



УДК 577.151'162.088.53:577.334

© 1993 г. Б. П. Николаев, Д. К. Торопов, А. М. Шляков
ИССЛЕДОВАНИЕ РАБОТЫ МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ
КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР *Escherichia coli*
В МИКРОЭМУЛЬСИОННЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ СРЕДАХ
МЕТОДАМИ ^{31}P -ЯМР И СПИНОВОГО ЗОНДИРОВАНИЯ

Всероссийский научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов,
С.-Петербург

В микроэмульсионных тройных композициях на основе тридекана, неионного детергента Твин 81 и контролируемого небольшого количества воды методом ^{31}P -ЯМР изучена кинетика утилизации глюкоза-6-фосфата (G6P), уровня неорганического фосфата P_i и других метаболитов у *E. coli*. Работа электрон-транспортной цепи мембран клеток оценивалась по скорости восстановления экзогенных нитроксильных радикалов. Обнаруженное торможение ферментативной активности белков гликолиза и ЭТЦ клеточных структур вызывается понижением активности воды a_w внешней микроэмульсионной среды без перехода липопротеинов клеточной стенки в мицеллярные формы. Регуляция ферментативных процессов осуществляется через лимитирование мицеллярной диффузии субстрата и уменьшение активности воды a_w при интенсивном межмолекулярном обмене связанной воды микроэмульсионной фазы и белков клеточных структур.

В настоящее время считается, что для проявления каталитической активности ферментов наличие воды в качестве свободного растворителя не обязательно, а для стабилизации нативной глобулярной организации молекулы фермента достаточно мономолекулярного гидратного слоя. Такую точку зрения подтверждают эксперименты по осуществлению ферментативных реакций с участием гидролаз, оксиредуктаз, протеиназ и электронпереносящих белков группы цитохромов в мицеллярных органических средах как с малым содержанием воды [1—7], так и в абсолютно сухих полярных растворителях [8, 9]. Микроэмульсии оказались особенно удобными объектами для изучения ферментативного катализа, так как в них мягкую солюбилизацию белка можно сочетать с гибким изменением содержания воды. В микроэмульсиях удается реализовать последовательные цепи реакций с участием нескольких ферментов, например лактатдегидрогеназы и пируваткиназы, глюкозооксидазы и каталазы [2, 10].

Удачная реконструкция работы мультиферментных комплексов митохондриальной АТФ-азы в микроэмульсиях толуола, стабилизированных Тритоном X-100 и фосфолипидами, доказывает возможность совмещения их субъединичных белков с органическими растворителями и ПАВ [11]. Исследование реакций метаболизма, катализируемых ферментами *E. coli* в микроэмульсионных органических средах, представляет практический интерес для решения проблем микробной трансформации органических соединений в биореакторах [12]. Прямое изучение ферментативных реакций в обезвоженных клетках также существенно для разработки методов консервации ферментных препаратов и изучения анабиоза [13].

Сокращения: G6P — глюкоза-6-фосфат, ЭТЦ — электрон-транспортная цепь клетки, FDP — фруктоза-1,6-дифосфат, TEMPO — 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-4-оксипиперазин-1-оксил, SDS — 5-додецилстеариновая кислота, TEMPO — 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил, СВ — сверхтонкое взаимодействие.

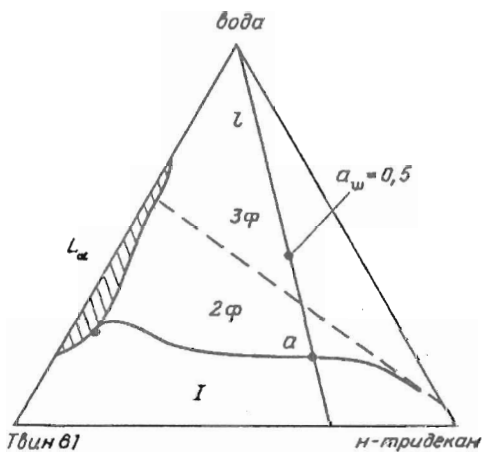


Рис. 1. Фазовая диаграмма тройной системы Твин 81 — тридекан — вода при 18° С. I — изотропная фаза, L_{α} — жидкокристаллическая фаза, 2ф — двухфазные микроэмульсии, 3ф — область трехфазных равновесий, l — линия изменения содержания воды в микроэмульсионных препаратах клеток *E. coli*

Тестирование биохимических реакций обычно осуществляют дезинтегрированием клеточных препаратов и экстракцией ферментов водно-солевыми растворами. Это резко ограничивает возможности работы с интегральными белками в органических средах или с интактным клеточным материалом. Ненарушающие методы спектроскопии ЯМР и ЭПР выгодно отличаются возможностью исследования реакций метаболизма в интактных клетках и тканях [14]. Так, методом ^{31}P -ЯМР были подробно изучены пути метаболических превращений фосфорилированных интермедиатов в клетках *E. coli* [16—18], в грамположительных бактериях [19, 20], в клетках дрожжей [21], в растительных клетках и в форменных элементах крови [22]. Все известные примеры изучения ферментативных реакций относятся к оводненным, или регидратированным, клеткам, в которых влияние активности воды рассматривается в совокупном трудно интерпретируемом результате общей процедуры обезвоживания — регидратации [13].

