



# БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

том 6 \* № 6 \* 1980

УДК 541.183+577.15.02

## КАТАЛИЗ ВОДОРАСТВОРИМЫМИ ФЕРМЕНТАМИ, ВКЛЮЧЕННЫМИ В ОБРАЩЕННЫЕ МИЦЕЛЛЫ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНОГО ВЕЩЕСТВА В НЕВОДНЫХ РАСТВОРИТЕЛЯХ

*Левашов А. В., Клячко Н. Л., Пантин В. И.,  
Хмельницкий Ю. Л., Мартинек Е.*

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Исследована стабилизация водорастворимых ферментов с помощью поверхности-активных веществ к инактивирующему действию органических растворителей. На примере  $\alpha$ -химотрипсина, трипсина, пирофосфатазы, лактатдегидрогеназы, липопротеиназы и пероксидазы показана принципиальная возможность включения их в «обращенные» мицеллы, образованные поверхностью-активным веществом (Аэрозоль ОТ, бромистый пентилtrimетиламмоний, Бридж-56) в органическом растворителе (бензол, хлороформ, октан, циклогексан). Солюбилизованные таким образом ферменты сохраняют свою катализитическую активность и субстратную специфичность. Предложена кинетическая теория ферментативных реакций, протекающих в псевдо-двухфазной системе «мицеллы — растворитель». В рамках этой теории дан анализ наблюдаемой на опыте зависимости параметров уравнения Михаэлиса от концентраций компонентов среды (вода, органический растворитель, поверхностью-активное вещество), а также от соотношения знаков зарядов в молекуле субстрата и на поверхности раздела фаз (++, +-, --). Изученные системы могут иметь важное значение для практического использования ферментов в органическом синтезе, а также при исследовании состояния и роли воды, входящей в структуру биомембран и активных центров ферментов.

Ключевые моменты в реализации любого химического процесса — это подбор реакционной среды и катализатора. Лучшими на сегодняшний день катализаторами являются ферменты. Их исключительно высокая катализитическая активность в мягких условиях и непревзойденная субстратная специфичность [1] открывают широкие перспективы для использования биокатализа в технологических процессах [2, 3]. Особенно перспективным представляется применение ферментов как катализаторов в тонком органическом синтезе, при получении лекарственных препаратов, при синтезе важных биохимических соединений. К настоящему времени ряд таких ферментативных процессов уже осуществляется в промышленном или лабораторном масштабе [4, 5]. Однако широкому использованию ферментов на практике мешает то, что они приспособлены природой для функционирования прежде всего в водных растворах. В то же время известно, что многие химические реакции термодинамически направлены в сторону желаемого продукта лишь в определенных органических растворителях. Это связано как со специфическими сольватационными эффектами, так и с растворимостью отдельных компонентов реакции или в других случаях с тем, что наряду с нужным продуктом образуется вода и, следовательно, при проведении реакции в водных растворах равновесие сильно сдвинуто

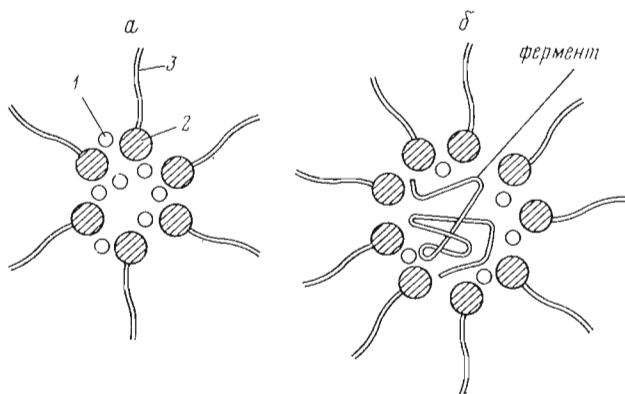


Рис. 1. Схематическое изображение обращенной мицеллы ПАВ без фермента (а) и с включенным ферментом (б); 1 – противоны и/или молекулы воды, 2 – ионные (полярные) группы молекул ПАВ, 3 – углеводородные группы молекул ПАВ

в сторону исходных веществ. К сожалению, переход от воды как среды реакции к органическому растворителю сопровождается, как правило, либо полной денатурацией фермента, либо резким падением его катализитической активности и исчезновением субстратной специфичности [4, 5].

Чтобы заставить ферменты работать в системах с малым содержанием воды, были предложены следующие подходы. Во-первых, для реакций в гомогенных водно-органических смесях подбирают такой органический растворитель, в котором, как и в воде, могли бы осуществляться сольвофобные взаимодействия [6]. Как известно, именно сольвофобные (гидрофобные) взаимодействия отдельных фрагментов полипептидной цепи обеспечивают сохранность пативной структуры белка и тем самым его катализитической активности. Во-вторых, реакцию проводят в двухфазной системе «вода – не смешивающийся с водой органический растворитель», причем фермент локализован в водной фазе [6, 7]. В этом случае содержание воды в системе может быть достаточно малым. В-третьих, молекулу фермента (ее катализически активную конформацию) защищают от неблагоприятного воздействия органического растворителя с помощью поверхностно-активных веществ (ПАВ) ([8], см. также обзоры [4, 5, 9]).

Третий подход на первый взгляд может показаться странным, поскольку в водных растворах детергенты, как правило, денатурирующие агенты [10]. Однако следует обратить внимание на то, что основные компоненты биомембранны, в которые включены многие ферменты при их функционировании *in vivo*, относятся именно к ПАВ [11]. Иными словами, сама природа дает пример стабилизации активных конформаций ферментов путем включения их в агрегаты ПАВ.

Ассоциаты типа «обращенных» мицелл, существующие в органических растворителях, устроены так, что полярные (ионные) группы, входящие в молекулу ПАВ, создают ядро ассоциата, а углеводородные фрагменты – внешний слой (рис. 1а). Известно, что такие мицеллы ПАВ способны солюбилизировать ионы, полярные вещества, а также значительные количества воды (несколько десятков молекул  $H_2O$  на молекулу ПАВ). В предварительном сообщении [8] нами впервые \* было показано, что с помощью мицеллообразующего ПАВ можно в органических растворителях солюбилизировать также относительно высокие концентрации фер-

\* Ранее было обнаружено (см. [12] и цитированную там литературу), что в органических растворителях в присутствии гидратированных обращенных мицелл каталитическую активность проявляют липолитические ферменты. Это не удивительно, поскольку липазы работают именно на границе раздела водной и органической фаз.

ментов, вплоть до 1 мг/мл, что соответствует  $10^{-5}$  М активных центров (при молекулярной массе не более 100 000) и значительно превышает необходимый уровень «катализитических концентраций» большинства ферментов. Причем солюбилизованные таким образом водорастворимые (исключительно мембранные) ферменты сохраняют свою катализитическую активность. Причины этого факта мы видим в том, что молекула фермента, будучи включенной в обращенную мицеллу (рис. 1б), защищена против денатурации (разворачивания) стабилизацией молекулами ПАВ поверхности раздела фаз между белковой глобулой (или соответственно ее поверхностью слоем воды) и фазой органического растворителя. В итоге блокатор непосредственно может и не контактировать с неблагоприятной для него органической средой, находясь в своеобразном микрореакторе, содержащем весьма ограниченное количество воды, соответствующее общему содержанию воды в системе «органический растворитель — ПАВ» менее 1 об. %.

