



ВЛИЯНИЕ ФАЗОВОГО ПЕРЕХОДА ПОЛИ-*N*-ИЗОПРОПИЛАКРИЛАМИДНОГО ГЕЛЯ В СМЕСИ ВОДА/ДИМЕТИЛСУЛЬФОКСИД НА КИНЕТИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ИММОБИЛИЗОВАННОГО α -ХИМОТРИПСИНА

© 1999 г. Н. Л. Еремеев[#], Е. А. Беляева, Н. Ф. Казанская

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
химический факультет, 119899, Москва, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 04.11.98 г. Принята к печати 29.12.98 г.

Изучены кинетические закономерности функционирования α -химотрипсина, иммобилизованного в коллапсирующем поли-*N*-изопропилакриламидном геле, в смеси вода/диметилсульфоксид. Показано, что при содержании органического растворителя в смеси до 30% нативный и иммобилизованный фермент демонстрируют сходное поведение, формально описываемое схемой неконкурентного ингибирования; в то же время иммобилизация α -химотрипсина в аналогичной по составу неколлапсирующей полиакриламидной матрице стабилизирует кинетические характеристики фермента вплоть до 45%-го содержания в смеси диметилсульфоксида. На основании анализа кинетического поведения нативного и иммобилизованных препаратов фермента выдвинуто предположение о возможном взаимодействии полимерных цепей поли-*N*-изопропилакриламида с белковой глобулой α -химотрипсина при повышении содержания органического растворителя в смеси.

Ключевые слова: поли-*N*-изопропилакриламид; фазовый переход; водно-органическая среда; α -химотрипсин; иммобилизация; ферментативная активность.

Изучение функционирования ферментов в водно-органических смесях является весьма важной задачей как с прикладной, так и с фундаментальной точки зрения. Несмотря на то, что исследования в этой области ведутся уже достаточно давно [1], до сих пор не существует однозначного толкования механизмов влияния органических растворителей на структуру и функцию ферментов. Ряд авторов полагает, что замещение воды в гидратной оболочке белковой глобулы на молекулы органического растворителя приводит к ее структурным изменениям [2–4]; другие, наоборот, считают, что такие взаимодействия лишают белок конформационной подвижности [5–7].

В этой связи весьма любопытным выглядит исследование кинетического поведения ферментов при изменении гидрофильно-гидрофобного баланса матрицы, в которой они иммобилизованы. Известно, что фазовый переход в коллапсирующих стимулчувствительных гелях (визуально выражающийся в скачкообразном уменьшении

объема препарата при достижении некоторой критической интенсивности стимула) обусловлен именно изменением гидрофильно-гидрофобного баланса полимерных цепей, образующих гель [8, 9]. Движущей силой процесса является тот факт, что в определенных условиях контакты “полимер–вода” становятся энергетически менее выгодными, нежели контакты “полимер–полимер” [10, 11]. Вытеснение воды из сольватной оболочки полимера в результате гидрофобных взаимодействий полимерных звеньев и приводит к коллапсу матрицы. Этот процесс, в частности, может происходить в изотермических условиях при увеличении концентрации органического растворителя в системе [12, 13]. Таким образом, при иммобилизации ферментов в таких полимерах можно ожидать стабилизирующего эффекта матрицы на активность препаратов в водно-органической среде, однако остается открытым вопрос о влиянии изменения степени гидрофобности матрицы на наблюдаемую активность иммобилизованного в ней биокатализатора.

Цель настоящей работы – изучение кинетического поведения α -химотрипсина, ковалентно иммобилизованного в коллапсирующем поли-*N*-изопропилакриламидном геле, при фазовом переходе матрицы в смеси вода/диметилсульфоксид.

Сокращения: IPAA – *N*-изопропилакриламид; AA – акриламид; poly(IPAA)-гель – поли-*N*-изопропилакриламидный гель; poly(AA)-гель – полиакриламидный гель; АТФЕ – этиловый эфир *N*-ацетил-*L*-тирозина.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 939-34-17; факс: (095) 939-35-89; e-mail: eremeev@enzyme.chem.msu.ru).

