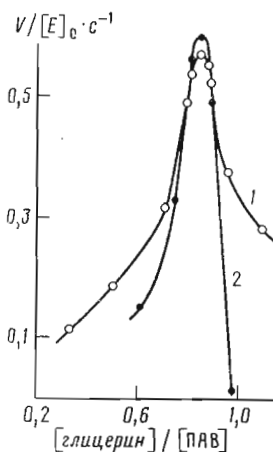


Рис. 5

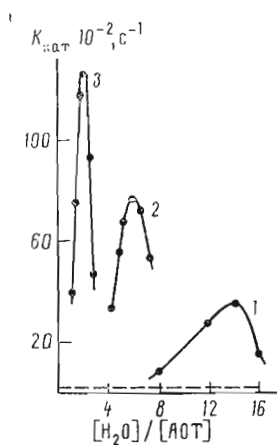


Рис. 6

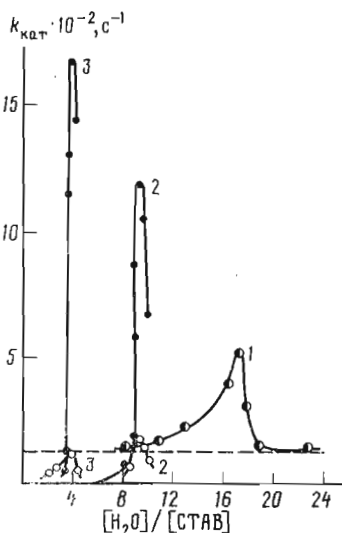


Рис. 7

Рис. 5. Зависимость каталитической активности α -химотрипсина от степени сольватации ПАВ в системе 0,1 М АОТ/вода — глицерин/октан (1) и 0,1 М СТАВ/вода — глицерин/октан (2) при объемном соотношении вода/глицерин 1 : 19. Условия эксперимента см. в подписи к рис. 1 и 3

Рис. 6. Зависимость каталитической константы реакции пероксидазного окисления пирогаллола в системе АОТ/вода — 2,3-бутандиол/октан от степени гидратации обращенных мицелл при объемных соотношениях вода/2,3-бутандиол 1/0 (1), 1/1 (2) и 1 : 4 (3). Условия эксперимента: [АОТ] = 0,1 М; 0,05 М фосфатный буфер, pH 7,0; 25° С

Рис. 7. Зависимость каталитической активности лакказы от степени гидратации обращенных мицелл в системе СТАВ/вода/2,3- или 1/4-бутандиол/октан при объемных соотношениях вода/1,4-бутандиол (светлые кружки), вода/2,3-бутандиол (темные кружки) 1/0 (1), 1/1 (2) и 1/4 (3). Условия эксперимента: [СТАВ] = 0,1 М, 25° С

и в системе СТАВ/вода — глицерин/октан — хлороформ наблюдается при одной и той же степени сольватации, равной 0,85. Сравнение данных рис. 5 и работ [13, 14] приводит к заключению о том, что в системах обращенных мицелл, сольватированных глицерином, так же как и в системах гидратированных обращенных мицелл, α -химотрипсин проявляет максимальную каталитическую активность в условиях геометрического соответствия молекулы фермента и внутренней полости мицеллы. По-видимому, и для других использованных растворителей соблюдается принцип геометрического соответствия внутренней полости мицеллы и молекулы белка.

Значения максимальной скорости реакции при оптимальных степенях гидратации (по данным рис. 1а—4а) представлены на рис. 1б—4б в зависимости от содержания органического растворителя (об. % по отношению к воде). Для сравнения приведены зависимости максимальной скорости реакции гидролиза ВТНА от содержания органического растворителя в водно-органической смеси, используемой в виде объемной реакционной среды (штриховые линии на рис. 1б—4б по данным работы [3]). Видно, что в отсутствие ПАВ увеличение концентрации органического растворителя выше определенного значения (80% для глицерина и 40% для бутандиола, DMSO) приводит к инактивации фермента. В присутствии обращенных мицелл не только не происходит такой инактивации, но, наоборот, каталитическая активность возрастает. Возможные молекуляр-