Одновременно с нашими мицеллярными экспериментами [8] Дузу и др. [13] обнаружили, что ферменты сохраняют катализитическую активность в микроэмulsionях с размером капелек 1–5 мкм. Однако последние системы менее удачны из-за высокого содержания в них воды (соизмеримого с содержанием масла) и из-за непрозрачности микроэмulsionий, мало пригодной по этой причине для спектрофотометрических исследований \*.

В настоящей работе для нескольких ферментов (химотрипсина, трипсина, пирофосфатазы, лактатдегидрогеназы, пероксидазы и пируваткиназы) изучена кинетика реакций, катализируемыхими в системе «органический растворитель — вода — ПАВ».

*Кинетическая теория ферментативных реакций в псеводвухфазной системе, состоящей из «обращенных» мицелл ПАВ в органическом растворителе. Мицеллярные эффекты в органических (неферментативных) реакциях получили в настоящее время весьма исчерпывающее объяснение в рамках кинетической теории [15–18]. Кинетическая теория, ранее предложенная для водных растворов ПАВ, справедлива также и для систем с обращенными мицеллами [19].*

Рассмотрим кинетику реакции между ферментом Е и субстратом S, протекающей по схеме Михаэлиса



в системе «органический растворитель — вода — ПАВ».

Допустим, что раствор ПАВ состоит из объемной фазы органического растворителя и фазы увлажненных водой мицелл [20]. Далее примем, что установилось равновесное распределение субстрата между фазами [21]:



причем коэффициент распределения можно представить в следующем виде:

$$P_s = [S]_{\text{миц}} / [S]_{\text{об}} \quad (3)$$

(здесь и ниже индексы «миц» и «об» относятся к мицеллярной и объемной фазам).

Распределение фермента мы учитывать не будем, поскольку белки практически нерастворимы в гидрофобных растворителях [22]; кроме того, в неводных средах ферменты, как правило, денатурируют (см. обзор [4]). Поэтому будем полагать, что катализитическая активность сосредоточена лишь в мицеллярной фазе.

\* При подготовке рукописи этой статьи к печати появилась работа Дузу с сотр. [14], которые использовали наши системы [8] для изучения ферментативных реакций при низких температурах.

Допустим, что скорость реакции, идущей в мицеллах, подчиняется уравнению Михаэлиса — Ментен. Тогда в начальный момент времени (когда концентрация продуктов пренебрежимо мала по сравнению с исходной концентрацией субстрата) при избытке субстрата по отношению к ферменту и в стационарных условиях наблюдаемую скорость, отнесенную к объему всей системы, можно выразить следующим образом:

$$v = \frac{k_{\text{кат, миц}} [E]_0, \text{миц} [S]_0, \text{миц}}{K_m, \text{миц} + [S]_0, \text{миц}} \cdot \theta, \quad (4)$$

где  $\theta$  — объемная доля мицеллярной фазы, а индекс «0» отражает начальные концентрации.

Допустим, что обмен молекулами субстрата между фазами осуществляется достаточно быстро, т. е. протекание ферментативной реакции (1) не нарушает равновесия (2) \*. Тогда концентрации реагентов можно найти из уравнения (3) и уравнений материального баланса:

$$\begin{aligned} [S]_{0, \text{общ}} &= [S]_{0, \text{миц}} \theta + [S]_{0, \text{об}} (1 - \theta) \\ [E]_{0, \text{общ}} &= [E]_{0, \text{миц}} \theta \end{aligned} \quad (5)$$

Следует, однако, напомнить, что уравнение (3) справедливо лишь для достаточно разбавленных растворов и, следовательно, концентрации реагентов должны быть значительно ниже концентрации ПАВ.

После подстановки из уравнений (3) и (5) в (4) имеем:

$$v = \frac{k_{\text{кат, каж}} [E]_{0, \text{общ}} [S]_{0, \text{общ}}}{K_m, \text{каж} + [S]_{0, \text{общ}}}, \quad (6)$$

где

$$k_{\text{кат, каж}} = k_{\text{кат, миц}} \quad (7)$$

и

$$k_m, \text{каж} = K_m, \text{миц} \frac{1 + \theta (P_s - 1)}{P_s}. \quad (8)$$

В случае заряженного субстрата уравнение (8) можно упростить, предположив, что субстратные молекулы находятся только в водно-мицеллярной фазе и, следовательно, не только  $P_s \gg 1$ , но и  $P_s \theta \gg 1$ . Тогда

$$K_m, \text{каж} = K_m, \text{миц} \cdot \theta. \quad (9)$$

Мы рассмотрели здесь только простейшую псевдофазную модель, которая предполагает равномерное распределение реагентов по всему объему увлажненных мицелл. В общем случае, конечно, модель должна быть более сложной и учитывать гетерогенность структуры обращенных мицелл; в частности, можно было бы принять во внимание наличие поверхностного слоя и водного ядра мицеллы [23, 26, 27–30]. Однако в настоящее время в литературе практически отсутствуют данные, которые позволили бы оценить размеры обращенной мицеллы в присутствии солюбилизованных реагентов, в особенности размеры отдельных слоев внутри нее.

Тем не менее в экспериментальном отношении уже сейчас следует принять во внимание, что долю мицеллярной фазы в системе можно изменять

\* Хотя это допущение представляется вполне разумным, следует иметь в виду, что количественные скоростные исследования до сих пор не проводились. Известно лишь для немногих систем, что низкомолекулярные соединения, будучи растворенными в органическом растворителе, переходят в микросреду мицелл практически мгновенно [23, 24]; скорость обмена между мицеллами (в результате их прямого контакта при столкновении) также весьма высока [25, 14]. С другой стороны, в нашей лаборатории обнаружено, что при добавлении воды к тройной системе «органический растворитель — вода — ПАВ» равновесие устанавливается при некоторых условиях весьма медленно (десятки минут) (см. также «Экспериментальную часть»).