Для того, чтобы выявить влияние собственно коллапса матрицы на наблюдаемую кинетическую картину (поскольку на нее влияет как изменение концентрации органического растворителя в смеси, так и способ иммобилизации), было проведено сравнительное исследование нативного и ковалентно иммобилизованного в неколлапсирующем полиакриламидном геле α -химотрипсина в таких же условиях.

В первую очередь было изучено влияние иммобилизации и концентрации органического растворителя на pH-профили ферментативной активности для нативного и иммобилизованного в poly(IPAA)-геле α -химотрипсина (рис. 1). Видно, что pH-оптимум иммобилизованного α -химотрипсина смещается в щелочную область относительно оптимума нативного фермента. Такое смещение обусловлено локальным понижением pH внутри полимерной сетки за счет накопления продукта ферментативной реакции [14, 15]. Положение pH-оптимума как для нативного, так и для иммобилизованного фермента не зависит от содержания DMSO в системе в исследованном интервале концентраций, однако для обеих форм фермента с увеличением концентрации органического растворителя уменьшается наблюдаемая ферментативная активность и pH-профиль становится более плоским. В дальнейшем каталитические свойства нативного и иммобилизованного α -химотрипсина изучали в pH-оптимумах их действия – при pH 8.0 и 9.5 соответственно.

В отдельных экспериментах было продемонстрировано, что препараты иммобилизованного α -химотрипсина полностью восстанавливают свою исходную активность при перенесении из водно-органической в водную среду, причем многократное перемещение препарата из одной среды в другую не влияет на уровень наблюдаемой в конкретных условиях ферментативной активности. Это свидетельствует о том, что инактивация иммобилизованного фермента под действием органического растворителя обратима. Было также показано, что активность иммобилизованного фермента в водно-органических смесях остается постоянной в течение по крайней мере пяти часов инкубации.

Из кривых набухания ферментсодержащих полимерных матриц в условиях pH-оптимума действия иммобилизованного α -химотрипсина (рис. 2) видно, что poly(IPAA)-гель коллапсирует при содержании DMSO в смеси 40%*. Для неколлапсирующего poly(AA)-геля наблюдается некоторое уменьшение степени набухания при увеличении концентрации DMSO в системе до 40%, которое может быть трактовано как начало чрезвычайно размытого фазового перехода. Такое поведение

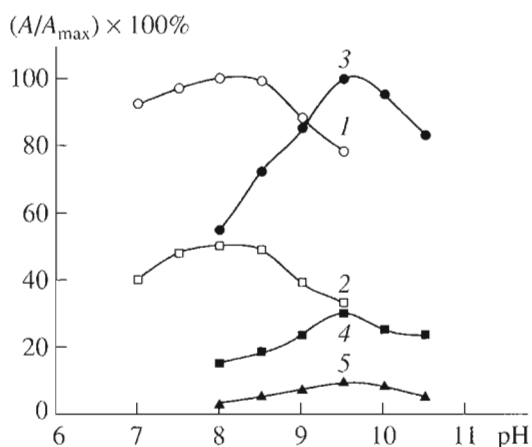


Рис. 1. pH-Зависимости ферментативной активности нативного (1, 2) и иммобилизованного в poly(IPAA)-геле (3–5) α -химотрипсина. Условия определения: 20°C, 0.2 М NaCl, 0.02 М CaCl₂, [ATEE] 5×10^{-3} М, [DMSO] 0 (1, 3); 30 (2, 4); 50% (5).

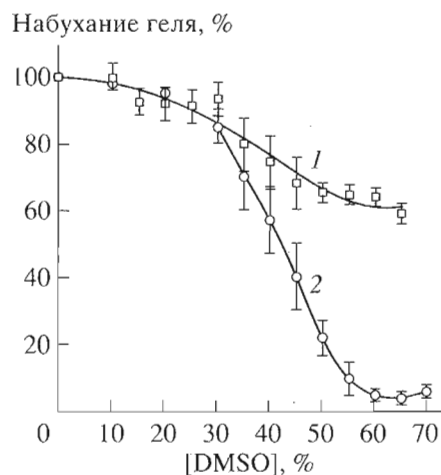


Рис. 2. Кривые набухания poly(AA)- (1) и poly(IPAA)- (2) гелей. Условия определения: 20°C, pH 9.5, 0.2 М NaCl, 0.02 М CaCl₂.