ные причины наблюдаемого явления обсуждаются в работе [15], в которой проведено детальное изучение конформационной подвижности активного центра химотрипсина методом спиновых меток. Повышение уровня каталитической активности химотрипсина в системах обращенных мицелл, сольватированных органическим растворителем, является следствием понижения конформационной подвижности белковой структуры в условиях геометрического соответствия размеров внутренней полости обращенной мицеллы и молекулы белка. Обнаружено [15], что более глубокому «замораживанию» молекулы химотрипсина соответствует более высокая каталитическая активность фермента.

Катализ пероксидазой был изучен на примере реакций окисления пирогаллола [16] и мезидина [17] перекисью водорода в системах АОТ/вода — 2,3-бутандиол/октан и АОТ/вода — глицерин/октан. Выбор субстратов обусловлен существованием для каждого из них единственного четко охарактеризованного продукта [18]. Кроме того, выбранные соединения — типичные представители двух различных групп веществ, являющихся субстратами пероксидазы, фенолов и аминов.

Закономерности изменения каталитической активности пероксидазы от степени гидратации аналогичны рассмотренным на примере химотрипсина (рис. 6). Независимо от выбора субстрата введение в систему АОТ/вода/октан (рис. 6, 1) 2,3-бутандиола (кривые 2, 3) вызывает сдвиг профилей и повышение оптимального значения каталитической активности. Результат свидетельствует, таким образом, об отсутствии специфики действия органического растворителя на фермент.

Катализ лакказой был изучен в системе СТАВ/вода/октан — хлороформ в присутствии 1,4- и 2,3-бутандиола и глицерина. В качестве модельной исследовалась реакция окисления пирокатехина кислородом. Увеличение концентрации 1,4-бутандиола до 80% сопровождается повышением каталитической активности фермента в 5 раз (рис. 7, 2б, 3б). В то же время замена воды во внутренней полости мицеллы на глицерин или 2,3-бутандиол приводит к снижению уровня максимальной скорости реакции в 4 раза (рис. 7, 2а, 3а). Причина аномального эффекта влияния 2,3-бутандиола и глицерина в опытах с лакказой, по-видимому, заключается в наличии специфического взаимодействия этих растворителей с ионом меди в активном центре фермента. Этот результат может служить косвенным подтверждением того, что смешивающиеся с водой органические растворители действительно локализуются вблизи белковой молекулы на расстоянии образования химической связи. Отметим, что в отсутствии ПАВ в водно-органических смесях специфические эффекты 2,3-бутандиола и глицерина не обнаруживаются [3].

Регуляция каталитической активности ферментов изменением концентрации ПАВ

Изменение концентрации ПАВ при постоянной степени гидратации приводит к изменению числа (концентрации) мицелл [19]. При этом для Аэрозоля ОТ и некоторых других ПАВ радиус внутренней полости и другие свойства мицелл остаются неизменными (см., например, [19—21]).

Это означает, что для ферментов, не влияющих на свойства мицелл, изменение концентрации ПАВ не является способом регуляции их каталитической активности [22]. Среди изученных ферментов представителем этой группы был α -химотрипсин (рис. 8а, прямая 2). Иная картина наблюдается для ферментов второй группы, способных по той или иной причине влиять на свойства мицелл. Так, пероксидаза и лакказа имеют на поверхности молекул якорные участки углеводной природы [23, 24], наличие которых, по-видимому, обеспечивает их взаимодействие с мицеллярной матрицей. В результате такого взаимодействия ферменты этой группы могут формировать микроокружение, наилучшим образом обеспечивающее проявление ими каталитической активности. Для таких ферментов обнаружена возможность регуляции их каталитической активности изменением концентрации ПАВ (рис. 8б, в, прямые 1) [25, 26].