Кинетические параметры реакций, катализируемых  $\alpha$ -химотрипсином и трипсином при 26°C \*

Система	Фермент (концентрация) **	Субстрат (концентрация) **	Реакционная среда ***	Заряд субстрата	Заряд ПАВ	$k_{\text{кат}}, \text{с}^{-1}$	$K_m, \text{M}$	$k_{\text{кат}}/K_m$ , $\text{M}^{-1}\text{с}^{-1}$
I	$\alpha$ -Химотрипсин (1–14 мкМ)	<i>n</i> -Нитроанилид <i>N</i> -глутамил- <i>L</i> -фенилаланина (50–500 мкМ)	Буфер A, pH 8,0 Аэрозоль ОТ (0,04–0,3 М) – 6% фенол A, pH 8,0 – октан; $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{ПАВ}] = 20$	–	Без ПАВ	$7 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	7
II			БИТА (0,1–0,8 М) – буфер A, pH 8,0 – смесь хлородформа с октаном, 1:1; $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{ПАВ}] = 25$	–	–	$9 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-3}$	$< 4 \cdot 10^{-3}$
III			как в системе I	+	–			
IV	Трипсин (1–5 мкМ)	<i>n</i> -Нитроанилид N-бензамил- <i>D,L</i> -аргинина (70 мкМ–2,5 мМ)	как в системе II	+	Без ПАВ	$3 \cdot 10^{-1}$	$10^{-3}$	$< 3 \cdot 10^2$
V			как в системе III	–	–			
VI				+	+	$4 \cdot 10^{-2}$	$10^{-2}$	4

\* Для систем с обратимыми мицеллами приведены величины истинных кинетических параметров, рассчитанных согласно выражениям (6) – (9) и характеризующих реакцию в водно-мицеллярной фазе.

\*\* Приведен концентрации в расчете на общий объем системы.  
\*\*\* Буфер A: 0,02 М ацетат–бограт, для  $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{ПАВ}]$  приведено отношение молярных концентраций.

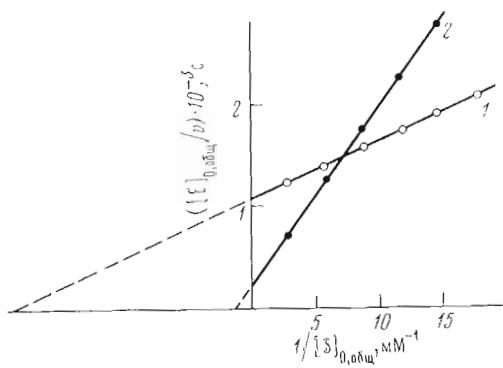


Рис. 2. Зависимость начальной скорости гидролиза *n*-нитроанилида N-глутарил-*L*-фенилаланина, катализируемого  $\alpha$ -химотрипсином, от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера – Берка: прямая 1 – в системе II при [ПАВ] 0,05 М, прямая 2 – в буферге А (см. таблицу). Условия эксперимента: 26° С,  $[E]_0$ , общ 7 мкМ

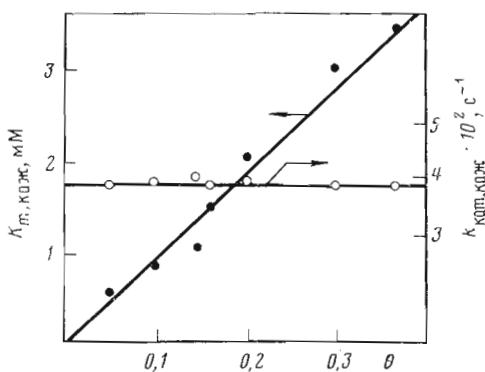


Рис. 3. Гидролиз *n*-нитроанилида N-бензоил-*D,L*-аргинина, катализируемый трипсином, солюбилизованным в системе III (см. таблицу). Михаэлисовские параметры  $K_m$ , как и  $k_{cat}$ , как представлены в зависимости от объемной доли  $\theta$  воды в системе III при изменении концентрации ПАВ от 0,1 до 0,8 М. Условия эксперимента: 26° С  $[E]_0$ , общ 5 мкМ

по-разному, варьируя не только концентрацию ПАВ, но и концентрацию воды, включенной в обращенные мицеллы. Если изменять концентрации обоих компонентов, образующих водно-мицеллярную фазу, и сохранять постоянным их соотношение, то в первом приближении можно допустить, что при этом не меняется также соотношение объемов поверхностного слоя и мицеллярного ядра. С другой стороны, при варьировании концентрации ПАВ с сохранением постоянной концентрации воды (или же при варьировании концентрации воды при постоянной концентрации ПАВ) внутренняя структура (и другие свойства) мицелл должна меняться более существенно. Оба этих экспериментальных подхода были нами использованы в настоящей работе для изучения реакционной способности ферментов в тех и других условиях.

*Катализ  $\alpha$ -химотрипсином и трипсином, включенными в обращенные мицеллы ионогенных ПАВ (Аэрозоль OT или БЦТА) в октане или в смеси октан – хлороформ (1 : 1).* В результате солюбилизации этих протеолитических ферментов в органических растворителях не происходит потеря числа их активных центров. Это было показано нами методом титрования активных центров как для  $\alpha$ -химотрипсина (титрант N-транс-циннатомоилимидазол [31]), так и для трипсина (титрант *n*-нитрофенилгуани-

динбензоат [32]), солюбилизованных в системах II и VI соответственно (см. таблицу).

Более того, эти ферменты обнаруживают каталитическую активность по отношению к своим специфическим субстратам. Так,  $\alpha$ -химотрипсин, солюбилизованный мицеллами Аэрозоля OT в октане, катализирует гидролиз *n*-нитроанилида N-глутарил-*L*-фенилаланина. Скорость реакции (выделение *n*-нитроанилина) прямо пропорциональна концентрации фермента (от 1 до 14 мкМ).

*n*-Нитроанилид N-глутарил-*L*-фенилаланина является специфическим субстратом  $\alpha$ -химотрипсина [33]; поэтому можно думать, что катализ идет именно при участии активного центра фермента. В аналогичных условиях химотрипсиноген, структурный аналог и предшественник  $\alpha$ -химотрипсина, не содержащий активного центра, практически не влияет на скорость гидролиза этого же субстрата. Следовательно, скорость наблюдаемой нами ферментативной реакции не осложнена участием в ней каких-либо нуклеофильных групп белка.

Кинетика ферментативной реакции, катализируемой ферментом, солюбилизованным в органическом растворителе, подчиняется (так же как и в воде) уравнению Михаэлиса – Ментен (рис. 2). Из рисунка видно, что наблюдаемая скорость ферментативной реакции может быть даже больше, чем просто в воде (при той же общей концентрации фермента).

*«Истинные параметры» уравнения Михаэлиса, характеризующие ферментативную реакцию в водно-мицеллярной фазе.* Для сравнительного анализа параметров уравнения Михаэлиса – Ментен необходимо изучить зависимость наблюдаемой скорости ферментативной реакции от соотношения объемной (органический растворитель) и водно-мицеллярной фаз. При варьировании этой величины ( $\theta$ , уравнения 4–8) мы поддерживали соотношение  $[H_2O]/[PAB]$  постоянным, чтобы работать при фиксированной степени гидратации мицелл. В качестве величины  $\theta$  нами в первом приближении принято пропорциональное ей значение, равное соотношению объемов солюбилизованной воды и органического растворителя.

