



УДК 577.152.344.04:541.64

АКТИВНОСТЬ α -ХИМОТРИПСИНА, ИММОБИЛИЗОВАННОГО В НАНОКАПСУЛЫ ПОЛИ(N,N-ДИДОДЕЦИЛ-N,N-ДИАЛЛИЛАММОНИЙБРОМИДА)

© 1997 г. Ю. Е. Шапиро[#], Е. Г. Пыхтеева, Г. В. ФедороваФизико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины,
270080, Одесса, Черноморская дорога, 86

Поступила в редакцию 30.05.96 г.

Синтезированы биокаталитические системы из нанокapsул, содержащих α -химотрипсин во внутренней водной полости, способные функционировать как в органическом растворителе, так и в водной среде. Для этого обращенные гидратированные мицеллы N,N-дидодецил-N,N-диаллиламмонийбромида (DDAB) в циклогексане ($w_0 = 22$), инкапсулировавшие α -химотрипсин, подвергали УФ-инициированной полимеризации. После осаждения ацетоном нанокapsулы переводили в водную фазу добавлением аэрозоля ОТ с последующим ультразвуковым диспергированием. При этом формируются моноламеллярные липосомы, внутренний монослой которых представляет собой полимерную сетку из поли-DDAB, в которой α -химотрипсин находится в водном окружении, а наружный монослой состоит из молекул аэрозоля ОТ. Наружный диаметр нанокapsул, по данным светорассеяния, составил в среднем 20 нм. При гидролизе *n*-нитрофенилацетата α -химотрипсином, включенным в липосомы, величина K_m не изменяется, значение $k_{кат}$ уменьшается в 1.2 раза, а константы ингибирования продуктом реакции K_p – в 1.6 раза. Имобилизованный внутри нанокapsул α -химотрипсин обладает высокой термостабильностью (активен до 80°C). Полимерная сетка препятствует конформационной перестройке молекулы фермента при нагревании.

Ключевые слова: α -химотрипсин имобилизованный, бислоиные везикулы, нанокapsулы, мономерные ПАВ, ферментативный катализ.

Высокая каталитическая активность, позволяющая проводить химические реакции в мягких условиях, и непревзойденная селективность действия ферментов открывают широкие перспективы для использования биокатализа в процессах органического синтеза [1, 2]. Однако применению ферментов существенно мешает то обстоятельство, что они сохраняют свои уникальные свойства лишь в водном растворе в узком диапазоне pH и температур. Переход от воды как среды реакции к органическому растворителю или выход из оптимального диапазона pH и температур в водной фазе сопровождается либо денатурацией фермента, либо резким падением его каталитической активности с утратой субстратной специфичности [2]. Этих неприятностей можно избежать полностью или частично путем создания водо- или органорастворимых биокаталитических систем, в качестве которых можно рассматривать ферменты, имобилизованные на поверхности полимерного носителя [3–5] или включенные в обращенные мицеллы из катионных [6],

анионных [7, 8] или неионогенных [9, 10] ПАВ, во всевозможные лиотропные мезофазы [11, 12] или липосомы [13, 14]. При этом фермент оказывается защищенным от денатурирующего воздействия среды, и его активность практически не снижается [7, 15].

Для известных биокаталитических ансамблей такого рода измерена ферментативная активность [4–10, 12–15], а также определена молекулярная структура [5, 11, 16, 17]. Строение биокаталитических ансамблей, в том числе упаковка и конформация молекул ПАВ и липидов, локализация и характер гидратации молекул фермента, определяет каталитическую активность и механизм взаимодействия биокатализатора с субстратом. Молекулы воды, по-видимому, выполняют регуляторную роль и контролируют надмолекулярную структуру ансамблей [17–19].

Включение ферментов как в обращенные мицеллы, так и в фосфолипидные липосомы иногда приводит к увеличению их активности [12, 15], хотя в большинстве случаев активность несколько снижается [3, 6, 12]. Последнее, впрочем, не препятствует использованию подобных биокаталитических систем. Ограничение состоит в том. Обращенные мицеллы, инкапсулирующие молекулы

Сокращения: DDAB – N,N-дидодецил-N,N-диаллиламмоний-бромид, ПАВ – поверхностно-активное вещество, АОТ – аэрозоль ОТ (дизооктилсульфосукцинат натрия).

[#] Автор для переписки.

фермента, формируются в неполярном окружении. Поэтому такие системы предполагают использование субстратов, растворимых в органических растворителях. С другой стороны, ферменты, включенные в липосомы, находятся в водной фазе, поэтому они пригодны лишь для водорастворимых субстратов. В связи с этим принципиальный интерес представляет создание биокаталитических ансамблей, которые могли бы функционировать как в водной, так и в неводных средах и не требовали бы специальных условий для хранения. Этим требованиям вполне может удовлетворять система, в которой молекулы фермента находятся внутри полимерных наногранул. Полимерные наногранулы защищают фермент от денатурации органическим растворителем, способствуют расширению температурного диапазона их действия и могут существовать в сухом виде при необходимости длительного хранения.

Для формирования полимерных наногранул предложены два способа. Первый заключается в полимеризации мицелл и везикул из мономерных ПАВ [20–22] под действием УФ-облучения или при химическом иницировании [23, 24]. В зависимости от расположения кратных связей в структуре мономерного ПАВ полимеризацию можно провести либо по полярному, либо по липофильному фрагментам дифильной молекулы ПАВ [21, 22]. Для иммобилизации молекул фермента наибольший интерес представляют мономерные ПАВ, содержащие гидрофильный полимеризуемый фрагмент, обращенный в мицеллах и везикулах во внутреннюю водную полость.