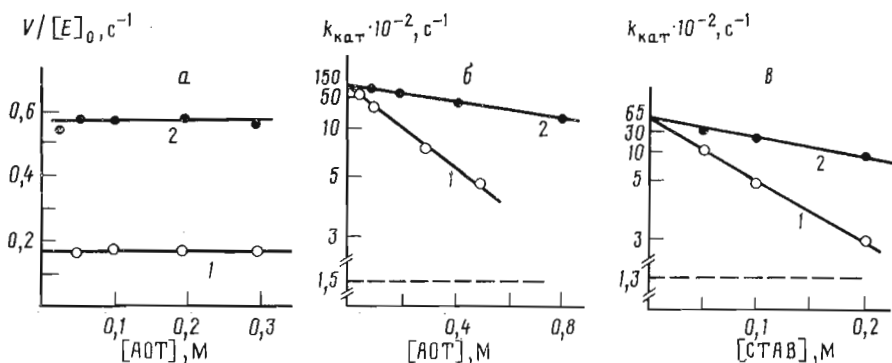


Рис. 8. Зависимость каталитической активности ферментов от концентрации ПАВ: а — α -химотрипсин в системе АОТ/вода — глицерин/октан при объемных соотношениях вода/глицерин 1/0 (1), 3/47 (2); б — пероксидаза в системе АОТ/вода — глицерин/октан при объемных соотношениях вода/глицерин 1/0 (1), 1/4 (2); в — лакказы в системе СТАВ/вода — 1,4-бутандиол/октан : хлороформ (1 : 1) при объемных соотношениях вода/1,4-бутандиол 1/0 (1), 1/4 (2). Условия эксперимента см. в подписях к рис. 1, 6, 7

В присутствии смешивающегося с водой органического растворителя для каждой данной концентрации ПАВ оптимальное значение $k_{кат}$ повышается (рис. 6, 7 и рис. 8б, в, прямые 2). В целом же зависимость $k_{кат}$ от [ПАВ] становится более слабо выраженной, и предельное значение, характеризующее $k_{кат}$ в изолированной мицелле, не подверженной воздействию пустых мицелл [22, 25] (экстраполяция к нулевой концентрации ПАВ), не зависит от того, вода или органический растворитель находится во внутренней полости.

Вероятно, роль смешивающегося с водой органического растворителя в случае ферментов второй группы сводится к предохранению этих ферментов, функционирующих в созданном ими микроокружении, от неблагоприятных контактов с пустыми мицеллами. В пользу такого предположения свидетельствуют данные работы [13, 14] о том, что замена воды во внутренней полости мицеллы на смешивающийся с нею органический растворитель приводит к повышению жесткости мицеллярной оболочки (увеличению времени нахождения молекулы ПАВ в одной мицелле) или вязкости среды внутренней полости.

Ферменты первой группы, не способные взаимодействовать с мицеллой, в присутствии смешивающегося с водой органического растворителя попадают в микроокружение, в котором проявляют более высокий уровень каталитической активности (ср. прямые 1 и 2 на рис. 8а), т. е. использование систем обращенных мицелл, сольватированных органическими растворителями, дает уникальную возможность регуляции каталитической активности ферментов первой группы с существенным повышением $k_{кат}$, что невозможно осуществить другим способом.

Таким образом, варьируя состав среды обращенных мицелл, можно конструировать высокоактивные биокаталитические системы с низким содержанием воды (вплоть до одной молекулы на молекулу фермента). Этот факт позволяет вплотную подойти к решению вопроса о том, каковы критические количества воды, необходимые ферменту для катализа. Работа в этом направлении ведется в нашей лаборатории.