На рис. 3 в качестве примера даны кажущиеся параметры уравнения Михаэлиса для реакции гидролиза трипсином его специфического субстрата [34, 35] *n*-нитроанилида N-бензоил-*D,L*-аргинина. Фермент включали в обращенные мицеллы БЦТА в смеси хлороформ – октан (1 : 1). Видно, что наблюдаемое значение  $k_{\text{кат}}$  почти не зависит от соотношения объемов водно-мицеллярной и объемной фаз. Следовательно, согласно уравнению (5), наблюдаемое значение можно считать равным истинной характеристике реакции в водно-мицеллярной фазе.

В то же время, согласно уравнению (9), величина кажущейся константы Михаэлиса должна линейно зависеть от  $\theta$ ; это действительно имеет место (рис. 3). Тангенс угла наклона прямолинейной зависимости  $K_m$ , как от  $\theta$  – это истинная константа Михаэлиса для реакции в водно-мицеллярной фазе ( $K_{m, \text{ши}}$ ). Полученные таким образом данные для разных систем сведены в таблицу.

*Ускорение ферментативной реакции за счет концентрирования реагентов в водно-мицеллярной фазе.* Как видно из таблицы, истинные параметры уравнения Михаэлиса, характеризующие катализ как  $\alpha$ -химотрипсином, так и трипсином в водно-мицеллярной фазе, несколько хуже, чем для ферментативной реакции, идущей просто в водном растворе. Поэтому могло бы показаться удивительным, что скорость реакции, наблюдаемая в двухфазной системе, иногда превосходит скорость процесса в водном растворе (см., например, рис. 2). Объяснение заключается в том, что реагенты (фермент и субстрат) не растворяются в октане и концентрируются в обращенных мицеллах: это приводит к существенному уменьшению кажущейся константы Михаэлиса в зависимости от величины  $\theta$  (рис. 3) и, следовательно, к ускорению реакции (в условиях, когда фермент еще не насыщен субстратом). Феномен концентрирования реагентов

в мицеллах хорошо изучен для органических (неферментативных) реакций [18, 19]. Подобного рода концентрационные эффекты сопровождают и реакции, катализируемые ферментами, иммобилизованными в/на носителях [36–38].

*Роль соотношения знаков зарядов в молекулах субстрата и ПАВ.* При более детальном анализе истинных параметров уравнения Михаэлиса (см. таблицу) можно проследить два момента.

1. Когда заряды в молекуле субстрата и на поверхности раздела фаз (в молекуле ПАВ) совпадают по знаку (системы II и VI), различия, наблюдаемые в константах  $k_{\text{кат}}$  и  $K_m$  для воды и обращенных мицелл, не являются слишком значительными (разница достигает не более одного десятичного порядка). Эти эффекты можно, по-видимому, объяснить изменением характера водной среды, окружающей в обращенных мицеллах солюбилизированный фермент. Действительно, ранее [24, 39] было показано, что вода, включенная в полости обращенных мицелл, отличается от воды в макрофазе, приближаясь по свойствам к водно-органическим смесям. С другой стороны, известно, например, что добавление к водным растворам  $\alpha$ -химотрипсина органических растворителей, смешивающихся с водой, приводит к ослаблению комплексообразования фермента с субстратом, т. е. к увеличению константы Михаэлиса (см., например, [40–42]). Кроме того, в микросреде обращенных мицелл могла измениться конформация белковой глобулы или/и сольватационное состояние каталитически активных групп фермента и тем самым их реакционная способность. Этот сложный комплекс вопросов предстоит изучить в будущем. Возможно, при этом окажутся полезными исследования поглощения, флуоресценции и циркулярного дихроизма солюбилизованного белка [43].

2. По-другому обстоит дело, когда заряды в молекуле субстрата и на поверхности раздела фаз (в молекуле ПАВ) противоположны по знаку (системы III и IV). В этом случае в обращенных мицеллах происходит более существенное понижение наблюдаемой константы скорости второго порядка ( $k_{\text{кат}}/K_m$ ), а именно на 3–5 десятичных порядков по сравнению с реакцией в воде. Поскольку нам не удалось (следствие ограниченной растворимости субстрата) достичь раздельного определения параметров уравнения Михаэлиса в координатах Лайнувера – Берка, можно думать, что наблюдаемый эффект обусловлен главным образом увеличением константы Михаэлиса. Если это так, то возможная причина понижения каталитической эффективности – концентрационный фактор, обусловленный тем, что заряженный субстрат электростатически взаимодействует с противоположно заряженным поверхностным слоем мицеллы и концентрируется в нем. Тем самым вблизи ферментной молекулы (которая, будучи окружена водой, возможно, не контактирует с поверхностью раздела фаз) субстрат может практически отсутствовать. Подобного рода концентрационные эффекты обычно имеют место при иммобилизации ферментов на/в полиэлектролитных носителях ([44], см. также обзоры [36–38]).

Разумеется, предложенный нами механизм нуждается в доказательстве. Однако независимо от этого следует отметить, что соотношение знаков, характеризующих заряды мицеллярной «матрицы» и соответственно субстрата, – важный фактор, позволяющий в широких пределах регулировать эффективность ферментативного катализа в обращенных мицеллах.

*Скорость дезацилирования транс-циннамоил- $\alpha$ -химотрипсина в среде обращенных мицелл Аэрозоля OT в октане в зависимости от содержания солюбилизованной воды.* Для изучения реакционной способности солюбилизованной воды мы выбрали в качестве модельной реакции гидролиз (дезацилирование) ацилфермента, образующегося в качестве промежуточного соединения в катализе  $\alpha$ -химотрипсином [1, 45]. Удобным объектом исследования является транс-циннамоил- $\alpha$ -химотрипсин. Кинетика гидролиза этого ацилфермента хорошо изучена в воде (см. [46]). На рис. 4

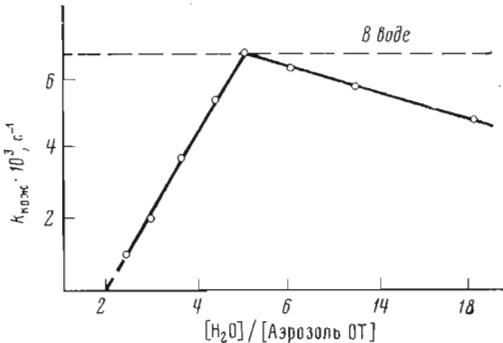


Рис. 4

Рис. 4. Зависимость констант скорости дезацилирования *транс*-циннамоил-химотрипсина от содержания воды, солюбилизованной в системе II. Пунктир – значение  $k_{дакж}$  в буфере A (см. таблицу, [ПАВ] 0,2 М; буфер A, pH 7,0). Условия эксперимента: 26° С,  $[E]_0, общ$  10 мкМ,  $[транс-N-циннамоилимидазол] $_0, общ$  0,1 мМ$