К числу подобных ПАВ относятся катионоактивные пиридиниевые или аммониевые соединения, имеющие винильные [20, 23], метакрилатные [25, 26] или аллильные [24, 26–33] группы. В зависимости от того, сколько алкильных цепей (одну или две) содержат молекулы этих соединений, они способны образовывать в воде мицеллы [20–27] или моноламеллярные везикулы [22, 28–33]. К сожалению, диаметр этих везикул довольно велик – 10–100 мкм [33].

Второй способ заключается в формировании наногранул путем полимеризации обращенных мицелл АОТ, содержащих модифицированный акрилоилхлоридом α -химотрипсин, акриламид и N,N' -метиленбисакриламид [34]. В этом случае молекула фермента оказывается ковалентно встроенной в частицы полимерного геля. Диаметр полиакриламидных гранул зависит от степени гидратации мицелл $w_0 = [H_2O]/[AOT]$ и концентрации акриламида и составляет 40–100 нм. Однако необходимость химической модификации молекул фермента и ПАВ делает этот способ неоправданно трудоемким.

Цель настоящей работы – иммобилизация немодифицированного α -химотрипсина внутри полимер-

ных нанокапсул, представляющих собой заполимеризованные на границах раздела фаз обращенные мицеллы N,N -дидодецил- N,N -диаллиламмонийбромида $[(H_2C=CH-CH_2)_2N^+\{(CH_2)_{11}CH_3\}_2]Br$ (DDAB) в циклогексане с включенными во внутреннюю водную полость молекулами фермента. Предлагаемый способ формирования нанокапсул совмещает достоинства вышеописанных двух способов и не обладает их недостатками.

По данным электронной микроскопии, при УФ-инициированной полимеризации N,N -диалкил- N,N -диаллиламмонийбромидов в составе их мицелл в воде [32] или бислойных везикул, полученных ультразвуковой обработкой их 0.01 М водных дисперсий [24], сохраняется структура исходных коллоидных частиц. Полимер представляет собой двумерную сетку на границе раздела фаз ПАВ–вода, причем гидрофобные алкильные фрагменты упакованы внутри прямых мицелл или бислоя подобно тому, как это установлено для фосфолипидных везикул [35]. Включение молекул фермента в везикулы позволяет получить в результате их полимеризации биокаталитические нанокапсулы, в которых фермент защищен двойной полимерной сеткой.

Следует заметить, что подобная биокаталитическая система обладает тремя существенными недостатками: 1) необходимо отделение гель-фильтрацией невключившегося фермента от нанокапсул. Эта операция, в общем несложная в случае фосфолипидных липосом, доставляет много неприятностей для твердых полимерных микрочастиц; 2) двойная полимерная сетка, несмотря на сравнительно большие размеры ячеек, существенно снижает коэффициенты трансмембранной диффузии субстрата из раствора к инкапсулированному ферменту и продуктов реакции – в обратном направлении. Это может значительно уменьшить эффективные параметры ферментативной кинетики, в том числе из-за специфического ингибирования продуктами реакции; 3) размеры липосом основной фракции дисперсии N,N -диалкил- N,N -диаллиламмонийбромидов, обработанной ультразвуком, довольно велики и варьируют в широком диапазоне. Их наружный диаметр составляет 60–230 нм [30]; при полимеризации он уменьшается, но незначительно [22].

Использование обращенных мицелл из мономерного ПАВ, содержащих солиобилизованную воду в качестве внутреннего монослоя формируемой впоследствии бислойной везикулы, позволяет варьировать диаметр внутренней водной полости в достаточно широких пределах [8, 12], уменьшая его вплоть до среднего диаметра глобулы α -химотрипсина (4.3 нм) (α -химотрипсин, инкапсулированный в обращенных мицеллах, имеет максимальную активность при совпадении размеров

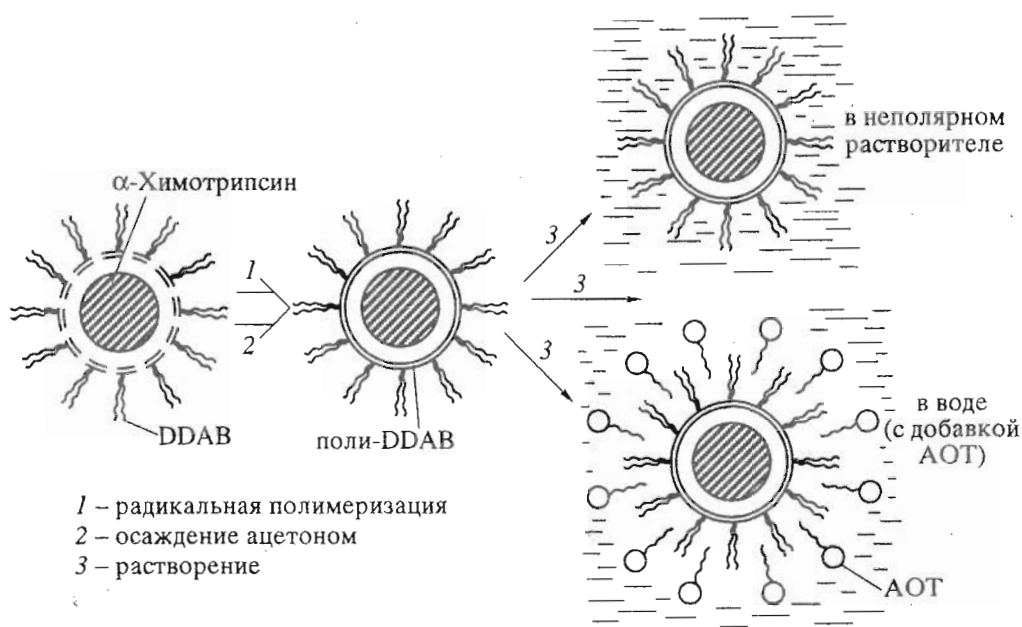


Рис. 1. Схема получения ферментсодержащих нанокапсул.