Экспериментальная часть

В работе был использован α -химотрипсин (КФ 3.4.21.1) фирмы Reanal (ВНР). По данным титрования активных центров α -химотрипсина по методике [27], содержание активного фермента в препарате составляло 60%. Пероксидаза (КФ 1.11.1.7) марки А Олайнского завода биопрепаратов, $RZ = 3,1$. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически по поглощению при длине волны 403 нм ($\epsilon_{403} = 91\,000\, M^{-1} \cdot cm^{-1}$ [28]). Препарат лакказы (КФ 1.10.3.2) из штамма грибов *Poliporus versicolor* был

выделен, очищен и любезно предоставлен Г. Пепанян (химический факультет МГУ). Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически по поглощению при длине волны 610 нм ($\epsilon_{610} = 4900 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [24]).

n-Нитроанилид *N*-бензоил-*L*-тирозина (BTNA) — препарат фирмы Sigma (США). Пирогаллол (Wako, Япония) очищали возгонкой в вакууме. Концентрацию перекиси водорода (ос. ч., Союзреактив) определяли спектрофотометрически при длине волны 230 нм ($\epsilon_{230} = 72,7 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [29]).

Натриевая соль бис-2-этилгексилевого эфира сульфоянтарной кислоты (АОТ; Merck, ФРГ), по данным ИК-спектроскопии, содержала 0,4 моль воды на 1 моль ПАВ, что учитывалось при расчете общего количества воды в системе. Бромид цетилтриметиламмония (СТАВ; Chemapol, ЧССР) очищали осаждением эфиром из спиртового раствора препарата. После выдерживания в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 в течение нескольких суток препарат содержал 0,2 моль воды на 1 моль СТАВ. Препараты СТАВ, не содержащие гидратационной воды, получали высушиванием в пистолете Фишера при температуре кипения CCl_4 в течение 6—8 ч.

Октан (Союзреактив) очищали по методике [30]. Хлороформ (Союзреактив) очищали промыванием водой и перегонкой над P_2O_5 непосредственно перед экспериментом. Глицерин (Союзреактив) очищали перегонкой в вакууме с последующим хранением над молекулярным ситом 4 Å.

2,3- и 1,4-Бутандиол, DMSO (Fluka) использовались без дополнительной очистки.

Изучение катализа α -химотрипсином. В кювету, содержащую 2 мл 0,1 М раствора ПАВ (АОТ в октане или СТАВ в смеси хлороформ — октан, 1 : 1), вносили 3 мкл 40—150 мМ раствора BTNA в смеси ацетонитрил — диоксан (1 : 1), 0—30 мкл 50 мМ трис-НСI-буфера, рН 8,0, и 0—30 мкл смешивающегося с водой органического растворителя до достижения заданного значения степени гидратации (w_0) и соотношения вода/органический растворитель и энергично встряхивали. Затем добавляли 1—5 мкл 1—10 мМ раствора химотрипсина в смеси 50 мМ трис-НСI-буфер и 50 мМ глициновый буфер (рН конечного раствора фермента равнялся 8,0), снова интенсивно встряхивали.

За реакцией гидролиза BTNA следили спектрофотометрически при длине волны 380 нм по образованию *n*-нитроанилина. Величина молярного коэффициента поглощения ϵ_{380} *n*-нитроанилина, определенная в независимом эксперименте, слабо зависит от степени гидратации и соотношения вода/органический растворитель и составляет 9000—11 000 $\text{M}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Максимальную скорость ферментативной реакции определяли по зависимости скорости от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера — Берка.

Изучение катализа пероксидазой. Реакция окисления мезидина. К 2 мл 0,1 М раствора АОТ в октане добавляли 5 мкл 0,1—0,5 М раствора мезидина в 2,3-бутандиоле, 0—200 мкл 20 мМ ацетатного буфера, рН 5,0 и энергично встряхивали. Затем вносили 1 мкл 0,3 мМ раствора пероксидазы в 20 мМ фосфатном буфере, рН 7,0 (конечное значение рН было 5,0). Реакцию инициировали внесением 3 мкл раствора перекиси водорода в 20 мМ ацетатном буфере, рН 5,0).

За реакцией следили спектрофотометрически по образованию продукта 2,6-диметилбензохинон-4-(2,4,6-триметил)-анила при длине волны 490 нм ($\epsilon_{490} = 790 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$).

Каталитическую константу определяли, анализируя зависимость скорости реакции от концентрации мезидина при насыщающей концентрации перекиси водорода.