Рис. 5. Зависимость максимальной скорости гидролиза пироfosфата, катализируемого пироfosфатазой, от содержания воды, солюбилизованной в системе «0,2 М Бридж-56 – водный буфер (0,05 М трип-НСl, pH 7,0; 0,02 М MgCl<sub>2</sub> – циклогексан». Условия эксперимента: 26° С,  $[E]_0, общ$  3 нМ, [пироfosфат] $_0, общ$  0,125 мМ. Для сравнения приведено значение  $V$ , наблюдавшееся в указанном буфере в отсутствие ПАВ и органического растворителя (пунктир)

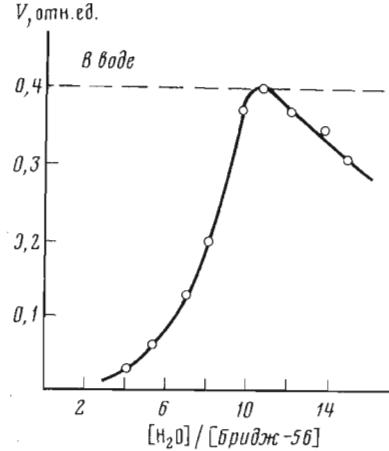


Рис. 5

приведены данные для реакции дезацилирования, протекающей в обращенных мицеллах Аэрозоля OT в октане. Видно, что эффективная константа скорости первого порядка существенно зависит от содержания воды в мицеллах. Степень гидратации мицелл изменяли, варьируя соотношение молярных концентраций  $[H_2O] / [Aэроzоль OT]$  при постоянной концентрации используемого ПАВ. Внимания заслуживают следующие три момента.

Во-первых, при низком содержании воды в мицеллах реакция гидролиза практически не идет. Это хорошо согласуется с представлением, что первые порции солюбилизованной воды прочно связываются с молекулами ПАВ и образуют гидратную оболочку ионных групп [24, 26, 47].

Во-вторых, с увеличением степени гидратации мицелл скорость реакции гидролиза возрастает и достигает уровня, характеризующего дезацилирование *транс*-циннамоил- $\alpha$ -химотрипсина в чистой воде (по данным [46, 48]).

В-третьих, при дальнейшем увеличении содержания воды в мицеллах скорость реакции гидролиза ацилфермента снова становится меньше величины, наблюдаемой для водного раствора.

Существование оптимальной концентрации воды в мицеллах, наилучшим образом способствующей скорости ферментативной реакции (рис. 4), имеет, по-видимому, следующие причины. Во-первых, при низком содержании воды в мицеллах ее концентрация меньше, чем в чистой воде (где она равна 55 М), и это должно отрицательно сказываться на скорости гидролитической реакции. Во-вторых, не исключено, что в микросреде мицелл с малым содержанием воды происходит (хотя бы частично) дегидратация ферментной глобулы (обусловленная тем, что часть воды trattится на сольватацию молекул ПАВ); если это так, то в результате такой дегидратации должна измениться конформация белка, что может неблагоприятно отразиться на его каталитической активности. В свою очередь, по мере увеличения содержания воды в мицеллах степень гидратации

белка должна возрастать, и тогда в оптимуме глобула примет нативную конформацию. Не исключено, что именно в этот момент локальная концентрация воды вокруг солюбилизованной молекулы фермента достигает именно 55 М. Уменьшение каталитической активности при дальнейшем увеличении содержания воды в мицеллах обусловлено, по-видимому, конформационными перестройками в мицеллярной фазе [49–51], которые в принципе могут отрицательно сказаться на конформации белка и тем самым на его каталитической активности.

Разумеется, этот вопрос (о состоянии белка в обращенных мицеллах в зависимости от содержания воды) заслуживает самостоятельного исследования. Однако уже сейчас видно (см. рис. 4), что, варьируя степень гидратации мицелл, можно в широких пределах регулировать каталитическую активность включенных ферментов.

*Пирофосфатаза в обращенных мицеллах Бридж-5б в циклогексане.* Нами изучена зависимость катализа от степени гидратации обращенных мицелл для еще одного гидролитического фермента — пирофосфатазы. На рис. 5 видно, что, так же как и в случае катализа химотрипсином (рис. 4), максимальная скорость гидролиза пирофосфата, катализируемого пирофосфатазой, проходит по мере увеличения содержания воды в мицеллах через оптимум. При оптимальной степени гидратации мицелл солюбилизованный в них фермент действует так же эффективно, как и в водном растворе (пунктир).

*Катализ пероксидазой, включенной в обращенные мицеллы Аэрозоля OT в октане или в бензole.* Мы нашли [8], что пероксидаза, будучи солюбилизованной с помощью ПАВ в органическом растворителе, сохраняет каталитическую активность в отношении реакции окисления перекисью водорода субстратов различной химической природы: неорганического ферроцианида калия [52] и органического пирогаллола [53].

Более детально действие пероксидазы было исследовано нами на примере реакции окисления пирогаллола. Прежде всего, при исследовании спектров мы убедились, что как в случае водного раствора, так и в случае органическо-мицеллярной системы продуктом ферментативной реакции является пурпурогаллич, т. е. химическое направление реакции одинаково в сравниваемых системах. Однако мы обнаружили существенные различия в кинетических закономерностях этой реакции в воде и в среде обращенных мицелл. Пероксидазное окисление пирогаллола в водном растворе ингибируется избытком субстрата [54]. Как видно на рис. 6, эффект ингибирования субстратом не проявляется в реакции, протекающей в среде обращенных мицелл. Именно поэтому в мицеллярной системе достижимы более высокие скорости ферментативной реакции, чем просто в воде.

*Двухферментная система (лактатдегидрогеназа+пируваткиназа) в обращенных мицеллах Бридж-5б в циклогексане.* В качестве примера ферментов с четвертичной структурой нами были изучены\* пируваткиназа (4 субъединицы, мол. масса 340 000) и лактатдегидрогеназа (4 субъединицы, мол. масса 145 000). Известно [55], что эти ферменты в виде полиферментной системы катализируют сопряженную реакцию:



\* Этот эксперимент был осуществлен в лаборатории физико-химической и молекулярной энзимологии (ЕРСМ) университета Париж-Юг (Франция) одним из авторов данной статьи, А. В. Левашовым, который считает своим приятным долгом выразить глубокую благодарность д-ру Ф. Сайду, сотруднику ЕРСМ, принявшему участие в проведении эксперимента и обсуждении его результатов.