В данной работе измерение уровня метаболитов — интермедиатов гликолитических и окислительно-восстановительных реакций клеточных структур бактерий *E. coli* — мы осуществляли непосредственно в момент установления требуемых значений активности воды a_w . Измерения выполнены последовательным измерением спектров ^{31}P -ЯМР и ЭПР первичных метаболитов клеток, помещаемых в жидкие органические среды с регулируемым содержанием воды. Беспрепятственный подвод субстратов обеспечивали через органические среды благодаря высокой сольбилизирующей способности выбранного типа микроэмульсии. Для этих целей нами разработана тройная композиция тридекан — вода — Твин 81, не оказывающая инактивирующего действия на клетки *E. coli* при высоком содержании ПАВ (25 об.%). По данным предварительного изучения физико-химических свойств, наша система относится к типу микроэмульсий Винзора II. При избыточном содержании воды (18 об.%, 20°С) она образует двухфазные микроэмульсии (рис. 1), а в области I фазовой диаграммы дает устойчивую «гомогенную» фазу с мицеллами нанометрового размера. Капли микроэмульсии имеют вид обращенных мицелл: их ядра состоят из свободной воды и гидратной воды полиоксиэтильных групп Твин 81. Свободная вода мицеллы образует зону сольбилизации молекул глюкоза-6-фосфата (Г6Р) и спиновых зондов. Предварительные данные о спектральном поведении спиновых зондов, ядер ^1H , ^2H воды и Твина 81 были получены ранее [23, 24]. Предложенная микроэмульсионная система подчиняется общим закономерностям поведения микроэмульсий на основе полиоксиэтилированных ПАВ типа C_{12}EO_j [25, 26], она обнаруживает более высокую температурную чувствительность агрегатного состояния по сравнению с системами ионных ПАВ и в отличие от них не оказывает лизирующего действия на микроорганизмы.

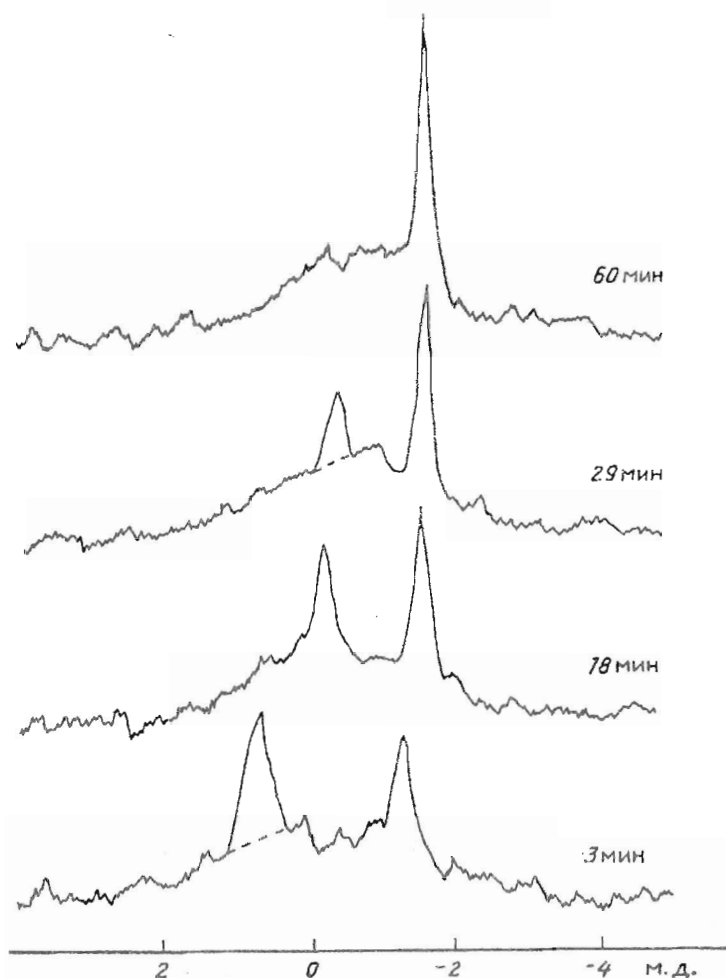


Рис. 2. Динамика изменения во времени вида спектров ^{31}P -ЯМР суспензии клеток *E. coli* ($5 \cdot 10^{11}$ клеток/мл, 22°C) в физиологическом растворе после прибавления глюкоза-6-фосфата в анаэробных условиях

Функционирование гликолитических ферментов клетки *E. coli*

Спектры ^{31}P -ЯМР концентрированных суспензий клеток *E. coli* (10^{11} клеток/мл) мы измеряли в ампулах малого объема (2 мл) при лимитации по фосфору и кислороду. По оценкам парамагнитного измерения линий радикалов в спектрах ЭПР, аноксия наступала практически сразу после заливки суспензии клеток в ампулу спектрометра. Поэтому измеренные спектры ЯМР клеток отражают условия анаэробноза, при которых *E. coli* быстро расходует эндогенные макроэргические соединения АТФ и АДФ и теряет трансмембранный потенциал. В отличие от спектров ^{31}P -ЯМР клеток *E. coli* активного дыхания, выращенных на богатой питательной среде [16, 17], в спектрах клеток, поставленных в условия анаэробноза, остаются пики внутреннего (P_i^{in}) и внеклеточного ортофосфата (P_i^{out}) и сигнал резонанса G6P (рис. 2). В области химических сдвигов 5—10 м.д. наблюдались слабые уширенные сигналы нуклеозидфосфатов. При интенсивной оксигенации и при добавлении глюкозы происходило расщепление сигнала ортофосфата P_i из-за возникновения градиента рН в мембранах.