внутренней полости мицеллы и солюбилизированной белковой глобулы [36]).

Процесс получения биокаталитической системы с α-химотрипсином схематически представлен на рис. 1. После УФ-инициированной полимеризации DDAB вокруг ферментной глобулы формируется сетка поли-DDAB. Степень полимеризации можно контролировать по изменениям в ИК- и ^{13}C -ЯМР-спектрах дисперсий, подвергнутых УФ-облучению.

Наиболее удобна для этого в ИК-спектре полоса при 1636 см^{-1} , соответствующая валентным колебаниям двойной связи аллильного фрагмента. Отношения интенсивности этой полосы к интенсивностям полос симметричных (ν_s , 2838 см^{-1}) и асимметричных (ν_{as} , 2912 см^{-1}) валентных колебаний С–Н-связи CH_2 -групп циклогексана (внутренний стандарт интенсивности) при полимеризации уменьшаются втрое. При использовании в качестве стандарта интенсивности полос валентных колебаний С–Н-связей концевых метильных групп додецильных фрагментов (ν_s , 2888 и ν_{as} , 2945 см^{-1}) относительное уменьшение интенсивности полосы валентных колебаний двойной связи при полимеризации составляет 3.3 раза. Следует отметить, что из-за перекрытия полос $\nu_{as}(\text{CH}_3)$ и $\nu_s(\text{CH}_3)$ DDAB с интенсивной полосой $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ циклогексана точность определения интенсивности во втором случае меньше. Однако достаточно уверенно можно утверждать, что 2/3 всех аллильных групп (67%) молекул DDAB в структуре обращенных мицелл запolyмеризованы в сетку, внутри которой инкапсулированы глобулы α-химотрипсина.

С данными ИК-спектроскопии согласуются результаты ^{13}C -ЯМР-анализа (табл. 1): в результате полимеризации DDAB суммарная интенсивность сигналов $\text{CH}_2=\text{CH}$ -группы в спектре уменьшается в 2.4 раза, интенсивность сигналов атомов С10, С11, С12 алкильных групп, как и следовало ожидать, не изменяется, но появляются сигналы фрагмента $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{N}^+$ поли-DDAB при 60.1–62.0 и 21.3–32.6 м. д. Из этих данных следует, что в структуре обращенных мицелл полимеризуется до 60% мономерных молекул DDAB.

Для формирования бислоевых везикул в качестве внешнего монослоя использовали АОТ. Молекулы анионного ПАВ образуют стабильные бислои с внутренним полимерным монослоем, содержащим аммониевые фрагменты. Осажденные из циклогексана ферментсодержащие обращенные мицеллы поли-DDAB переводили в водную фазу (рис. 1) и обрабатывали ультразвуком. Полимерные нанокапсулы достаточно хорошо защищают фермент от действия ультразвука.

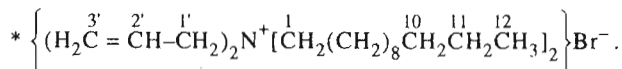
Принципиальный интерес представляет оценка размеров нанокапсул поли-DDAB/АОТ. Гидродинамический радиус нанокапсул определяли методом светорассеяния. Известно [37], что мутность дисперсии (τ) связана с гидродинамическим радиусом диспергированных частиц (r_0) уравнением

$$r_0 = \frac{\lambda}{8\pi^2} \left(\frac{9[\tau]\lambda}{\alpha^2} \right)^{1/3}, \quad (1)$$

где $[\tau] = \tau/c$ – характеристическая мутность, c – объемная концентрация ПАВ; α – параметр,

Таблица 1. Отнесение сигналов в спектрах ^{13}C -ЯМР обращенных мицелл DDAB в циклогексане, инкапсулирующих α -химотрипсин во внутренней водной полости, до и после полимеризации аллильных фрагментов ПАВ под действием УФ-облучения

Углерод*	До полимеризации		После полимеризации	
	δ , м. д.	Относительная групповая интенсивность	δ , м. д.	Относительная групповая интенсивность
C2'	130.6	0.112	130.8	0.046
	128.2		128.1	
C3'	118.2	0.098	118.0	0.099
	115.7		115.5	
C1'	64.8	0.098	64.9	0.099
	62.5		62.7	
	—		62.0	
	—		60.1	
C1	59.9	0.077	59.7	0.076
	57.7		57.4	
C10 (CH ₂) ₈	32.5	0.713	32.6	0.779
	31.9		32.0	
	30.3		30.4	
	23.3		23.3	
C11	21.3	0.077	21.3	0.076
	15.2		15.2	
C12	13.3	0.077	13.3	0.076
	13.3		13.3	



характеризующий отклонение оптических свойств частицы от свойств среды,

$$\alpha = \frac{3}{4\pi} \left(\frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right), \quad (2)$$

m – отношение показателя преломления частицы $n_D^{20} = 1.4614$ (взято для N,N-дидодецил-N,N-диметиламмонийбромида, соединения, близкого по структуре к использованному N,N-дидодецил-N,N-диаллиламмонийбромиду) к показателю преломления среды $n_D^{20} = 1.3335$; λ – длина волны в измеряемой среде, равная $650/1.3335 = 487.4$ нм.

