



УДК 541.18+542.06+542.97+542.98+577.15.02

КАТАЛИЗ ФЕРМЕНТАМИ, ВКЛЮЧЕННЫМИ В ОБРАЩЕННЫЕ МИЦЕЛЛЫ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, В ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЯХ

2. НЕОРГАНИЧЕСКАЯ ПИРОФОСФАТАЗА ИЗ ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ, СОЛЮБИЛИЗИРОВАННАЯ В ЦИКЛОГЕКСАНЕ С ПОМОЩЬЮ БРИДЖА 56 *

*Глячко Н. Л., Байков А. А., Леващов А. В.,
Мартишек К., Аваева С. М.*

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Исследованы каталитические свойства неорганической пирофосфатазы из пекарских дрожжей в обращенных мицеллах бриджа 56 в циклогексане. Показано, что активность фермента существенно зависит от количества солиобилизированной системой воды, достигая в оптимуме (3,7% воды в системе) значения каталитической активности, проявляемой этим ферментом в водном растворе. Обнаружена повышенная по сравнению с водными растворами стабильность пирофосфатазы в системе бридж 56 — вода — циклогексан при низком содержании воды (~1%). Изученная система может представлять интерес как модель действия ферментов *in vivo* и иметь важное значение при исследовании роли воды, входящей в структуру биомембран и активных центров ферментов.

Исследования структуры и функции ферментов в системах обращенных мицелл поверхностно-активных веществ (ПАВ) в органических растворителях представляют собой новое перспективное направление химической энзимологии. Свидетельством этому служит все возрастающее количество публикаций работ, выполненных в этой области [1—6]. Чем же примечательны системы обращенных мицелл ПАВ в органических растворителях и какие надежды возлагают на них энзимологи? Прежде всего напомним, что термин «обращенные мицеллы» применяют к ассоциатам ПАВ в органических растворителях, строящимся так, что полярные (ионные) группы, входящие в молекулу ПАВ, образуют ядро ассоциата, а углеводородные фрагменты — внешний слой. Наличие полярного ядра обуславливает способность обращенных мицелл солиобилизовать ионы, полярные органические вещества, воду, а также ферменты [2]. Размеры обращенных мицелл при солиобилизации ими воды и макромолекул ферментов увеличиваются, по-видимому, от нескольких десятков до сотен Å, ** но, несмотря на это, системы обращенных мицелл в органических растворите-

* Предыдущее сообщение см. [1].

** К настоящему времени в литературе нет исчерпывающих данных о форме и размерах обращенных мицелл ПАВ в органических растворителях, содержащих солиобилизованные ферменты. Проведенное нами изучение светорассеяния, рассеяния рентгеновских лучей под малыми углами и седиментации систем аэрозоль ОТ — вода — октан, содержащих α-химотрипсин, позволяет заключить, что радиус частиц не превышает 100 Å.

лях с солиобилизованными в них значительными количествами воды и ферментов остаются оптически однородными и прозрачными, и это немаловажно.

Основные причины, вызывающие повышенный интерес к системам обращенных мицелл ПАВ в органических растворителях, заключены главным образом в следующем. Во-первых, ферменты, солиобилизованные с помощью ПАВ в органических растворителях, находятся в среде, отличающейся от водного раствора [7, 8] и сходной, по природе и свойствам со средой, в которой функционирует большинство ферментов *in vivo*, в биомембранах. Таким образом, системы обращенных мицелл представляют немалый интерес как модели мембран. Во-вторых, количество солиобилизованной воды в рассматриваемых системах можно строго дозировать. Это открывает новые возможности для изучения роли воды в структуре белков и механизме ферментативного катализа, особенно тех процессов, где вода — химический реагент. В-третьих, системы обращенных мицелл с включенными в них ферментами могут составить основу целого ряда методов изучения механизмов ферментативного катализа, в частности методов обнаружения и исследования промежуточных соединений, лабильных в водных растворах при обычных условиях эксперимента. В-четвертых, системы обращенных мицелл в органических растворителях представляют собой один из вариантов микрогетерогенной двухфазной системы, успешно использующейся в настоящее время [9—11] для решения целого ряда теоретических и прикладных задач, в первую очередь задач органического синтеза, катализируемого ферментами.