В суспензии клеток на стационарной фазе роста значения рН составляли pH^{in} 6,7 и pH^{out} 6,55. На первых минутах утилизации Г6Р клетками микроэмульгированных препаратов в результате реакции, катализируемой фосфофруктокиназой с участием АТФ [27], в спектрах наблюдалось появление сигнала второго ключевого продукта гликолиза — фруктоза-1,6-дифосфата (FDP). В ходе синтеза последнего отмечалось аномальное смещение сигнала Г6Р в сильное поле.

Динамика изменения вида спектра ЯМР состояла в уменьшении интенсивности пика Г6Р и нарастании пика неорганического фосфата с общим монотонным смещением пиков Г6Р и P_i в сторону сильного поля. В водной суспензии клеток *E. coli* полная утилизация Г6Р завершалась в течение 1 ч, а в микроэмульгированных системах его усвоение замедлялось. В микроэмульсиях с содержанием воды 3% остаточный уровень субстрата составлял около 70%. Прекращение реакции фосфорилирования и достижение порогового насыщения по ортофосфату P_i проходило симбатно. При инактивации клеток гликолитическое усвоение Г6Р снижалось до нуля. Активное усвоение Г6Р, сопутствующее накопление фосфатсахаров и подкисление среды присуще только неповрежденным мембранам *E. coli*, а при повреждении мембран в процессе конвективной сушки клетки утрачивают способность понижать рН среды [28, 29]. Механизм гликолиза *E. coli* на богатых глюкозой питательных средах подробно изучен в работах [16, 27], и картина изменений спектров ^{31}P -ЯМР является отражением хода реакций, катализируемых ферментами гликолиза [29—32]. При проверке действия лизатов клеток на скорость расщепления Г6Р в микроэмульсионных средах не было обнаружено заметного разложения Г6Р в течение контрольного времени.

Включение клеток *E. coli* в микроэмульсионные среды различной влажности мы проводили так, чтобы объем микроэмульсии многократно превышал биомассу бактерий. При этом было обнаружено, что последовательности наступления спектральных изменений резонанса ^{31}P фосфорсодержащих метаболитов в микроэмульсионных средах и в водных суспензиях не различались. Динамика изменений химического сдвига (δ) и интенсивности пиков (I) резонанса Г6Р и P_i в процессе анаэробной утилизации Г6Р в эмульсионных препаратах и в водной суспензии клеток приведена на рис. 3—6. Как можно видеть из этих рисунков, реакция гликолиза Г6Р заметно замедляется по мере уменьшения содержания воды в микроэмульсии. Мы считаем, что торможение ферментативных реакций расщепления Г6Р при обработке клеток *E. coli* углеводородными растворами Твина 81 не связано с разрушением липопротеинового матрикса мембран. Действительно, известно, что при жидкокристаллической организации липидов в бислойных структурах мембран резонанс фосфатных групп проявляется в виде широких, анизотропно уширенных пиков [33]. Измерения же спектров ^{31}P -ЯМР липосомных препаратов липидов *E. coli* показывают, что появление мицеллярных частиц в бислое сопровождается возникновением в спектре узких изотропных сигналов фосфатных групп [34, 35]. Образование дефектов в мембранах, идентифицируемых как мицеллярные частицы, усиливается при фазовых расслоениях и солюбилизации амфифильных молекул и спиртов в липидные бислои. Поскольку в наших микроэмульсионных препаратах не были зафиксированы изотропные линии ^{31}P -ЯМР липидов, очевидно, что структуры липопротеиновых комплексов в мембранах при контакте с мицеллярной фазой сохранялись. Такое поведение мембран в наших препаратах резко контрастирует с многочисленными данными о нарушении барьера проницаемости и жидкокристаллическости липидов мембран в присутствии мицеллообразующих ПАВ в водных растворах [36].

Работа нитроксилредуктазной системы в микроэмульсиях Твина 81

Белки терминального участка ЭТЦ бактерии находятся в цитоплазматической мембране и являются вероятным местом воздействия микроэмульсионной фазы. Известно, что интактные клетки *E. coli* имеют эффективную нитроксилредуктазную систему, локализованную на периферии [37—39]. Способность интактных

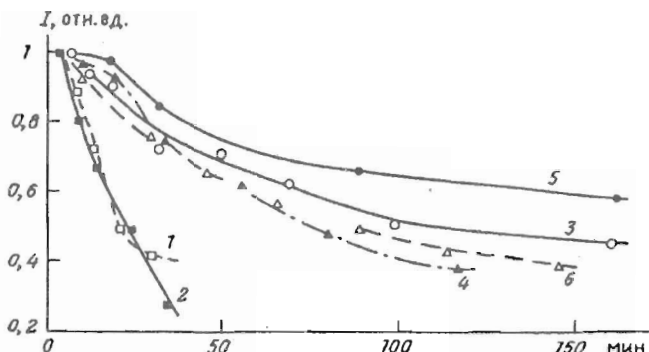


Рис. 3. Динамика изменения интегральной интенсивности (I) сигнала ^{31}P -ЯМР глюкоза-6-фосфата при его утилизации клетками *E. coli* в микроэмульсиях Твин 81 в процессах дегидратации и регидратации. 1 — водная суспензия клеток в начале серии измерений (4 ч хранения при 4°C после культивирования); 2 — водная суспензия клеток по завершении серии измерений (52 ч хранения после культивирования). Дегидратация клеток сухой микроэмульсией Твин 81 — тридекан в течение 1 ч до влажности $29^{\text{a}}/13^{\text{б}}$ об. % (3); до влажности $29^{\text{a}}/13^{\text{б}}$ об. % с последующей регидратацией клеток в течение 15 мин (23 об. %) до влажности 42^{a} об. % (4); до влажности $12^{\text{a}}/9^{\text{б}}$ об. % (5); до влажности $12^{\text{a}}/9^{\text{б}}$ об. % с последующей регидратацией в течение 15 мин до влажности 28^{a} об. % (6). Плотность суспензии $5 \cdot 10^{11}$ клеток/мл. б — влажность супернатанта (микроэмульсионная фаза), измеряемая методом ^1H -ЯМР, а — влажность, рассчитанная на весь объем образца