Уравнение (1) справедливо при значениях параметра, характеризующего отношение размера частицы к длине волны, $z = 8\pi r_0/\lambda \leq 2$ [37]. Согласно уравнению (1), r_0 нанокapsул для пустых везикул поли-DDAB/AOT составил 9.2 ± 0.3 нм, а для везикул, содержащих ферментные глобулы, – 10.0 ± 0.8 нм.

Активность полученных биокаталитических систем определяли по гидролизу *n*-нитрофенил-

ацетата. Известно, что в водных средах *n*-нитрофенилацетат подвержен самопроизвольному гидролизу, однако константа скорости неферментативного гидролиза $[(5.9 \pm 0.3) \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}]$ значительно ниже константы скорости для ферментативной реакции в присутствии α -химотрипсина, которая составила $(4.8 \pm 0.7) \times 10^{-2} \text{ c}^{-1}$. Поэтому можно утверждать, что самопроизвольный гидролиз *n*-нитрофенилацетата не вносит существенных погрешностей при определении параметров активности α -химотрипсина. Тем не менее следует заметить, что представленные в табл. 2 параметры в значительной мере имеют оценочный характер.

Обработку результатов спектрофотометрического определения параметров активности проводили с использованием интегральной формы уравнения Михаэлиса–Ментен, учитывающего ингибирование продуктом реакции [38]. В координатах Фостера–Ниммана это уравнение имеет вид

$$\frac{p}{t} = \frac{vK_p}{K_p - K_m} - \frac{K_m(K_p + s_0)}{K_p - K_m} \frac{1}{t} \ln \frac{s_0}{s_0 - p}, \quad (3)$$

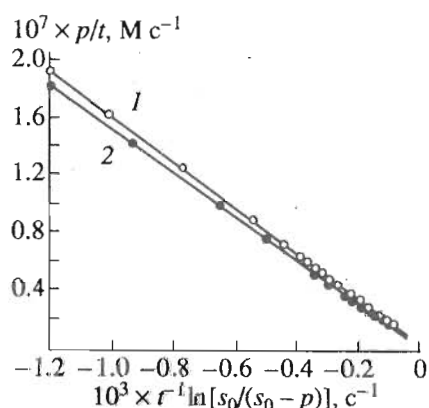


Рис. 2. Анаморфозы в координатах Фостера–Ниманна для определения кинетических параметров реакции гидролиза *l*-нитрофенилацетата, катализируемого α -химотрипсином, растворенным в водном буферном растворе (1) и заключенным в бислойные нанокapsулы поли-DDAB/AOT (2) (pH 8.3, 19°C, $s_0 = 1.6 \times 10^{-4}$ M).

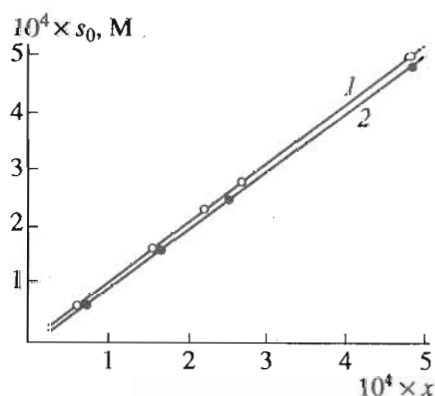


Рис. 3. Анаморфозы в координатах $s_0 - x$, построенные для тех же образцов, что и на рис. 2.

где s_0 – начальная концентрация субстрата, s и p – текущие концентрации субстрата и продукта, причем из уравнения материального баланса сле-

дует, что $s = s_0 - p$; K_m и K_p – константы Михаэлиса и ингибирования, v – скорость процесса [39].

На рис. 2 приведены анаморфозы в координатах Фостера–Ниманна $p/t = f(\ln[s_0/(s_0 - p)]/t)$, где t и p определяются экспериментально, а s_0 принимает дискретные значения в пределах экспериментальной серии от 5×10^{-5} до 5×10^{-4} M для раствора α -химотрипсина в трис-буфере и для α -химотрипсина, иммобилизованного в бислойные липосомы поли-DDAB/AOT. Значения углового коэффициента этих анаморфоз

$$\frac{K_m(K_p + s_0)}{(K_m - K_p)} = x \quad (4)$$

дают после преобразований линейное уравнение

$$s_0 = x \left(1 - \frac{K_p}{K_m} \right) - K_p \quad (5)$$

На рис. 3 показаны эти вторичные анаморфозы в координатах $s_0 = f(x)$, построенные на основании линейризации Фостера–Ниманна для тех же образцов, что и на рис. 2. Из первичных анаморфоз определены значения x для каждой концентрации s_0 . Из вторичных анаморфоз найдены значения K_m и K_p , которые из уравнения 3 позволяют рассчитать величину V_{max} .