наблюдается у слабоионизованных и сильноосищенных гелей, аналогичных использованным в работе [12]. Тем не менее наблюдаемый фазовый переход в poly(AA)-геле (если он и существует) незначителен, и poly(AA)-матрица может считаться неколлапсирующей по сравнению с poly(IPAA)-матрицей.

Данные по изменению параметров уравнения Михаэлиса–Ментен в зависимости от концентрации органического растворителя в смеси для нативного фермента и его иммобилизованных препаратов представлены на рис. 3 и 4. В случае нативного α -химотрипсина наблюдается значительное снижение относительной максимальной скорости реакции (рис. 3, 1), причем, как показано на рис. 4 (кривая 1), константа Михаэлиса остается посто-

* Здесь и далее содержание DMSO в смеси приведено в процентах по объему.

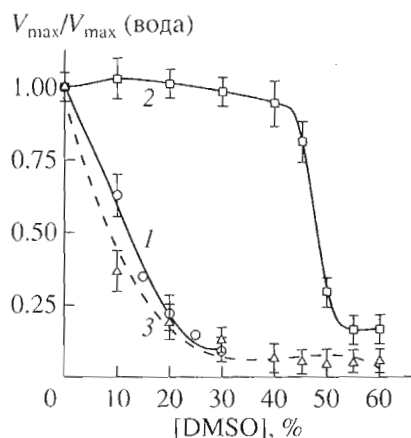


Рис. 3. Зависимость относительных максимальных скоростей реакции от концентрации DMSO в среде для гидролиза АТЭЕ нативным (1) и иммобилизованным в poly(AA)- (2) и в poly(IPAA)-геле (3) α -химотрипсином в pH-оптимумах активности препаратов. Условия определения: 20°C, 0.2 М NaCl, 0.02 М CaCl₂.

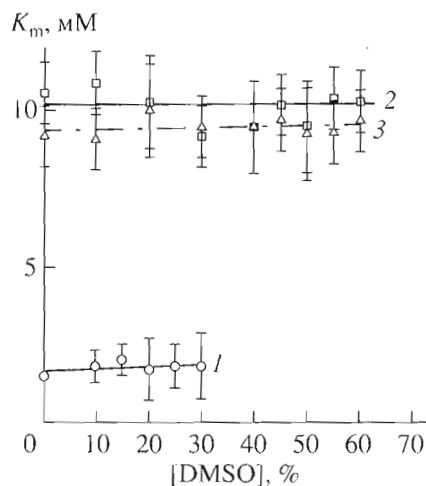


Рис. 4. Зависимость константы Михаэлиса от концентрации DMSO в среде для гидролиза АТЭЕ нативным (1) и иммобилизованным в poly(AA)- (2) и в poly(IPAA)-геле (3) α -химотрипсином в pH-оптимумах активности препаратов. Условия определения: 20°C, 0.2 М NaCl, 0.02 М CaCl₂.

янной в области концентраций DMSO < 30%, что соответствует схеме неконкурентного ингибирования.

В то же время картина кинетического поведения фермента, иммобилизованного в неколлапсирующем poly(AA)-геле, опровергает предположение о том, что DMSO является ингибитором ферментативной реакции. Как видно из рис. 3 (кривая 2), значение относительной максимальной скорости реакции для этого препарата не изменяется в широком интервале концентраций DMSO, показывая, что реальное ингибирование отсутствует. Отсутствие резкого падения актив-

ности в области низких концентраций DMSO (меньше 20%) можно объяснить стабилизацией фермента при многоточечном связывании с носителем. Таким образом, иммобилизация α -химотрипсина в poly(AA)-геле увеличивает, по-видимому, конформационную стабильность фермента по отношению к воздействию органического растворителя. Представленные результаты свидетельствуют о том, что вид зависимости максимальной скорости реакции от концентрации органического растворителя для нативного фермента обусловлен конформационными изменениями белковой глобулы, протекающими в результате ее взаимодействия с DMSO.