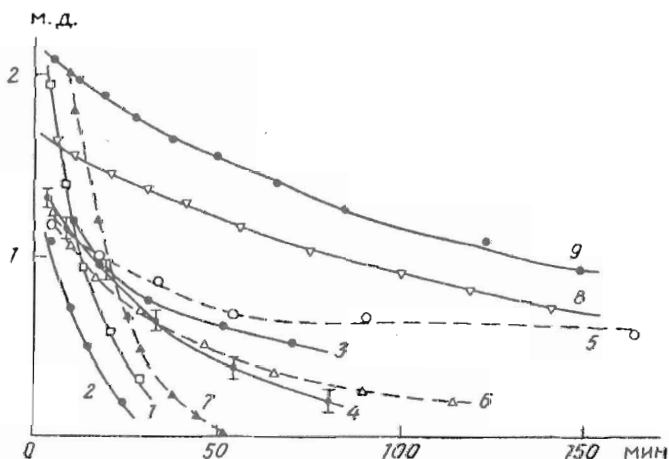


Рис. 4. Динамика изменения химического сдвига (δ , м. д.) сигнала ^{31}P -ЯМР глюкоза-6-фосфата при его утилизации клетками *E. coli* в микроэмульсиях Твина 81 в процессах дегидратации и регидратации. Кривые 1—6 измерены при условиях, приведенных на рис. 3; 7 — водная суспензия клеток в начале серии экспериментов (14 ч хранения при 4°C после культивирования). 8 — дегидратация клеток сухой микроэмульсией Твин 81 — тридекан в течение 1 ч до влажности $6^{\text{a}}/2^{\text{б}}$ об. %; 9 — дегидратация клеток сухой микроэмульсией в течение 1 ч до влажности $3^{\text{a}}/1^{\text{б}}$ об. %. Плотность суспензии и обозначения влажности см. рис. 3

клеток *E. coli* восстанавливать нитроксильные радикалы не зависит от фазы роста культуры, она сохраняется в микроэмульсионных препаратах на основе Твина 81 и быстро пропадает при инактивации клеток нагреванием (60°C , 10 мин). Поскольку функционирование нитроксилредуктазной системы приводит к восстановлению радикальных фрагментов $>\text{N}-\cdot\text{O}$ спиновых зондов до гидроксил-аминов, нитроксильная группа выступает конкурентным кислороду окислительным эквивалентом. Ее восстановление начинается при исчерпании растворенного в микроэмульсионной среде кислорода, а при последующей продувке микроэмульсии газообразным кислородом происходит быстрое окисление гидроксил-аминов до

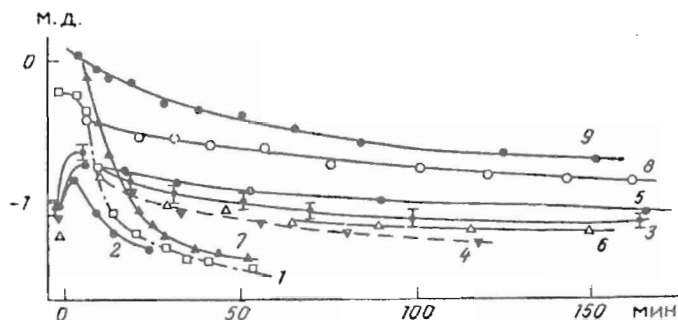


Рис. 5. Динамика изменения химического сдвига (δ , м.д.) P_i при анаэробной утилизации глюкоза-6-фосфата клетками *E. coli* в микроэмульсиях Твин 81 — тридекан в процессах дегидратации и регидратации. Обозначения кривых 1—6 см. рис. 3; 7 — контроль водной суспензии клеток в начале серии экспериментов (14 ч хранения при 4° С после культивирования). Дегидратация клеток сухой микроэмульсией Твин 81 — тридекан в течение 1 ч до влажности $6^a/2^b$ об.% (8) и $3^a/1^b$ об.% (9). а, б — обозначения влажности как на рис. 3

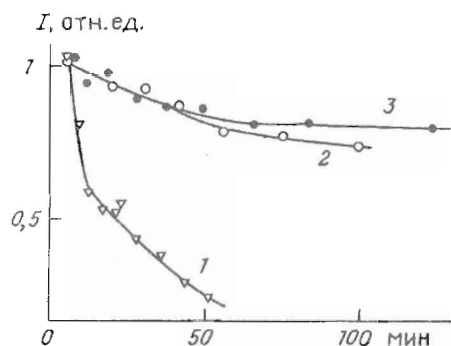


Рис. 6.