Измерения ферментативной активности показали, что иммобилизация α -химотрипсина в липосомные нанокapsулы вносит изменения в кинетические параметры ферментативного гидролиза. Для сравнения эффективности процесса, катализируемого различными системами, удобно использовать эффективную константу скорости второго порядка $k_{эф}$, определяемую соотношением

$$k_{эф} = \frac{k_{кат}}{K_m} = \frac{k_{+2}k_{+1}}{k_{-1} + k_{+2}}, \quad (6)$$

где $k_{кат}$ – каталитическая константа, идентичная константе скорости распада фермент-субстратного

Таблица 2. Эффективные кинетические параметры гидролиза *l*-нитрофенилацетата под действием различных каталитических систем (pH 8.3, 19°C)

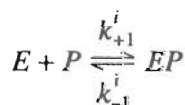
Номер	Каталитическая система	$K_m \times 10^4, M$	$V_{max} \times 10^8, M c^{-1}$	$k_{эф}, M^{-1} c^{-1}$	$K_p \times 10^5, M$
1	α -Химотрипсин в водном буферном растворе	3.8 ± 0.3	9.9 ± 0.5	32 ± 8	1.1 ± 0.1
2	α -Химотрипсин в водном буферном растворе, УФ-облученный и озвученный	9.6 ± 1.3	32.5 ± 9.0	50 ± 14	1.1 ± 0.1
3	α -Химотрипсин, иммобилизованный в бислойных везикулах поли-DDAB/AOT	3.9 ± 0.3	3.4 ± 0.5	26 ± 9	0.69 ± 0.05
4	Пустые бислойные везикулы поли-DDAB/AOT	0.029 ± 0.004	0.004 ± 0.001	–	0.39 ± 0.04
5	Смесь α -химотрипсина в водном буферном растворе и бислойных везикул поли-DDAB/AOT	0.89 ± 0.11	2.7 ± 0.6	71 ± 25	0.17 ± 0.02
6	α -Химотрипсин, добавленный к залолимеризованным обращенным мицеллам DDAB в циклогексане и переведенный в водный раствор добавлением AOT	2.6 ± 0.3	0.17 ± 0.05	5 ± 4	5.4 ± 0.5

комплекса ES с образованием продукта реакции P (k_{+2}) для механизма Михаэлиса–Ментен;

$$k_{\text{кат}} = \frac{V_{\text{max}}}{e_0}, \quad (7)$$

где e_0 – полная концентрация фермента, определенная в нашем случае по навеске.

Из табл. 2 видно, что при иммобилизации α -химотрипсина в везикулы (система 3) K_m не изменяется, а V_{max} уменьшается в 2.9 раза по сравнению с соответствующими константами для нативного фермента (система 1). Заметим, что значения e_0 для системы (3) вдвое меньше, чем для остальных систем. Константа ингибирования продуктом реакции ($K_p = k_{-1}^i / k_{+1}^i$) процесса, происходящего по обычной схеме



уменьшается при иммобилизации в 1.6 раза. Это указывает на некоторую стабилизацию комплекса биокаталитической частицы с продуктом реакции (*n*-нитрофенолят-анионом), который удерживается внутри везикулы полимерной сеткой, и поэтому коэффициент трансмембранной диффузии молекул продукта уменьшается. Чтобы проверить, насколько изменение активности α -химотрипсина, иммобилизованного в липосомы, связано с УФ-облучением и обработкой системы ультразвуком, был проведен контрольный опыт, в котором раствор фермента в буфере подвергали соответствующей обработке в условиях формирования бислойных нанокапсул (система 2). При этом наблюдается увеличение K_m в 2.5 раза, а $k_{\text{эф}}$ – в 1.6 раза (табл. 2), величина K_p не меняется. Поэтому для оценки изменений кинетических параметров, происходящих при иммобилизации фермента, более корректно сравнивать системы (2) и (3). Тогда из данных табл. 2 следует, что при иммобилизации α -химотрипсина везикулами K_m уменьшается в 2.5 раза, что приводит к падению $k_{\text{эф}}$ в 1.9 раза. Это свидетельствует об увеличении устойчивости фермент-субстратного комплекса Михаэлиса.

Поскольку в ряде случаев бислойные везикулы подобно мицеллам ПАВ могут проявлять каталитическое действие вследствие так называемого мицеллярного катализа [7], были измерены кинетические параметры для бислойных везикул поли-DDAB/AOT в буферном водном растворе в отсутствие α -химотрипсина (система 4). Оказалось, что везикулы катализируют гидролиз *n*-нитрофенилацетата, однако значение V_{max} при этом в 850 раз ниже, чем для везикул с иммобилизованным α -химотрипсином (и в 2500 раз меньше, чем для неиммобилизованного фермента), а значения

K_p для систем (4) и (3) практически совпадают. Это позволяет предположить, что продукт гидролиза не столько ингибирует активный центр фермента, сколько адсорбируется на поверхности липосом. Действительно, уменьшение формально рассчитанной K_m для пустых везикул в 130 раз по сравнению с K_m для раствора α -химотрипсина (система 1) тоже указывает на ассоциацию с везикулами родственного соединения – исходного субстрата.

Для доказательства локализации α -химотрипсина внутри запolyмеризованных нанокапсул при формировании биокаталитической системы предложенным нами способом, подтверждения стабильности подобных частиц и оптимальности условий их приготовления проведены опыты по включению фермента в запolyмеризованные обращенные мицеллы в циклогексане или в готовые везикулы. Смешивание раствора α -химотрипсина (система 2) с запolyмеризованными пустыми везикулами (система 4) дает каталитическую систему (5) (табл. 2). Значения $k_{\text{эф}}$ для последней и для системы (2) совпадают в пределах ошибки эксперимента. Значения K_m и K_p для системы (5) в 4.3 раза ниже, чем для системы (3). Это можно объяснить динамической адсорбцией фермента на наружной поверхности липосомы, способствующей защите его активного центра при формировании комплекса Михаэлиса–Ментен или комплекса с продуктом реакции при ингибировании. Отсюда следует, что глобулы α -химотрипсина не могут проникнуть через бислой из водного раствора внутрь везикул.