Реакция окисления пирогаллола. К 2 мл 0,1 М раствора АОТ добавляли 3 мкл 0,15—0,5 М раствора пирогаллола в ацетоне, 0—30 мкл 2,3-бутандиола и 0—30 мкл 20 мМ фосфатного буфера, рН 7,0, для достижения заданной степени гидратации и соотношения вода/бутандиол. Затем добавляли 2 мкл 0,1 мМ раствора пероксидазы в 20 мМ фосфатном буфере, рН 7,0. Реакцию инициировали внесением 2 мкл 4—20 мМ раствора перекиси водорода. За реакцией следили спектрофотометрически при длине волны 420 нм по образованию продукта — пурпурогаллина ($\epsilon_{420} =$

= 4400 М⁻¹см⁻¹). Каталитическую константу определяли как описано в работе [25].

Зависимость каталитической константы реакции пероксидазного окисления пирогаллола от концентрации ПАВ. К 2 мл 0,05—0,8 М раствора АОТ добавляли 3 мкл 0,15—0,5 М раствора пирогаллола в ацетоне, 20 мМ фосфатный буфер, рН 7,0 (0—30 мкл) и глицерин (0—200 мкл). Затем вносили 2 мкл 0,1 мкМ раствора пероксидазы и 2 мкл 20—90 мМ раствора перекиси водорода. Каталитическую константу определяли путем анализа зависимости скорости реакции от концентрации обоих субстратов как описано в работе [25].

Катализ лакказы. К 1 мл 50—200 мМ раствора СТАВ, содержащему 10—50 мМ пирокатехина, добавляли 1—80 мкл 20 мМ фосфатно-ацетатного буфера, рН 3,5—5,5, и 0—60 мкл бутандиола до достижения заданной степени гидратации и соотношения вода/бутандиол. Затем вносили 2 мкл 15 мкМ раствора лакказы, энергично встряхивали и в полученном оптически прозрачном растворе спектрофотометрически определяли скорость ферментативной реакции по поглощению продукта, *o*-бензохинона, при длине волны 417 нм ($\epsilon_{417} = 520 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ [26]). Каталитическую константу определяли в координатах Лайнуивера — Берка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мартинек К., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Хмельницкий Ю. Л., Березин И. В. // Биол. мембраны. 1985. Т. 2. С. 669—696.
2. Martinek K., Klyachko N. L., Kabanov A. V., Khmel'nitsky Yu. L., Levashov A. V. // Biochim. et biophys. acta. 1989. V. 981. P. 161—172.
3. Родионова М. В., Белова А. Б., Можжаев В. В., Березин И. В. // Биотехнология. 1988. Т. 4. С. 69—72.
4. Клячко Н. Л., Богданова Н. Г., Левашов А. В., Кабанов А. В., Пшежецкий А. В., Хмельницкий Ю. Л., Мартинек К., Березин И. В. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 297. С. 483—487.
5. Vindy H. F. // Analyt. Biochem. 1962. V. 3. P. 431—435.
6. Березин И. В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа. М.: Высшая школа, 1977. 280 с.
7. Левашов А. В., Клячко Н. Л., Паптин В. Н., Хмельницкий Ю. Л., Мартинек К. // Биоорг. химия. 1980. Т. 6. № 6. С. 929—943.
8. Martinek K., Levashov A. V., Klyachko N. L., Pantin V. I., Berезин I. V. // Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 657. P. 277—294.
9. Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Д., Мартинек К. // Успехи химии. 1984. Т. 53. С. 545—564.
10. Левашов А. В., Клячко Н. Л., Мартинек К. // Биоорг. химия. 1981. Т. 7. № 5. С. 670—679.
11. Белоногова О. В., Лихтенштейн Г. И., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Хмельницкий Ю. Л., Мартинек К. // Биохимия. 1983. Т. 48. С. 379—386.
12. Squire P. G., Himmelf M. E. // Arch. Biochem. Biophys. 1979. V. 196. P. 165—177.
13. Fletcher P. D. I., Galal M. F., Robinson B. H. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1984. V. 80. P. 3507—3514.
14. Fletcher P. D. I., Galal M. F., Robinson B. H. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1985. V. 81. P. 2053—2065.
15. Клячко Н. Л., Богданова Н. Г., Кольцов В. К., Левашов А. В., Мартинек К. // Биохимия. 1989. Т. 54. № 7. С. 1224—1230.
16. Dure L. S., Cormier M. J. // J. Biol. Chem. 1964. V. 239. P. 2351—2359.
17. Brill A. S., Weinryb I. // Biochemistry. 1967. V. 6. P. 3528—3535.
18. Saunders B. C., Holdwes-Siedle A. G., Stark B. R. Peroxidase. L.: Butterworths, 1964. 271 с.
19. Zulauf M., Eicke H.-F. // J. Phys. Chem. 1979. V. 83. P. 480—486.
20. Fletcher P. D. I., Howe A. M., Perrin N. M., Robinson B. H., Toprakcioglu C., Dore J. C. // Surfactant in solution / Eds Mittal K. L., Lindman B. N. Y.: Plenum Press, 1984. V. 2. P. 1745—1758.
21. Clarke J. H. R., Nicholson J. D., Regan K. N. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. I. 1985. V. 81. P. 1173—1185.
22. Кабанов А. В., Клячко Н. Л., Пшежецкий А. В., Наметкин С. Н., Мартинек К., Левашов А. В. // Молекуляр. биология. 1987. Т. 21. С. 275—286.
23. Welinder K. G., Smillie L. B. // Can. J. Biochem. 1972. V. 50. P. 63—90.
24. Reinhammar B. // Copper Proteins and Copper Enzymes. V. 3. / Ed. Brown B. Acad. Press, 1979. P. 1—35.
25. Клячко Н. Л., Левашов А. В., Мартинек К. // Молекуляр. биология. 1984. Т. 16. С. 1019—1031.
26. Пшежецкий А. В., Меркер Ш., Клячко Н. Л., Пепанян Г. С., Левашов А. В., Мартинек К. // Биохимия. 1988. Т. 53. С. 1013—1016.