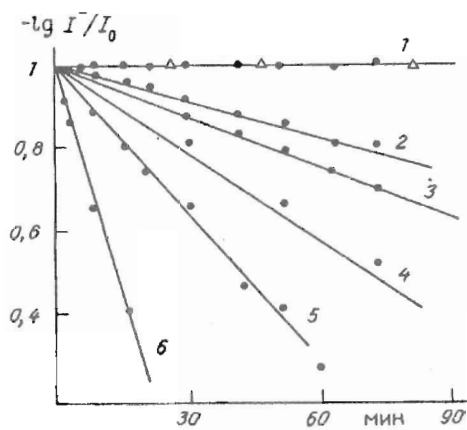


Рис. 7

Рис. 6. Динамика изменения интегральной интенсивности (I) сигнала ^{31}P -ЯМР глюкоза-6-фосфата при его утилизации клетками *E. coli* в микроэмульсиях Твин 81 — тридекан. 1 — водная суспензия клеток в начале серии экспериментов (14 ч хранения при 4° С после культивирования). Дегидратация клеток сухой микроэмульсией в течение 1 ч до влажности $6^a/2^b$ об.% (2), до влажности $3^a/1^b$ об.% (3). а, б — обозначения влажности как на рис. 3

Рис. 7. Кинетические кривые убывания интенсивности компоненты I^- спектра ЭПР спинового зонда TEMPO в результате восстановления клетками *E. coli* в микроэмульсионных средах Твин 81 — тридекан — вода с содержанием воды 5 (2), 10 (3), 15 (4), 20% (5). 6 — водная суспензия клеток *E. coli*, 1 — инактивированные клетки. Данные для зонда SDS обозначены треугольником. Плотность популяции $5 \cdot 10^{11}$ клеток/мл

исходных нитроксидов, что сопровождается появлением сигнала ЭПР радикала. Спектры ЭПР спиновых зондов TEMPO, TEMPOL и SDS, введенных в микроэмульсионные препараты, не отличались по форме от спектров мицеллярных растворов и имели вид характерных триплетов, причем константа СТВ не зависела от времени корреляции молекулярного движения (τ_c) и целиком определялась делокализацией спиновой плотности орбиталей $2p_x$ атома ^{14}N при взаимодействии с молекулами растворителя. Увеличение числа гидратации (ω) Твина 81 при добавлении воды в углеводородный раствор Твина 81 меняло величину константы СТВ водорастворимого зонда TEMPO по линейному закону.

Константа СТВ зонда 5DS не зависела от содержания воды в микроэмульсии и совпадала со значением СТВ для его раствора в тридекане.

Графики изменений пиковой интенсивности (I^-) высокополевой компоненты спектра зонда TEMPOL (кривые 2—5) и гидрофобного радикала 5DS (кривая 1) в микроэмульсиях, содержащих клетки *E. coli*, представлены на рис. 7. Относительная пиковая интенсивность (I^-) сигнала ЭПР водорастворимого спинового зонда в препаратах *E. coli* в макроэмульсиях с избытком внеклеточной воды и в микроэмульсиях высокой степени дисперсности убывала по экспоненте. Увеличение плотности популяции клеток сопровождалось возрастанием скорости реакции восстановления. Вид кинетических кривых убывания парамагнетизма за время наблюдения определяется закономерностями диффузионно-контролируемых реакций на поверхности клеток, осложненных конкуренцией за реакционный субстрат $>N-O$ [40]. Дифференциальное диффузионное уравнение для средней концентрации радикалов N со стоками на поверхности клеток эффективного радиуса R имеет в общей форме вид

$$\frac{\partial N}{\partial t} = D_0 \nabla^2 N - 4\pi K D_0 R \rho N,$$

где ρ — плотность клеток в суспензии, D_0 — коэффициент диффузии радикала относительно отдельной клетки, K — константа Больцмана, ∇ — оператор Лапласа.

Для концентрированных суспензий клеток решение уравнения со стационарным условием сводится к решению уравнения Лапласа с граничным условием на поверхности клетки. Численное решение этого уравнения с учетом эффекта препятствий показывает, что зависимость величины потока радикалов, погибающих в клетке, пропорциональна коэффициенту диффузии, а количество радикалов в среде описывается экспоненциальной зависимостью вида $I^-/I_0^- = 1 - \exp(-at)$ [41]. Данные экспериментов, приведенные на рис. 7, хорошо соответствуют этим представлениям. Незначительное убывание численности жизнеспособных клеток не влияет на корректность приведенного математического описания. В случае гидрофобного зонда его восстановление клетками не наблюдалось. Совпадение константы СТВ зонда в тридекане и микроэмульсии и постоянство интенсивности его сигнала ЭПР указывают на существование гидрофильной непроницаемой пленки между центрами восстановления ЭТЦ бактерии и микроэмульсионной фазы. Водорастворимый зонд диффундирует через этот барьер, перераспределяется из микроэмульсии в гидрофильный слой и переходит в липолисахаридные структуры внешней мембраны, где восстанавливается на соответствующих центрах ЭТЦ.

Нитроксилредуктазная система *E. coli* и полиферментная система ЭТЦ совпадают друг с другом. Бактерия гибко переключает дыхание на новые анаэробные окислительные субстраты [27], а фракционирование белковых компонентов ЭТЦ или их солюбилизация обращениями мицеллами ведут к утрате функции переноса электрона [42]. Выявление отчетливой кинетики восстановления радикалов в анаэробном состоянии клеток в микроэмульсионной фазе Твина 81 свидетельствует о сохранении функциональной целостности белков в ЭТЦ после контакта с органическим экстрагентом. Для мультибелковых образований клеточных мембран в микроэмульсионных средах фактор активности водного растворителя приобретает главную роль, тогда как остальные играют существенную роль при разрушении целостного белкового комплекса с утратой функции переноса электрона.