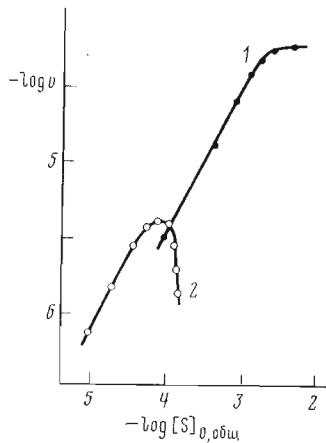


Рис. 6

Рис. 6. Зависимость начальной скорости (моль·л<sup>-1</sup>·мин<sup>-1</sup>) пероксидазного окисления пирогаллола от концентрации субстрата. Условия эксперимента: 26° С, [Е]<sub>0, общ</sub> 3 мМ, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]<sub>0, общ</sub> 2,5 мМ; кривая 1 – в системе «0,1 М Аэрозоль ОТ – 2 об.% буфер А, pH 7,0 – октан»; кривая 2 – в буфере А, pH 7,0

Рис. 7. Кинетическая кривая «продукт – время» для накопления NAD в реакции (10), протекающей в системе «0,2 М Бридж-56 – 4 об.% водный буфер (0,05 М фосфат, pH 6,8; 2 мМ EDTA, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ дитиотреонит, 1 М ацетат аммония) – циклогексан» (кривая 1). Для сравнения приведены данные для реакции, протекающей в указанном буфере в отсутствии ПАВ и органического растворителя (кривая 2). Условия эксперимента: 35° С, [пируваткиназа]<sub>0, общ</sub> 2·10<sup>-2</sup> мг/мл, [лактатдегидрогеназа]<sub>0, общ</sub> 2·10<sup>-4</sup> мг/мл, [фосфоенолпирофрат]<sub>0, общ</sub> 0,5 мМ; [ADP]<sub>0, общ</sub> 0,2 мМ, [NADH]<sub>0, общ</sub> 0,2 мМ

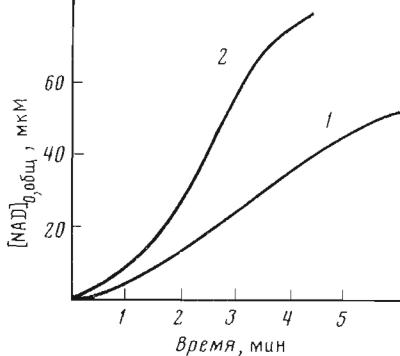


Рис. 7

Как видно из рис. 7, оба фермента сохраняют свою катализитическую активность и специфичность, осуществляя цепь химических превращений (10). При этом проявляется большое сходство кинетики, наблюдаемой в системе обращенных мицелл (кривая 1), с данными для водного раствора, полученными в аналогичных условиях (кривая 2).

Так же как и в воде [55], в системе обращенных мицелл наблюдается индукционный период в действии двухферментной системы. Согласно теории [55], величина индукционного периода определяется параметрами реакции, катализируемой вторым ферментом, а именно лактатдегидрогеназой (восстановление пирувата в лактат). Действительно, мы убедились, что, так же как и в воде, в системе обращенных мицелл период индукции равен отношению Михаэлисовских параметров ( $K_m/V=1,3$  мин) для лактатдегидрогеназы. На этом основании можно сделать вывод, что изученная нами двухферментная система, будучи включенной в обращенные мицеллы, не встречает диффузионных затруднений при обмене низкомолекулярными реагентами.

Резюмируя описанный выше материал, прежде всего следует отметить общий характер предложенного подхода. В самом деле, в данной работе были использованы различные системы обращенных мицелл ПАВ, различающихся по своей природе и заряду (анионные, катионные и неионогенные ПАВ), в различных органических растворителях. Далее, исследованные нами в ферментах относятся к различным классам: трансфераза (пируваткиназа), оксидоредуктазы (пероксидаза, лактатдегидрогеназа) и гидrolазы (химотрипсин, трипсин, пирофосфатаза). Более того, эти ферменты сильно различаются по структуре: ферментная молекула состоит из одной или нескольких полипептидных цепей или же, на конец, из нескольких субъединиц. И наконец, некоторые из них действуют с простетической группой (гем) или коферментом (ADP, NADH). Тем не менее все исследованные ферменты, будучи солюбилизованными в орга-

нических растворителях с помощью ПАВ в указанных нами условиях, сохраняют катализическую активность весьма продолжительное время (не менее недели). Например,  $\alpha$ -химотрипсин, будучи солюбилизованным ( $10^{-5}$  М) в системе «0,1 М Аэрозоль ОТ – 0,5% буфер А, рН 8, – октан», не теряет катализической активности в течение двух лет.

Эти результаты имеют важное значение прежде всего для прикладных исследований. Так, высокая стабильность ферментов, солюбилизованных по нашему методу [8] в органических растворителях, делает их пригодными для использования в органическом синтезе (см. обзоры [4, 9]).

С другой стороны, солюбилизация ферментов в обращенных мицеллах – объект фундаментальных исследований. Это связано с тем, что системы обращенных мицелл в неводных растворителях позволяют строго дозировать количество молекул воды, окружающей солюбилизованный фермент. Именно это обстоятельство, как было отмечено [8], открывает широкие возможности для изучения ряда аспектов механизма действия ферментов. В частности, можно надеяться, что использование систем обращенных мицелл как реакционной среды позволит, во-первых, зафиксировать в ферментативной реакции лабильные в водных растворах промежуточные соединения (данные рис. 4 показывают, что в «сухих» мицеллах ацилфермент не должен гидролизоваться). Во-вторых, на примере ферментов, включенных в обращенные мицеллы, удобно изучать роль воды в поддержании каталитически активной конформации белка (см. выше обсуждение рис. 4). В-третьих, можно будет изучить реакционную способность самой воды как химического реагента. Пока была обнаружена необычайно высокая реакционная способность молекул  $H_2O$  лишь в неферментативной реакции (гидролиз пикрилхлорида в обращенных мицеллах Аэрозоля ОТ в октапе) [47].

### Экспериментальная часть

**Ферменты:**  $\alpha$ -химотрипсин (КФ 3.4.21.1) производства Ленинградского мясокомбината им. Кирова, трипсин (КФ 3.4.21.4) производства Олайшского завода химических реактивов (Латвийская ССР), пероксидаза (КФ 1.11.1.7) из хрена (Reanal, Венгрия), пируваткиназа (КФ 2.7.1.40) и лактатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.27) из мышцы кролика фирмы Sigma (США). Пирофосфатаза (КФ 3.6.1.1) из пекарских дрожжей выделена С. М. Аваевой с сотр. (МГУ) [56, 57] по методу Кунитца [58]. Химотрипсиноген был получен из Ленинградского мясокомбината им. Кирова.

**ПАВ:** Аэрозоль ОТ (натривая соль ди-(2-этилгексил)ового эфира сульфоянтарной кислоты), производства фирмы Cyanamide Co, любезно предоставленный нам проф. Ф. М. Менжером (США), очищали по методике [24]; БЦТА – продукт Chemapol (Чехословакия), очищен перекристаллизацией [59]; цетилполи-(10)-этиленгликоль (Бридж-56), производства фирмы Atlas Seppic (Франция), любезно предоставил проф. Ф. Пюньзе (Франция).

Органические растворители (*n*-октан, бензол, циклогексан, хлороформ) очищали перегонкой.

**Субстраты:** *n*-нитроанилид N-глутарил-L-фенилаланина (Serva, ФРГ), *n*-нитроанилид N-бензоил-D,L-аргинина (Sigma, США), фосфоенолпируват, ADP и NADH (все Sigma, США), пирогаллол (Wako, Япония).