Не могут они проникнуть также и внутрь запolyмеризованных мицелл DDAB в циклогексане, как это следует из анализа активности системы (6). В результате достаточно долгий контакт α -химотрипсина с неполярным циклогексаном приводит к инактивации фермента. Следует отметить, что в обращенные мицеллы AOT в *n*-октане, содержащие солюбилизованную воду, α -химотрипсин встраивается легко при введении его в сухом виде [7, 16, 17]. При этом его активность практически не уменьшается.

Таким образом, сравнение активности каталитических систем (2), (5) и (6) дает основание утверждать, что при инкапсуляции α -химотрипсина внутри обращенных мицелл DDAB с последующей их запolyмеризацией и переводом образовавшихся нанокапсул в водную фазу с помощью AOT в виде бислойных везикул молекулы фермента гарантированно оказываются внутри нанокапсул.

В работе [34] отмечено, что α -химотрипсин, иммобилизованный в полиакриламидные наногранулы, обнаружил высокую термостабильность как в водных растворах, так и в среде органического растворителя. Известно, что нативный α -химотрипсин в водном растворе теряет активность

Таблица 3. Скорость гидролиза *n*-нитрофенилацетата под действием различных каталитических систем после инкубирования их в течение 20 мин при различных температурах (рН 8.3)

Каталитическая система	$k_{эф}$, М ⁻¹ с ⁻¹		
	19°C	60°C	80°C
α -Химотрипсин			
в водном буферном растворе,	32	0	0
иммобилизованный в бислойных везикулах поли-DDAB/АОТ	26	8	2
Смесь α -химотрипсина в водном буферном растворе и пустых бислойных везикул поли-DDAB/АОТ	71	4	0

при 45°C, а иммобилизованный в полиакриламидных наногранулах сохраняет активность вплоть до 80°C [34].

Для проверки термостабильности иммобилизованного в нанокapsулах α -химотрипсина системы (1), (3) и (5) инкубировали 20 мин при 60 и 80°C. Иммобилизованный α -химотрипсин (система 3) при 60°C сохраняет 31% своей активности, измеренной без нагревания (табл. 3). Даже после инкубации иммобилизованного фермента при 80°C биокаталитическая система сохраняет 8% своей первоначальной активности. В то же время нативный α -химотрипсин (система 1) при 60°C уже не проявляет ферментативной активности, а активность фермента, смешанного с пустыми везикулами поли-DDAB/АОТ, уменьшается при 60°C до 6% от первоначальной, а при 80°C исчезает.

Таким образом, α -химотрипсин, иммобилизованный внутри липосомных нанокapsул с внутренним полимерным монослоем, характеризуется повышенной термостабильностью. Сравнение полученных результатов с данными работы [34] позволяет заключить, что термостабилизация фермента – общее свойство биокатализатора, инкапсулированного в полимерных наногранулах. Можно предположить, что термической денатурации и инактивации фермента препятствует полимерная сетка, которая затрудняет конформационную перестройку молекулы фермента, сопровождающуюся изменением строения активного центра.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

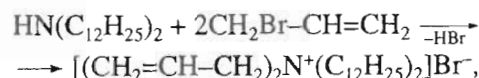
α -Химотрипсин (КФ 3.4.21.1) производства “Биохимреактив” (“Олайн”, Латвия) очищали методом гель-фильтрации (на колонке с сефадексом G-75 в 1 мМ HCl), а затем лиофилизовали.

В качестве буферной системы использовали 0.1 М раствор трис-HCl, рН 8.3 ± 0.1. Значения рН буферных растворов измеряли на иономере ЭВ-74.

n-Нитрофенилацетат синтезировали кипячением полуторного избытка уксусного ангидрида с *n*-нитрофенолятом натрия в течение 1 ч. Продукт перекристаллизовывали дважды из абсолютного

этанола. Т. пл. 79.8°C. Чистоту продукта подтверждали данными ТСХ и ПМР.

N,N-Дидодецил-N,N-диаллиламмонийбромид (DDAB) синтезирован из дидодециламина и бромистого аллила в соответствии со схемой



что позволяет провести реакцию в одну стадию и с более высоким выходом (75%) по сравнению с двустадийным процессом, предложенным в работе [32]. Синтез осуществляли в нитрометане при 90°C в течение 6 ч. Соотношение реагентов диамин-бромистый аллил = 1 : 3 моль/моль. Ход реакции контролировали методом ТСХ на силуфол в системе хлороформ-метанол (8 : 1). Проявитель – пары хлора и раствор *n*-толуидина. По окончании реакции нитрометан отгоняли в вакууме, сухой продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (элюент – хлороформ) и перекристаллизовывали дважды из смеси этилацетат-ацетонитрил (1 : 1). Т. пл. 55°C. Структуру продукта и степень его очистки контролировали спектроскопией ¹H-ЯМР [(CDCl₃, δ , м. д.): 0.92 (т, 6H, CH₃), 1.25 (с, 36H, CH₂)_n], 1.88 (т, 4H, β -CH₂), 3.29 (т, 4H, α -CH₂), 4.23 (д, 4H, CH₂CH=), 5.80–6.20 (м, 4H, =CH₂), 6.20–6.40 (м, 2H, =CH-)], ¹³C-ЯМР- и ИК-спектроскопией.

Диизооктилсульфосукцинат натрия (аэрозоль ОТ, АОТ) производства фирмы Merck (Германия) применяли без дополнительной очистки.

В качестве растворителей использовали циклогексан, хлороформ и ацетон (“Реакхим”, Россия), а также однократно или дважды дистиллированную воду.