Регуляция активности ферментных систем E. coli содержанием воды микроэмульсионных сред

Изменение содержания воды в интервале активности $a_w = 0,1 - 0,5$ проводили по линии 1 фазовой диаграммы микроэмульсии (рис. 1). По сравнительным оценкам концентрации воды в микроэмульсионном супернатанте методом 1H -ЯМР

и ее расчетного значения в целом объеме эмульсии гидратирующая способность осмолитов клетки оказалась примерно вдвое выше степени гидратации полиэфирных групп Твина 81. При контакте клеток *E. coli* с сухими микроэмульсионными растворами Твина 81 происходило обезвоживание клеток с выравниванием активности воды до общего значения a_w . После включения клеток в сухие углеводородные растворы Твина 81 до конечной активности воды $a_w = 0,1$ титр *E. coli* составлял 10 млрд./мл. Для сравнения укажем, что уменьшение коагуляции клеток *E. coli* при высушивании над P_2O_5 составляло 5—6 порядков и нарастало при хранении [42, 43].

В графиках кинетических зависимостей уровня G_6P , P_i и их химических сдвигов (δ) в зависимости от влажности микроэмульсии обращает на себя внимание монотонный характер перехода через границу макроэмульсионного расслоения, отмеченную на диаграмме рис. 1 точкой *a*. Точка фазового состояния *a* соответствует моменту выделения избыточной воды (выше 18%) в отдельные капли, в которых располагаются клетки *E. coli*. Уменьшение скорости поглощения G_6P и восстановление радикалом TEMPOЛ ЭТЦ бактерий по сравнению с контролем выше точки расслаивания связано с конечным коэффициентом массопередачи на границе раздела микроэмульсия — вода. При содержании воды ниже точки расслоения микроэмульгированная вода вокруг клетки стягивается до адсорбционного слоя. С этого момента начинается контактное обезвоживание и сокращение размеров клетки. Одновременно эмульсия просветляется из-за сближения показателей преломления цитозоля и внешней гидрофобной среды.

Похожие результаты при исследовании ферментативной активности β -галактозидазы клеток *Saccharomyces*, *Acinetobacter* и *Corynebacter* в микроэмульсиях Твина 85 — изопропилпальмитат — гексадекан были получены в работах [44, 45]. Взаимодействие с водорастворимыми субстратами — G_6P и нитроксильным радикалом TEMPOЛ — осуществляется свободно путем сольубилизации обращенными мицеллами, которые проходят через полупроницаемый липополисахаридный барьер внешней мембраны *E. coli* [46], а затем разрушаются с высвобождением G_6P и радикалов. Благодаря резкому различию поверхностной энергии *E. coli* (67 эрг/см^2) и микроэмульсионной фазы (30 эрг/см^2) экстрегент плохо смачивает муреиновый слой клеточной оболочки [47—49] и тонкая прослойка адсорбированной воды клеточной поверхности обеспечивает защиту ферментов фосфофруктокиназы, трансфераз и белков ЭТЦ бактерии от денатурирующего воздействия гидрофобного растворителя, не препятствуя водному обмену цитозоля и микроэмульсионной среды. Клеточную стенку с прилегающим адсорбированным водным слоем можно рассматривать как жидкие микроэмульсионные мембраны, которые обеспечивают селективное поглощение субстрата [45—50].

Суммируя итоги работы, можно сделать следующие заключения относительно закономерностей поведения сложных мультиферментных систем, включенных в микроэмульсии органического растворителя в составе целых клеток *E. coli*:

1) мультиферментные системы начальных участков гликолитического пути утилизации G_6P и окислительного фосфорилирования сохраняют функциональную целостность в органических средах микроэмульсионного строения на основе Твина 81;

2) торможение ферментативных реакций гликолиза и ЭТЦ бактерии происходит в результате уменьшения активности воды a_w в микроэмульсионной фазе.

Экспериментальная часть

Клетки *E. coli* К-12 выращивали на глюкозо-минеральной среде до стационарной фазы с концентрацией $(5-6) \cdot 10^9$ клеток/мл, далее концентрировали в течение 25 мин на центрифуге при 3500 об/мин, отмывали в физиологическом растворе и после 14 ч хранения при 4°C направляли на приготовление эмульсионных препаратов. Эмульсионные формы готовили перемешиванием осаждаемых

клеток с избытком раствора Твина 81 в тридекане при соотношении объемов 1:3 с последующим разбавлением до конечной концентрации клеток $5 \cdot 10^{11}$ клеток/мл. Выживаемость клеток в препаратах контролировали высеванием на твердые питательные среды.

Микроэмульсии готовили смешением 1 объема детергента Твина 81 с 3 объемами тридекана (ч.) взбалтыванием в течение 3 мин до образования прозрачного раствора при добавлении дистиллированной воды. Детергент Твин 81 (polyoxyethylene sorbitan monooleate, $n \sim 5$) синтезирован по спецзаказу фирмой «Serva». Питательный субстрат G6P (Sigma) и нитроксильные радикалы вводили в микроэмульсии в виде водных или водно-глицериновых растворов. Глицерин (ч.) и Твин 81 сушили в вакууме до влажности не более 1% по данным ИК-спектроскопии. G6P растворяли в осушенном глицерине при 80° С. Для измерения влажности микроэмульсий и супернатанта применяли метод ^1H -ЯМР. Тотальную фракцию липидов клеток *E. coli* выделяли по методу Блайя — Дайера [51]. Водные дисперсии готовили прибавлением воды к пленке липидов, полученной выпариванием из хлороформ-метанольного раствора на ротаторном испарителе. Диспергирование проводили озвучиванием образцов на диспергаторе УЗДН-1 в течение 3 мин при комнатной температуре.