Следует отметить, что при использовании субстратов α -химотрипсина, для которых скорость-лимитирующая стадия – образование ацилфермента [2–4], величина максимальной скорости ферментативной реакции остается постоянной до достижения некоторой пороговой концентрации органического растворителя, после которой происходит резкое падение каталитической активности (для системы α -химотрипсин/вода/DMSO такая пороговая концентрация составляет 4.2 М или около 30% [4]). Авторы объясняют этот эффект замещением критического числа молекул воды в гидратной оболочке белковой глобулы, что вызывает большие конформационные перестройки в молекуле биокатализатора, приводящие к резкой потере активности ферментом. В то же время при использовании эфирных субстратов (для которых скорость-лимитирующей стадией является деацилирование) уже при достаточно невысоких концентрациях органического растворителя (в том числе DMSO) наблюдается значительное падение ферментативной активности [16, 17]. Подобное различие в наблюдаемом кинетическом поведении одного и того же фермента при использовании разных субстратов, возможно, связано с самим механизмом катализа. Для нормального прохождения стадии деацилирования необходима правильная координация молекулы воды и достаточная подвижность аминокислотных остатков в активном центре фермента [18] (известно, что удаление воды путем лиофилизации, приводящее к неправильной координации молекулы воды в активном центре α -химотрипсина, резко замедляет процесс деацилирования [19]). В то же время другие исследователи считают, что замещение молекул воды в сольватной оболочке белка на молекулы органического растворителя может заметно уменьшать конформационную подвижность фермента [7]. Тогда можно предположить, что встраивание молекулы органического растворителя в белковую глобулу неподалеку от активного центра α -химотрипсина (как показано, например, в работе [20]) способно локально влиять на подвижность аминокислотных остатков и/или приводить к неправильной координации молеку-

лы воды в активном центре фермента, т.е. влиять исключительно на стадию деацилирования. Многоточечная же ковалентная иммобилизация фермента исходно приводит к напряженному состоянию белковой глобулы (специфичность α -химотрипсина, ковалентно иммобилизованного в акриламидных гелях, заметно ухудшается [21]) и, поэтому, предотвращает локальные конформационные изменения, что и проявляется в виде стабилизационных эффектов [22].

Поскольку в области 0–20% степень набухания poly(IPAA) -геля практически не меняется (рис. 2), можно было бы ожидать постоянства кинетических характеристик иммобилизованного в этой матрице фермента по сравнению с нативным. В то же время (рис. 3), значения максимальной скорости для poly(IPAA) -препарата уже в тех концентрациях DMSO, где еще не наблюдается коллапса матрицы, падают по закону, внешне практически неотличимому от аналогичной закономерности для нативного фермента. При этом, как видно из рис. 4, значение константы Михаэлиса для обоих иммобилизованных препаратов постоянно на всем интервале использованных концентраций органического растворителя. Таким образом, на взаимодействие фермента с субстратом не влияет ни тип матрицы, ни ее состояние.

Подобные факты позволяют предположить, что причины падения максимальной скорости реакции для нативного фермента и фермента, иммобилизованного в poly(IPAA) -геле, имеют сходный характер, т.е. заключаются в неких конформационных изменениях белковой глобулы как в одном, так и в другом случае.

Можно полагать, что poly(IPAA) -гель не способен должным образом стабилизировать каталитически активную конформацию α -химотрипсина, как это происходит в poly(AA) -матрице. Однако структуры использованных матриц настолько схожи между собой, что более значимым объяснением нам представляется возможность локальных взаимодействий между полимерными цепями poly(IPAA) -геля и белковой глобулы аналогично взаимодействиям фермент/DMSO при изменении гидрофильно-гидрофобного баланса полимера под действием органического растворителя.