**Приготовление рабочих растворов ферментов.**  $\alpha$ -Химотрипсин, трипсин растворяли в буферном растворе (0,02 М натрий-фосфат – борат – ацетат) (буфер А) при рН 7,0 или 8,0. Концентрацию активных центров  $\alpha$ -химотрипсина определяли титрованием с помощью N-транс-циннамоилимидазола по методике [31], концентрацию активных центров трипсина – титрованием с помощью *n*-нитрофенилгуанидинбензоата по методике [32].

Пероксидазу растворяли в буферном растворе А при pH 7,0, концентрацию ее определяли спектрофотометрически (403 нм), используя значение молярного поглощения  $9,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$  [60]. Лактатдегидрогеназу и пируваткиназу растворяли в буферном растворе 0,05 М патрий-fosфат — 2 мМ EDTA — 5 мМ MgCl<sub>2</sub> — 1 мМ дитиотрейт, 1 М ацетат аммония, pH 6,8.

Цирофосфатазу растворяли в буферном растворе ( $5 \cdot 10^{-2}$  М трипс), содержащем  $1 \cdot 10^{-2}$  М MgCl<sub>2</sub>, при pH 7,0.

**Типичный эксперимент.** К 2 мл 0,04—0,8 М раствора ПАВ в органическом растворителе (октан, хлороформ — октан, 1 : 1, циклогексан, бензол) добавляли 0,01 мл (или менее) концентрированного раствора фермента в водном буфере, интенсивно встряхивали, после чего вносили 0,01 мл (или менее) раствора субстрата в воде (или в ацетонитриле), спаса интенсивно встряхивали и в полученной гомогенной (оптически прозрачной) системе измеряли скорость ферментативной реакции. Все эксперименты проводились с оптически прозрачными растворами.

При добавлении водного раствора к органическому растворителю, содержащему ПАВ, оптическая прозрачность достигается в исследуемых системах, как правило, быстро (десятка секунд). Однако состояние равновесного распределения в ряде случаев устанавливается гораздо медленнее (десятки минут). Можно думать, что причина заключается в медленных структурных перестройках мицелл при изменении степени их гидратации. Эти медленные структурно-сольватационные перестройки, происходящие в прозрачном (не мутном) мицеллярном растворе, можно обнаружить, например, в виде затухающих осцилляций поглощения при 410 нм, которые возникают при добавлении водного раствора *n*-нитрофенолята к раствору Аэрозоля ОТ в октане.

Чтобы исключить влияние подобного рода явлений на кинетику ферментативных реакций в системах обращенных мицелл, мы иногда применяли (в дополнение к указанной выше) несколько иную методику смешения реагентов: аликвоты запасных растворов фермента и субстрата солюбилизировали по отдельности каждый в 1 мл раствора ПАВ в органическом растворителе и полученные растворы (с одинаковыми концентрациями ПАВ и одним и тем же соотношением [H<sub>2</sub>O]/[ПАВ]) инкубировали 10—30 мин; лишь после этого их смешивали в спектрофотометрической кювете.

**Измерение скоростей ферментативных реакций.** За скорость гидролиза *n*-нитроанилидных субстратов (под действием  $\alpha$ -химотрипсина или трипсина) следили спектрофотометрически по образованию *n*-нитроанилина при 380 нм в той или другой мицеллярной системе. Например, для мицеллярной системы, описанной в подписи к рис. 2, найдено значение, равное  $13\,500 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ . В водном буфере (в отсутствие ПАВ и октана) *n*-нитроанилин характеризуется весьма близким значением молярного поглощения, равным  $14\,500 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ .

За реакцией дезацилирования N-транс-циннамоил- $\alpha$ -химотрипсина следили спектрофотометрически (335 нм) по скорости расходования N-транс-циннамоилимидазола в условиях насыщения фермента этим субстратом.

Окисление пирогаллола, катализируемое пероксидазой, регистрировали спектрофотометрически по образованию пурпурогаллина (420 нм). Молярное поглощение этого продукта в мицеллярной системе, описанной в подписи к рис. 6, такое же, как в одном буфере ( $6300 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ).

За каталитической активностью в системе «пируваткиназа — лактатдегидрогеназа» (см. уравнение (10)) следили спектрофотометрически по расходованию NADH. Молярное поглощение NADH (340 нм) в мицеллярной системе, описанной в подписи к рис. 7, такое же, как в водном буфере ( $6500 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ).

Скорость гидролиза пироfosфата, катализируемого пирофосфатазой, определяли по количеству образующегося неорганического фосфата; для этой цели через определенные промежутки времени отбирали пробы из реакционной смеси. Определение неорганического фосфата в пробах проводили по слегка модифицированной методике [61].

*Спектрофотометрические измерения* осуществляли на двухлучевых спектрофотометрах «Hitachi-Perkin-Elmer 124» и «Cary-16» с термостатируемыми кюветными отделениями.

Авторы считают своим приятным долгом поблагодарить чл.-кор. АН СССР проф. И. В. Березина за постоянное внимание к данной работе и ценные замечания. Авторы выражают также глубокую признательность д-ру хим. н. С. М. Аваевой и канд. хим. н. А. А. Байкову за предоставленный ими препарат пирофосфатазы и обсуждение механизма ее действия.