Спектры ^{31}P -ЯМР препаратов *E. coli* измеряли на фурье-спектрометре СХР-300 (Bruker, ФРГ) на частоте 121,47 МГц в спектральном диапазоне 2 кГц (интервал между импульсами 0,3 с, длительность 60-градусного импульса 16 мкс). Стабилизация магнитного поля 7,1 Тл осуществлялась по сигналу дейтерия $^2\text{H}_2\text{O}$ («Изотоп», 98% ядра ^2H), заливаемой во внешний капилляр. Химические сдвиги измеряли относительно сигнала 60 мМ раствора оксиэтилендифосфорной кислоты в $^2\text{H}_2\text{O}$ (18,44 м.д., внешний капилляр). Суспензию клеток заливали в ампулы спектрометра диаметром 10 мм при 4° С. Субстраты вводили в эмульсионные препараты с установившейся влажностью непосредственно перед измерением. Точность измерения температуры в ампуле $\pm 1^\circ$, измерений рН — $\pm 0,1$. Измерение рН в препаратах *E. coli* проводили методом ЯМР по калибровочной зависимости химических сдвигов фосфата с G6P в зависимости от рН раствора и микроэмульсионной среды.

Спектры ЭПР измеряли на спектрометре ВЕР-420 в X-диапазоне по методу спинового зонда. Спектры ЭПР клеточных препаратов снимали в анаэробных условиях в автоматическом режиме с временным интервалом 5 мин. Суспензии клеток заливали в цилиндрические ампулы диаметром 1—3 мм. В качестве спиновых зондов использовали стабильные радикалы: 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил (ТЕМПО); 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-4-оксипиперидин-1-оксил (ТЕМПОЛ) и 5-доксилстеариновую кислоту (5DS) (Sigma, США). Спиновые зонды солиubilizировали в микроэмульсионных средах, составленных из сухих реагентов. Концентрация зондов 1 мМ. Токсичность использованных веществ контролировали высевами на чашках Петри.

Активность воды a_w в микроэмульсиях измеряли изотоническим методом при установлении равновесия в эксикаторе в течение месяца. Приготавливались образцы микроэмульсий с активностью воды a_w соответственно 0,1, 0,32, 0,52. Температура помутнения микроэмульсий измеряли на спектрофотометре Acta VII (Beckman).

Авторы выражают благодарность А. В. Левашову за конструктивную критику постановочной части работы, а также Л. Н. Петрову, Е. Л. Обуховой, М. С. Успенной за помощь в организации исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Левашов А. В. // Катализ ферментами в микрорегерогенных системах агрегатов поверхностно-активных веществ. Итоги науки и техники. Сер. «Биотехнология». М.: ВИНТИ, 1987. Т. 4. С. 112—158.
2. Левашов А. В., Клячко Н. Л., Папкин В. И., Хмельницкий Ю. Л., Мартинек К. // Биоорганическая химия. 1980. Т. 6. № 6. С. 929—943.
3. Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Мартинек К. // Биотехнология. 1988. Т. 4. № 3. С. 292—309.