Действительно, как уже было сказано выше, считается, что увеличение концентрации органического растворителя в системе влечет за собой замену молекул воды в сольватной оболочке белка на молекулы органического растворителя, т.е. взаимодействия белок–органический растворитель более выгодны, чем белок–вода. С другой стороны, наличие “интегральной воды” в молекуле белка – необходимое условие как для поддержания его нативной структуры, так и для сохранения ее пластичности и подвижности, существенной для проявления каталитической активности. Органи-

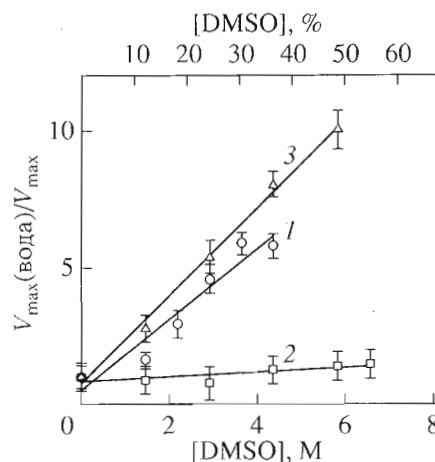


Рис. 5. Анализ данных рис. 3 по схеме неконкурентного ингибирования. 1 – нативный α -химотрипсин, 2 – α -химотрипсин, иммобилизованный в poly(AA) -геле, 3 – α -химотрипсин, иммобилизованный в poly(IPAA) -геле.

ческие растворители, в свою очередь, являются худшими пластификаторами для ферментов, лишая их необходимой конформационной подвижности. Возможно, что взаимодействия полимер–белок неким образом моделируют взаимодействия белок–DMSO. Если взаимодействия poly(IPAA) с белком при повышении гидрофобности полимера становятся более энергетически выгодными, чем взаимодействие α -химотрипсин–вода, то можно предположить, что полимер, аналогично DMSO, “ужесточает” конформацию фермента (локально взаимодействуя с его активным центром) до такой степени, что лишает ее конформационной подвижности, необходимой для прохождения каталитической реакции. Возможно, что при малых концентрациях DMSO такие взаимодействия происходят опосредованно через молекулы органического растворителя, связывающиеся с полимерными цепями poly(IPAA) -матрицы. Указание на возможность подобных взаимодействий между молекулами растворителя и полимерными цепями встречается в литературе [13].

Подобная гипотеза о возможности локальных взаимодействий между полимерными цепями poly(IPAA) -геля и белковой глобулы, аналогично взаимодействиям фермент–DMSO, находит косвенное подтверждение при формальном анализе максимальных скоростей реакции, исходя из схемы неконкурентного ингибирования (рис. 5).

Несмотря на то, что реальный механизм ингибирования не реализуется, рассмотрение кинетических данных для нативного фермента с этой точки зрения показывает, что для нативного фермента в области постоянства значений константы Михаэлиса (для концентраций DMSO ниже 30%, рис. 4) вид зависимостей формально соответству-

ет неконкурентному типу ингибирования с константой ингибирования 0.5 ± 0.05 М. При дальнейшем увеличении концентрации DMSO наблюдается отсутствие каких-либо корреляций. По литературным данным [4], именно при этих концентрациях DMSO происходят резкие конформационные изменения молекулы α -химотрипсина.

В случае poly(IPAA)-препарата в том интервале концентраций DMSO, в котором стабилен иммобилизованный в poly(AA)-геле фермент (рис. 3 и 5), наблюдаются те же закономерности, что и для нативного фермента (аналогичный вид зависимости и константа ингибирования). Это показывает сходство механизмов падения активности нативного химотрипсина и химотрипсина, иммобилизованного в poly(IPAA)-геле, в смеси вода-DMSO и косвенно подтверждает предположение о возможности взаимодействия полимерных цепей poly(IPAA)-матрицы с иммобилизованным в ней ферментом.

Таким образом, полученные в работе данные не дают однозначного ответа на вопрос о влиянии собственно коллапса стимулчувствительной матрицы (т.е. резкого изменения ее объема) на кинетическое поведение иммобилизованного в ней фермента. Конечно, если вернуться к кривой набухания полимерных препаратов, можно обратить внимание на то, что концентрация DMSO, при которой происходит исчезновение корреляций ингибирования для α -химотрипсина, иммобилизованного в poly(IPAA)-геле (рис. 5), соответствует концентрации DMSO, отвечающей потере половины веса poly(IPAA)-матрицы (рис. 2). Однако для фермента, иммобилизованного в неколлапсирующем poly(AA)-геле, аналогичный излом наблюдается при той же концентрации DMSO (рис. 5). Таким образом, нельзя исключить, что в области относительно высоких концентраций DMSO (>40%) многоточечное связывание белка с носителем уже не способно должным образом стабилизировать фермент против конформационных изменений под действием органического растворителя.