Приготовление биокаталитической системы. В смеси циклогексан-хлороформ, 50 : 1 (по объему), растворяли DDAB до концентрации 10⁻² М. К полученному прозрачному раствору добавляли буферный раствор до значения $w_0 = 22$. Эмульсию энергично встряхивали 10 мин до получения прозрачного опалесцирующего раствора. В готовую коллоидную систему, содержащую гидратированные обращенные мицеллы, добавляли сухой

лиофилизированный α -химотрипсин до концентрации 4×10^{-5} – 4×10^{-6} М. Полученную дисперсию кратковременно обрабатывали ультразвуком 2×30 с (35 кГц, диспергатор УЗДН-1УЧ2) при охлаждении. Отсутствие осадка при центрифугировании свидетельствовало о полном включении α -химотрипсина внутрь обращенных миецелл из DDAB.

Радикальную полимеризацию DDAB проводили под действием нефилтрованного УФ-облучения при непрерывном перемешивании коллоидной системы [23, 30, 33] в течение 15 мин. Полученные полимерные нанокапсулы, содержащие α -химотрипсин, осаждали 10-кратным избытком ацетона. Выпадающий при этом белый осадок отделяли центрифугированием (3000 об/мин, 15 мин), промывали ацетоном и высушивали.

Для получения бислойных везикул в воде сухие полимерные нанокапсулы, содержащие фермент, переводили в буферный раствор путем добавления АОТ ([АОТ]/[DDAB] = 0.1 моль/моль). Систему энергично встряхивали (10 мин) и подвергали ультразвуковой обработке (2×30 с, 35 кГц). Полученная дисперсия устойчива, не подвержена флокуляции.

Спектры ^1H -ЯМР и $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ получали на спектрометре Bruker AM-250 при рабочих частотах 250.13 и 62.90 МГц; ИК-спектры – на спектрофотометре Specord 75 IR в стандартных кюветках из КВг.

Ферментативную активность измеряли с помощью спектрофотометра Perkin-Elmer "Lambda-9" при 19°C по выделению продукта реакции *n*-нитрофенола (*n*-нитрофенолят-иона) при 400 нм. Возможности прибора позволяют проводить измерения в УФ- и видимой областях с погрешностями ± 0.2 нм для длины волны и ± 0.003 ОЕ для оптического поглощения. Для построения калибровочной прямой использовали трижды перекристаллизованный *n*-нитрофенол. Реакционную смесь (3 мл) помещали в кювету толщиной 1 см. В качестве раствора сравнения использовали раствор трис. Сканирование проводили через равные промежутки времени (30 с) в течение 30 мин прохождения ферментативного процесса. При изучении термостабильности фермента образцы выдерживали 20 мин в термостате при 60 и 80°C, охлаждали до 19°C, а затем помещали в кювету спектрофотометра.

Статистическую обработку результатов измерения кинетических параметров проводили на компьютере IBM PC/AT (286) по программе STATGRAPHICS. Коэффициенты корреляции для первичных и вторичных анаморфоз превышали 0.998.

Размеры нанокапсул определены на нефелометре ФЭКМ-57 при длине волны 650 нм и температуре 20°C.

Работа выполнена в соответствии с программой INTAS (грант № 93-0038) и частично при поддержке второго автора грантом ISSEP (№ PSU 053099).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Березин И.В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа. М.: Высш. школа, 1977. С. 14, 250.
2. Мартинек К. // Успехи биоорганического катализа / Ред. И.В. Березин, К. Мартинек. М.: МГУ, 1979. С. 105.
3. Тривен М. Имобилизованные ферменты. М.: Мир, 1983. С. 68.
4. Мишаева Р.Н., Кузнецова Н.П., Гудкин Л.Р., Кледин В.И., Самсонов Г.В. // Хим.-фармацевт. журн. 1992. С. 36–40.
5. Еремин А.Н., Метелица Д.И. // Докл. АН Беларуси. 1993. Т. 37. С. 60–64.
6. Рязанцева С.В., Давыдов Р.Н. // Журн. физ. химии. 1991. Т. 65. С. 1145–1147.
7. Мартинек К., Левашов А.В., Клячко Н.Л., Березин И.В. // Докл. АН СССР. 1977. Т. 236. С. 920–923.
8. Хмельницкий Ю.Л., Левашов А.В., Клячко Н.Л., Мартинек К. // Успехи химии. 1984. Т. 53. С. 545–565.
9. Беляева Е.И., Бровко Л.Ю., Узарова Н.К., Клячко Н.Л., Левашов А.В., Мартинек К., Березин И.В. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 273. С. 494–497.
10. Пучкаев А.В., Метелица Д.И. // Биохимия. 1994. Т. 59. С. 45–54.
11. Шапиро Ю.Е., Пыхтеева Е.Г., Левашов А.В., Клячко Н.Л. // Биол. мембраны. 1993. Т. 10. С. 397–408.
12. Klyachko N.L., Levashov A.V., Pshezhetsky A.V., Bogdanova N.G., Berezin I.V., Martinek K. // Eur. J. Biochem. 1986. V. 161. P. 149–154.
13. Березин И.В., Клибанов А.М., Мартинек К. // Успехи химии. 1975. Т. 44. С. 17–47.
14. Липосомы в биологических системах / Ред. Г. Грегориадис, А. Аллисон. Пер. с англ. М.: Медицина, 1983. С. 156.
15. Курганов Б.И., Цетлин Л.Г., Чернов Н.Н., Чеботарева Н.А., Рудакова И.П. // Докл. АН СССР. 1991. Т. 319. С. 1488–1490.
16. Shapiro Yu.E., Budanov N.A., Levashov A.V., Klyachko N.L., Khmelnsky Yu.L., Martinek K. // Collect. Czech. Chem. Commun. 1989. V. 54. P. 1126–1134.
17. Шапиро Ю.Е., Горбатюк В.Я., Левашов А.В., Клячко Н.Л. // Биол. мембраны. 1993. Т. 10. С. 293–306.
18. Федоров Б.Б., Федоров Б.А. // Биофизика. 1993. Т. 38. С. 611–618.
19. Muegge J., Knapp E.W. // J. Phys. Chem. 1995. V. 99. P. 1371–1374.
20. Шапиро Ю.Е., Зубов В.П., Егоров В.В., Дозорова Н.П. // Коллоид. журн. 1981. Т. 43. С. 187–192.
21. Buschl R., Folda T., Ringsdorf H. // Makromol. Chem. Suppl. 6. 1984. P. 245–258.