27. *Schonbaum G. R., Zerner B., Bender M. L.* // *J. Biol. Chem.* 1961. V. 236. P. 2930—2935.
28. *Maethly A. C.* // *Meth. Enzymol.* 1953. V. 2. P. 801—813.
29. *George P.* // *Biochem. J.* 1953. V. 54. P. 267—271.
30. *Мартинек К., Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Семенов А. Н., Березин И. В.* // *Докл. АН СССР.* 1981. Т. 256. С. 1423—1426.

Поступила в редакцию
27.VII.1989

N. L. KLYACHKO, N. G. BOGDANOVA, K. MARTINEK *, A. V. LEVASHOV

REPLACEMENT OF WATER BY WATER-ORGANIC MIXTURE
IN REVERSED MICELLAR SYSTEMS AS A WAY TO INCREASE
THE EFFICIENCY OF ENZYMATIC CATALYSIS

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

**Institute of Organic Chemistry and Biochemistry,
Czechoslovakian Academy of Sciences, Prague, CSSR*

Catalytic properties of α -chymotrypsin, peroxidase, and laccase dissolved in the system of surfactant reversed micelles solvated by aqueous glycerol, butanediols, and dimethylsulfoxide were studied. As micelle-forming surfactants, sodium salt of di-2-ethylhexyl sulfosuccinate (Aerosol OT) in octane and cetyltrimethylammonium bromide in octane — chloroform (1 : 1) mixture were used. The dependence of catalytic activity on the surfactant solvation degree was bell-shaped. Optima of catalytic activity of enzymes solubilized in such systems were observed when diameters of micellar inner cavity and of the entrapped protein molecule were equal. With decreasing water content on water-organic mixtures (down to 5 vol. %) the level of the optimal catalytic activity of the enzymes increased considerably.