Суммируя вышесказанное, можно предположить, что органический растворитель, изменяя подвижность аминокислотных остатков в активном центре фермента, влияет на стадию деацилирования, что и проявляется в виде резкого падения ферментативной активности по эфирному субстрату уже при небольших концентрациях DMSO. Поскольку кинетические закономерности поведения нативного и иммобилизованного в poly(IPAA)-геле α -химотрипсина в смеси вода/DMSO одинаковы, возможно существование сходных взаимодействий между белком с одной стороны и DMSO и цепей стимулчувствительного полимера с другой стороны. Если действительно

взаимодействия poly(IPAA) с белком при повышении гидрофобности полимера становятся более энергетически выгодными, чем взаимодействие α -химотрипсин-вода, то можно предположить, что полимер, аналогично DMSO, лишает фермент конформационной подвижности (локально взаимодействуя с его активным центром), необходимой для прохождения реакции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В экспериментах использовали кристаллический α -химотрипсин марки А производства Ленинградского мясокомбината им. С.М. Кирова; акриламид (AA), *N,N'*-метилден-бисакриламид (МВА), *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЭД), персульфат аммония производства фирмы "Reanal"; этиловый эфир *N*-ацетил-*L*-тирозина (АТЭЕ) производства фирмы BDH (Англия); диметилсульфоксид (DMSO) производства фирмы "Адамантан" (Россия); акрилоилхлорид производства фирмы "Merck" (Германия). *N*-Изопропилакриламид (IPAA) синтезирован в нашей лаборатории по методике [23].

Препараты иммобилизованного α -химотрипсина получали по методике, описанной в [24]. К 5.5 мл 2×10^{-4} М раствора α -химотрипсина (0.1 М ацетатно-аммиачный буфер, содержащий 0.05 М CaCl_2 , pH 8.0) при 0°C и перемешивании прибавляли три порции акрилоилхлорида по 10 мкл с интервалом в 15 мин и инкубировали при комнатной температуре еще 30 мин. К 1 мл полученного акрилоилхимотрипсина добавляли мономеры (IPAA или AA, 0.2 г), сшивающий агент (МВА, 0.36 г), вводили инициаторы (0.02 мл водного 0.78 М раствора персульфата аммония и 0.01 мл ТЕМЭД) и проводили сополимеризацию в блоке. Для измерения активности полученный блок-сополимер измельчали в гомогенизаторе до частиц размером 20–150 мкм; для измерения степени набухания образцы нарезали на пластины $10 \times 2 \times 5$ мм. Гель отмывали солевым раствором (0.2 М NaCl + 0.02 М CaCl_2) до полного отсутствия ферментативной активности в промывных водах.

Определение ферментативной активности. Активность нативного и иммобилизованного α -химотрипсина определяли по начальной скорости гидролиза АТЭЕ в термостатируемой ячейке (20°C) потенциометрическим методом на pH-стате марки RTS822 (Radiometer, Дания). Объем ячейки 5 мл, ионная сила создавалась 0.2 М NaCl и 0.02 М CaCl_2 . Концентрацию субстрата варьировали от 2.5×10^{-3} до 10^{-2} М. Максимальные скорости реакций и константы Михаэлиса для реакции гидролиза АТЭЕ нативным и иммобилизованным α -химотрипсином определяли из зависимостей начальных скоростей гидролиза от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка.