## ЛИТЕРАТУРА

- Березин И. В., Мартинек К. (1977) Основы физической химии ферментативного катализа, «Высшая школа», М.
- Березин И. В., Антонов В. К., Мартинек К., ред. (1976) Иммобилизованные ферменты, Изд-во МГУ, М.
- Mosbach K., ed. (1976) Methods in Enzymology, vol. 44, Acad. Press, N. Y.
- Martinek K., Berezin I. V. (1978) J. Solid Phase Biochem., 2, 343–385.
- Березин И. В., Мартинек К., ред. (1979) Успехи биоорганического катализа, Изд-во МГУ.
- Клибапов А. М., Семенов А. Н., Самохин Г. П., Мартинек К. (1978) Биоорганическая химия, 4, 82–88.
- Мартинек К., Клибапов А. М., Самохин Г. П., Семенов А. Н., Березин И. В. (1977) Биоорганическая химия, 3, 696–702.
- Мартинек К., Левашов А. В., Клятко Н. Л., Березин И. В. (1977) Докл. АН СССР, 236, 920–924.
- Torchilin V. P., Martinek K. (1979) Enzyme Microbial. Technol., 1, 74–82.
- Жолло М. (1965) Физическая химия денатурации белков, «Мир», М.
- Ленниджер А. Л. (1974) Биохимия, «Мир», М.
- Misiorkowski R. L., Wells M. A. (1974) Biochemistry, 13, 4921–4927.
- Douzou P., Debey P., Franks F. (1977) Nature, 268, 466.
- Douzou P., Keh E., Balny C. (1979) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76, 681–684.
- Yatsimirski A. K., Martinek K., Berezin I. V. (1971) Tetrahedron, 27, 2855–2868.
- Martinek K., Osipov A. P., Yatsimirski A. K., Berezin I. V. (1973) Tetrahedron, 29, 963–969.
- Martinek K., Osipov A. P., Yatsimirski A. K., Berezin I. V. (1975) Tetrahedron, 31, 709–719.
- Martinek K., Yatsimirski A. K., Levashov A. V., Berezin I. V. (1977) in: Micellization, Solubilization, and Microemulsions (Mittal K. L., ed.), vol. 2, pp. 489–508, Plenum Press, N. Y.–London.
- Пантин В. И., Левашов А. В., Мартинек К., Березин И. В. (1979) Докл. АН СССР, 247, 1194–1197.
- Shinoda K. (1967) in Proc. IVth International Congress of Surface Active Substances, vol. 2, p. 527, Gordon and Breach, N. Y.
- Herries D. G., Bishop W., Richards E. M. (1964) J. Phys. Chem., 68, 1842–1852.
- Singer S. J. (1962) Adv. Protein Chem., 17, 1–68.
- Menger F. M., Saito G. (1978) J. Amer. Chem. Soc., 100, 4376–4379.
- Левашов А. В., Пантин В. И., Мартинек К. (1979) Колл. ж., 41, 453–459.
- Eicke H. F., Shepherd J. C. W., Steinemann A. (1976) J. Col. Interface Sci., 56, 168–176.
- Eikwall P., Mandell L., Fontell K. (1970) J. Col. Interface Sci., 33, 215–235.
- Шипода К., Накагава Т., Тамамути Б., Исемура Т. (1966) Коллоидные поверхности-активные вещества, «Мир», М.
- Fendler J. H., Fendler E. J. (1975) Catalysis in Micellar and Micromolecular Systems, Acad. Press, N. Y.
- Fendler J. H. (1976) Acc. Chem. Res., 9, 153–161.
- Mittal K. L., ed. (1977) Micellization, Solubilization, and Microemulsions, Plenum Press, N. Y.–London.
- Schonbaum G. R., Zerner B., Bender M. L. (1961) J. Biol. Chem., 236, 2930–2935.
- Chase T., Jr., Show E. (1967) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 29, 508–514.
- Nagel W., Wilig P. (1965) Z. Physiol. Chem., 340, 1–7.
- Erlanger B. F., Kokowsky N., Cohen W. (1961) Arch. Biochem. and Biophys., 95, 271–278.

35. Berezin I. V., Kazanskaya N. F., Klyosov A. A., Svedas V. K. (1973) Eur. J. Biochem., 38, 529–536.
36. Goldman R., Goldstein L., Katchalski E. (1971) in: Biochemical Aspects of Reactions on Solid Supports (Stark G. R., ed.), Acad. Press, N. Y.
37. Laidler K. J., Sundaram P. V. (1971) in: Chemistry of the Cell Interface, Part A (Brown H. D., ed.), Acad. Press, N. Y.
38. Березин И. В., Клибанов А. М., Мартинек К. (1975) Успехи химии, 44, 17–47.
39. Menger F. M., Donohue J. A., Williams R. F. (1973) J. Amer. Chem. Soc., 95, 286–288.
40. Мартинек К., Левашов А. В., Березин И. В. (1970) Молекулярн. биология, 4, 517–528.
41. Мартинек К., Левашов А. В., Рубайло В. Л., Варфоломеев С. Д., Березин И. В. (1970) Биохимия, 35, 1207–1215.
42. Maurel P. (1978) J. Biol. Chem., 523, 1677–1683.
43. Luisi P. L., Bonner F. J., Pelligrini A., Wiget P., Wolf R. (1979) Helv. chim. acta, 62, 740–753.
44. Goldstein L., Levin Y., Katchalski E. (1964) Biochemistry, 3, 1913–1919.
45. Laidler K. J., Bunting P. S. (1973) The Chemical Kinetics of Enzyme Action, Clarendon Press, Oxford.
46. Martinek K., Varfolomeev S. D., Berezin I. V. (1971) Eur. J. Biochem., 19, 242–249.
47. Мартинек К., Левашов А. В., Пантин В. И., Березин И. В. (1978) Докл. АН СССР, 238, 626–629.
48. Bender M. L., Schonbaum G. R., Zerner B. (1962) J. Amer. Chem. Soc., 84, 2540–2550.
49. Eicke H. F., Shepherd J. C. W. (1974) Helv. chim. acta, 57, 1951–1963.
50. Eicke H. F. (1975) Chimia, 29, 176–177.
51. Eicke H. F. (1975) J. Col. Interface Sci., 52, 65–76.
52. Hasinoff B. B., Dunford H. B. (1970) Biochemistry, 9, 4930–4939.
53. Altshul A. M., Karon M. L. (1974) Arch. Biochem. and Biophys., 13, 161–168.
54. Lee T. T. (1977) Plant. Physiol., 59, 372–375.
55. Hess B., Worster B. (1970) FEBS Lett., 9, 73–77.
56. Baykov A. A., Arjukov A. A., Avaeva S. M. (1976) Biochim. et. biophys. acta, 429, 982–992.
57. Baykov A. A., Avaeva S. M. (1974) Eur. J. Biochem., 47, 57–66.
58. Kunitz M. (1952) J. Gen. Physiol., 35, 423–454.
59. Duynslee D. F., Grunwald E. (1959) J. Amer. Chem. Soc., 81, 4540–4542.
60. George P. (1951) Biochem. J., 49, 88–104.
61. Fiske C. H., Subbarow Y. (1952) J. Biol. Chem., 66, 375–400.

Поступила в редакцию  
29.X.1979

## CATALYSIS BY WATER-SOLUBLE ENZYMES INCORPORATED INTO THE REVERSED SURFACTANT MICELLES IN NON-AQUEOUS SOLVENTS

LEVASHOV A. V., KLYACHKO N. L., PANTIN V. I.,  
KHMELNITSKY Yu. L., MARTINEK K.

*M. V. Lomonosov State University, Moscow*

Water-soluble enzymes stabilization with surfactants against the inactivation induced by organic solvents has been studied.  $\alpha$ -Chymotrypsin, trypsin, pyrophosphatase, lactate dehydrogenase, pyruvate kinase and peroxidase were incorporated into the reversed micelles formed by the surfactants (Aerosol OT, cetyltrimethylammonium bromide, Brij-56) in organic solvent (benzene, chloroform, octane, cyclohexane). Solubilized enzymes retained their catalytic activity and substrate specificity. A kinetic theory of enzyme reactions in pseudo-biphasic system «micelle — solvents» was proposed. Analysis of the observed dependence of the Michaelis equation parameters on concentrations of the medium components (water, organic solvent, surfactant) and on the ratio of the charges signs both in the substrate molecule and at the interface (+ +, + -, - -) was carried out. The results obtained can be of value for enzyme application in organic synthesis and for elucidating the state and role of water incorporated into biomembranes, and the enzyme active centers.