4. Клячко Н. Л., Богданова Н. Г., Мартинек К., Левашов А. В.//Биооргани. химия. 1990. Т. 16. № 5. С. 581—589.
5. Березин И. В. Действие ферментов в обращенных мицеллах. М.: Наука, 1985. С. 41.
6. Давыдов Р. М., Беловолова Л. В., Генчин М. В.//Молекуляр. биология. 1985. Т. 19. № 5. С. 1338—1348.
7. Лыско А. И., Сурков С. А., Арутюнян А. М., Хмельницкий Ю. А., Клячко Н. Л., Левашов А. В., Мартинек К.//Биофизика. 1986. Т. 31. № 2. С. 231—236.
8. Wong C.-H.//Science. 1989. V. 244. № 4909. P. 1145—1152.
9. Klibanov A. M.//Adv. Appl. Microbiol. 1983. V. 29. P. 1—28.
10. Luisi P. L., Laane C.//Trends Biotechnol. 1986. V. 3. P. 153—158.
11. Garza-Ramos G., Darscon A., Tuena de Gomez-Puyou, Gomez-Puyou A.//Biochemistry. 1990. V. 29. № 3. P. 751—757.
12. Biocatalysis in Organic Media/Eds Laane C., Tramper J., Lill M. D. Amsterdam: Elsevier, 1987.
13. Бекер М. Е., Дамберг Б. Э., Рапопорт А. И. Анабиоз микроорганизмов. Рига: Зинатне, 1981. С. 253.
14. Brindle K. M., Campbell I. D.//Quart. Rev. Biophys. 1987. V. 19. № 3/4. P. 159—182.
15. Шульман Р. Г.//В мире науки. 1983. № 3. С. 50—58.
16. Ugrubill K., Rottenberg H., Glynn P., Shulmann R. G.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. № 5. P. 2244—2248.
17. Navon G., Ogawa S., Shulman R. G., Yamane T.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 3. P. 888—891.
18. Slonczewski Y. L., Rosen B. P., Alger J. R., Macnal R. M.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 10. P. 6271—6275.
19. Ezra F. S., Lucas D. S., Mustaccich R. V., Russell A. F.//Biochemistry. 1983. V. 22. № 16. P. 3841—3849.
20. Lohmeier-Vogel E. M., Hahn-Hagerdahl R. I., Vogel H. J.//Appl. Microbiol. and Biotechnol. 1986. V. 25. P. 43—51.
21. den Hollander J. A., Ugrubill K., Shulman R. G.//Biochemistry. 1986. V. 25. № 1. P. 212—219.
22. Клубовец Т. Л., Зинченко В. Д., Сибельдина Л. А.//Биол. мембраны. 1985. Т. 2. № 7. С. 747—754.
23. Веселова О. В., Николаев Б. П., Шляков А. М.//Коллоидн. журн. 1985. Т. 47. № 6. С. 1027—1033.
24. Никитин Н. В., Николаев Б. П.//Коллоидн. журн. 1986. Т. 48. № 5. С. 936—943.
25. Kizling J., Stenius P.//J. Colloid Interface Sci. 1987. V. 118. № 2. P. 483—492.
26. Kahlweit M., Lessner E., Strey R.//Colloid and Polymer Sci. 1983. V. 261. P. 954—964.
27. Готтшалк Г. Метаболизм бактерий. М.: Мир, 1982. С. 310.
28. Андреева О. В., Багрянцева Е. А., Бизунок С. Н., Попов В. Г., Свентцкий Е. Н.//Биофизика. 1984. Т. 29. № 3. С. 447—452.
29. Both I. R.//Microbiol. Rev. 1985. V. 49. № 4. P. 359—378.
30. Sonna L. A., Ambudkar S. V., Maloney P. C.//J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 14. P. 6625—6630.
31. Pogell V. M., Maity B. R., Frumkin S., Shapiro S.//Arch. Biophys. and Biochem. 1966. V. 116. № 1—3. P. 406—415.
32. Fraenkel D. G., Falcoz-Kelley F., Horecker B. L.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1964. V. 52. № 5. P. 1207—1213.
33. Seelig J.//Biochim. et biophys. acta. 1978. V. 515. № 2. P. 105—140.
34. Cullis P. R., de Kruijf V.//Biochim. et biophys. acta. 1976. V. 436. P. 523—540.
35. Борозягин В. Л., Василенко И. А., Сабельников А. Г., Тараховский Ю. С.//Биол. мембраны. 1987. Т. 4. № 6. С. 624—638.
36. Attwood D. A., Florence A. T. Surfactant Systems. Their Chemistry Pharmacy, Biology. London; New York: Chapman and Hill, 1983. P. 794.
37. Кочергинский Н. М. Влияние биологических мембран на кинетику восстановления нитроксильных радикалов. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: НИИ по БИХС, 1977. С. 19.
38. Никитин Н. В., Николаев Б. П., Петров Л. Н., Торопов Д. К.//Микробиология. 1985. Т. 54. № 4. С. 566—571.
39. Гирфанова Т. Ф., Никитин Н. В., Николаев Б. П., Тесленко А. Я., Торопов Д. К.//Коллоидн. журн. 1984. Т. 45. № 5. С. 873.
40. Франк-Каменецкий Д. А. Диффузия и теплопередача в химической кинетике. М.: Наука, 1967. С. 491.
41. Лукьянов А., Андреев В., Pozdyshev V. J.//Colloid and Interface Sci. 1990. V. 137. № 1. P. 11—119.
42. Гельман Н. С., Лукьянова М. А., Островский Д. Н. Мембраны бактерий и дыхательная цепь. М.: Наука, 1972. С. 248.
43. Бекер М. Е.//Успехи микробиол. 1972. Т. 8. С. 224—239.
44. Haering G., Pessina A., Meusdoefter F., Hochkoefpler S., Luisi P. L.//Ann. N. Y. Acad. Sci. 1987. V. 506. P. 337—344.
45. Haering G., Luisi P. L., Meusdoefter F.//Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1985. V. 127. № 3. P. 911—915.
46. Lugtenberg B., van Alphen L.//Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 737. P. 51—115.
47. Harrop A. J., Hocknull M. D., Lilly M. D.//Biotechnol. Lett. 1989. V. 11. № 11. P. 807—810.

48. Gerson D. F., Zajic J. E.//Immobilized Microbial Cells/Ed. Venkatsubramanian K. Washington: Amer. Chem. Soc., 1979. P. 29—53.
49. Dekker M., Hilhorst R., Laane C.//Anal. Biochem. 1989. V. 178. № 2. P. 217—226.
50. Попов В. Г., Чугасова В. А., Коровкин В. И.//Производство и применение продуктов микробиологических производств. Обз. информ. М.: ВНИИСЭНТИ Минмедбиопрома СССР, 1989. Вып. 1. С. 38.
51. Bligh E. G., Dyer W. J.//Can. J. Biochem. and Physiol. 1959. V. 31. P. 911—915.

Поступила в редакцию
7.V.1991

После доработки
19.V.1992

B. P. Nikolaev, D. K. Toropov, A. M. Schlyakov

THE STATE OF CELL MULTIENZYME SYSTEMS OF *Escherichia coli* INCORPORATED TO MICROEMULSION ORGANIC MEDIA AS MONITORED BY ^{31}P NMR AND SPIN PROBE METHODS

Institute of Highly Pure Biochemicals, St.-Petersburg

Dynamics of substrate pools and level of inorganic phosphate P, in the course of glucose-6-phosphate (G6P) utilization by *Escherichia coli* have been studied by ^{31}P NMR and EPR methods on cells immobilised in a three component water-in-oil microemulsion composed from tridecane, nonionic surfactant Tween 81 and a low amount of water. The state of the electron transport chain in cell membranes has been evaluated on the basis of reduction rates of exogenous nitroxide radicals. Low water activity a_w in the external microemulsion appears to inhibit, to some extent, glycolytic enzymes and electron transport proteins in the membrane structures without disturbing the membrane integrity and solubilization of lipoproteins in reverse micelles. Enzyme activity has been restricted by the micellar substrate diffusion and by decrease in water activity a_w in the course of the extensive molecular interchange of bound water between the external microemulsion phase and the internal cell structures.