Определение степени набухания геля. Уравновешивание геля в смеси вода/DMSO проводили в термостатируемой ячейке (20°C) в течение 1 сут. Степень набухания определяли как процентное отношение веса геля после инкубации к весу геля в водной среде.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 98-03-32204а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Singer S.J. // *Adv. Prot. Chem.* 1962. V. 15. P. 168–175.
2. Родионова М.В., Белова А.Б., Можяев В.В., Мартинек К., Березин И.В. // *ДАН СССР. Сер. Физ. химия.* 1987. Т. 292. С. 913–917.
3. Mozhaev V.V., Khmel'nitsky Yu.L., Sergeeva M.V., Belova A.B., Klyachko N.L., Levashov A.V., Martinek K. // *Eur. J. Biochem.* 1989. V. 184. P. 597–602.
4. Белова А.Б., Можяев В.В., Левашов А.В., Сергеева М.В., Мартинек К., Хмельницкий Ю.Л. // *Биохимия.* 1991. Т. 56. С. 1923–1945.
5. Zheng Y.-J., Ornstein R.L. // *Biopolymers.* 1996. V. 38. P. 791–799.
6. Пожарский Э.В., Зенченко Т.А. // *Мол. биофизика.* 1998. Т. 43. С. 31–34.
7. Klivanov A.M. // *Trends in Biochem. Tech.* 1997. V. 15. P. 97–101.
8. Dusek K., Patterson D. // *J. Polym. Sci.* 1968. V. 6. P. 1209–1216.
9. Li Y., Tanaka T. // *Annu. Rev. Mater. Sci.* 1992. V. 22. P. 243–277.
10. Matsuyama A., Tanaka T. // *Phys. Rev. Lett.* 1990. V. 65. P. 341–344.
11. Тагер А.А., Сафронов А.П., Березюк Е.А., Галаев И.Ю. // *Высокомолекуляр. соед. Сер. Б.* 1991. Т. 33. С. 572–577.
12. Hirokawa Y., Tanaka T. // *J. Chem. Phys.* 1984. V. 81. P. 6379–6380.
13. Katayama S., Hirokawa Y., Tanaka T. // *Macromolecules.* 1984. V. 17. P. 2657–2663.
14. Bailey J.E., Chow M.T.C. // *Biotechnol. Bioeng.* 1974. V. 16. P. 1345–1357.
15. McLaren A.D., Esterman E.F. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1957. V. 68. P. 157–168.
16. Seydoux F., Yon J., Nemethy G. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1969. V. 171. P. 145–156.
17. Moresoli Ch., Zaza Ph., Flaschel E., Renkel A. // *Biocatalysis.* 1992. V. 5. P. 203–211.
18. Henderson R. // *J. Mol. Biol.* 1970. V. 54. P. 341–346.
19. Хургин Ю.И., Маскарева Е.Ю. // *Биоорганическая химия.* 1991. Т. 17. С. 76–80.
20. Колодзейская М.В., Верева С.В. // *Укр. биохим. ж.* 1990. Т. 62. С. 3–14.
21. Лукашева Е.В., Айсина Р.Б., Казанская Н.Ф., Еремеев Н.Л. // *Биохимия.* 1980. Т. 45. С. 449–454.
22. Klivanov A.M. // *Anal. Biochem.* 1979. V. 93. P. 1–25.
23. Plaut H., Ritter J.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 1951. V. 73. P. 4076–4077.
24. Сиголаева Л.В., Еремеев Н.Л., Казанская Н.Ф. // *Биоорганическая химия.* 1994. Т. 20. С. 268–273.

α -Chymotrypsin Immobilized in Poly-*N*-isopropylacrylamide Gel: Kinetic Regularities of Functioning under the Phase Transition of the Gel in Aqueous Dimethyl Sulfoxide

N. L. Ereemeev[#], E. A. Belyaeva, and N. F. Kazanskaya

Faculty of Chemistry, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia

Enzymic kinetics in aqueous DMSO was studied for α -chymotrypsin immobilized in collapsing poly-*N*-isopropylacrylamide gel. Up to a 30% concentration of DMSO, the native and immobilized enzymes demonstrated similar kinetics formally described by the scheme of noncompetitive inhibition. At the same time, α -chymotrypsin immobilized in a noncollapsing polyacrylamide matrix of a similar composition displayed stable kinetic parameters up to a 45% concentration of DMSO. The analysis of kinetic regularities for native and immobilized preparations of the enzyme allowed us to suggest that the polymeric chains of poly-*N*-isopropylacrylamide probably interact with the protein globule of α -chymotrypsin at increased concentrations of organic solvent.

Key words: α -chymotrypsin, enzymic activity, immobilization, phase transition, poly-*N*-isopropylacrylamide, water-organic solvent medium

[#] To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 939-3417; fax: +7 (095) 939-3589; e-mail: ereemeev@enzyme.chem.msu.ru.