22. *Paleos C.M.* // Chem. Soc. Rev. 1985. V. 14. P. 45–68.
23. *Егоров В.В., Зубов В.П., Голубев В.Б., Шапиро Ю.Е., Древаль В.Е., Титкова Л.В., Кабанов В.А.* // Высокомолекуляр. соединения. 1981. Т. 23Б. С. 803–808.
24. *Paleos C.M., Dais P., Malliaris A.* // J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed. 1984. V. 22. Part 2-2. P. 3383–3391.
25. *Шапиро Ю.Е., Орлов Ю.Н., Егоров В.В., Зубов В.П.* // Вестн. МГУ. Химия. 1984. Т. 25. С. 487–492.
26. *Батракова Е.В., Орлов Ю.Н., Егоров В.В., Зубов В.П., Титкова Л.В., Шапиро Ю.Е., Кабанов В.А.* // Коллоид. журн. 1985. Т. 47. С. 130–134.
27. *Шапиро Ю.Е., Орлов Ю.Н., Егоров В.В., Зубов В.П.* // Вестн. МГУ. Химия. 1984. Т. 25. С. 595–600.
28. *Лукин Ю.В., Адаменкова М.Д., Картусов С.Н., Ланишина Л.В., Шапиро Ю.Е., Егоров В.В., Зубов В.П.* // Журн. физ. химии. 1984. Т. 58. С. 2233–2239.
29. *Егоров В.В., Шапиро Ю.Е., Зубов В.П.* // Вест. МГУ. Химия. 1987. Т. 28. С. 183–186.
30. *Regen S.L., Jae-Sup Shin, Hainfeld J.F., Wall J.S.* // J. Am. Chem. Soc. 1984. V. 106. P. 5756–5757.
31. *Elbert R., Folda T., Ringsdorf H.* // J. Am. Chem. Soc. 1984. V. 106. P. 7687–7692.
32. *Babilis D., Dais P., Margaritis L.H., Paleos C.M.* // J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed. 1985. V. 23. P. 1089–1098.
33. *Iino Y., Ogata Y., Shigehara K., Tsuchida E.* // Макро-мол. Chem. 1985. V. 186. P. 923–931.
34. *Матвеева Е.Г., Левашов А.В., Щеголев А.А., Рыжова В.В., Поляков В.А., Мартинек К.* // Биотехнология. 1985. С. 84–93.
35. *Shapiro Yu.E., Victorov A.V., Volkova V.I., Barsukov L.I., Bystrov V.P., Bergelson L.D.* // Chem. Phys. Lipids. 1975. V. 14. P. 227–232.
36. *Левашов А.В., Клячко Н.Л., Мартинек К.* // Био-орган. химия. 1981. Т. 7. С. 670–679.
37. *Слоним И.Я.* // Оптика и спектроскопия. 1960. Т. 8. С. 98–108.
38. *Келети Т.* Основы ферментативной кинетики. Пер. с англ. М.: Мир, 1990. С. 219.
39. *Корниш-Боуден Э.* Основы ферментативной кинетики. Пер. с англ. М.: Мир, 1979. С. 37, 201.

Activity of α -Chymotrypsin Immobilized in Poly(N,N-diallyl-N,N-didodecylammonium) Bromide Nanocapsules

Yu. E. Shapiro, E. G. Pykhteva, and G. V. Fedorova

*Bogatskii Physicochemical Institute, National Academy of Sciences of Ukraine,
Chernomorskaya doroga 86, Odessa, 270080 Ukraine*

Abstract—Biocatalytic nanocapsule systems containing α -chymotrypsin in the inner aqueous cavity were synthesized. These systems can function in both organic solvents and aqueous media. To this end, the reversed hydrated micelles of N,N-diallyl-N,N-didodecylammonium bromide (DDAB) in cyclohexane ($w_0 = 22$) with α -chymotrypsin encapsulated were subjected to UV-induced polymerization. After precipitation with acetone, the nanocapsules were transferred into water with the use of AOT and subsequent sonication. The unilamellar liposomes thus formed have an inner monolayer from the polyDDAB network, an outer monolayer from the AOT molecules, and contain α -chymotrypsin in the inner aqueous medium. According to the light scattering data, the mean outer diameter of the nanocapsules is 20 nm. When compared with free enzyme in respect to *p*-nitrophenyl acetate hydrolysis, the α -chymotrypsin encapsulated in the liposomes exhibits the same K_m value, but its values of k_{cat} and of the inhibition constant by the reaction product K_p decreased by factors of 1.2 and 1.6, respectively. The α -chymotrypsin immobilized in the nanocapsules is thermally stable and catalytically active up to 80°C. The polymer network hinders conformational rearrangements of the enzyme molecule upon heating.

Key words: α -chymotrypsin immobilized, bilayer vesicles, nanocapsules, monomeric surfactants, enzyme catalysis.