Начало исследованиям катализа ферментами, солиобилизованными обращенными мицеллами ПАВ в органических растворителях, было положено нашими работами [2]. Мы показали, что с помощью ПАВ различной химической природы, таких, как аэрозоль ОТ (анионное ПАВ), бромистый цетилтриметиламмоний (катионное ПАВ) и бридж 56 (неионное ПАВ), можно солиобилизовать в углеводородах до достаточно высоких концентраций (сопоставимых по величине с обычно используемыми в водных растворах) ферменты различных классов: протеолитические (α -химотрипсин, трипсин и эластаза), окислительно-восстановительные (пероксидаза и лактадегидрогеназа), трансферазы (пируваткиназа), причем солиобилизуемые таким образом ферменты сохраняют каталитическую активность и субстратную специфичность [1]. Кроме перечисленных ферментов были исследованы каталаза [6], цитохром P₄₅₀ [6] и рибонуклеаза [4]. Как видно, перечисленные выше ферменты, сохраняющие каталитическую активность в системах обращенных мицелл ПАВ в органических растворителях, не представляют всех основных групп ферментов. Однако мы считаем важным не столько дальнейшее расширение круга изученных ферментов, сколько выяснение возможности функционирования в системах обращенных мицелл ПАВ в органических растворителях таких ферментов, чья значимость, ключевое положение в биохимических процессах привлекают в настоящее время наибольшее внимание, в частности осуществляющих энергетические процессы в биомембранах, но не окислительно-восстановительных ферментов, а гидролитических (таких, как АТР-азы и пирофосфатаза), поскольку для этих ферментов вода — химический реагент.

В настоящей работе мы остановили свой выбор на пирофосфатазе из пекарских дрожжей, так как этот фермент доступен в очищенном виде и его каталитические свойства в водном растворе достаточно хорошо известны [12]. Этот фермент катализирует гидролиз и синтез фосфоалгидридной связи в пирофосфате и принадлежит к тому же типу, что и мембранные АТР-азы. Пирофосфатаза из пекарских дрожжей, использованная нами, представляет собой белок с $M \sim 65\,000$ и состоит из двух идентичных субъединиц [13—16]. Для проявления ее каталитической активности необходимо присутствие ионов Mg^{2+} , которые активируют как фермент, так и субстрат, образуя с ними комплексы [17]. Основной целью данного

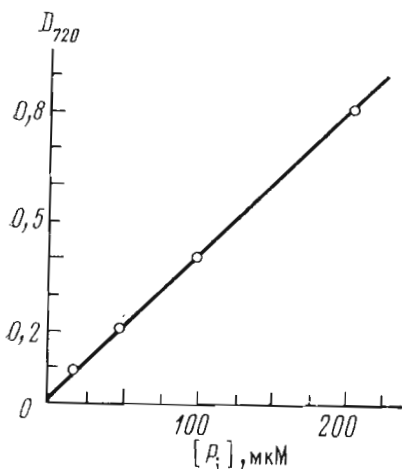


Рис. 1

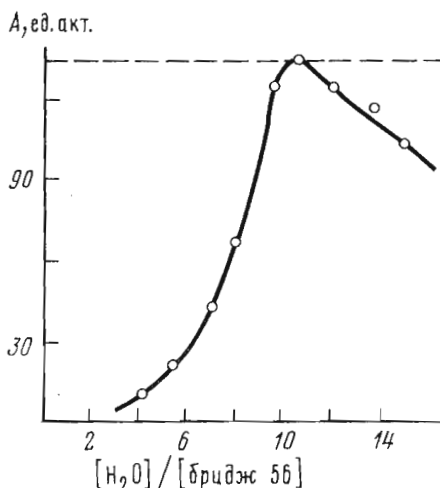


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость поглощения фосфоро-молибдатного комплекса при 720 нм от концентрации неорганического фосфата в системе 0,2 М бридж 56 — буфер А — циклогексан. Условия — см. «Эксперимент. часть», $[H_2O]/[б\text{ридж } 56]=10$ (моль/моль)

Рис. 2. Зависимость удельной активности пирофосфатазы (0,05 мкг/мл) от содержания воды, солюбилизированной в системе 0,2 М бридж 56 — буфер А — циклогексан. $[PP_i]$ 0,1 мМ. Для сравнения приведено значение удельной активности, проявляемое ферментом в буфере А в отсутствие ПАВ и органического растворителя (пунктир)

исследования являлось изучение каталитических свойств пирофосфатазы, солюбилизированной в циклогексане с помощью неионного ПАВ, цетилполи(10)оксиэтиленгликоля (бридж 56), при варьировании в этой системе содержания воды.

Разработка метода определения неорганического фосфата (P_i) в системах бридж 56 — вода — циклогексан. Кинетическое исследование действия пирофосфатазы требует надежного метода определения неорганического фосфата — единственного продукта гидролиза пирофосфата. В литературе известен целый ряд таких методов, на практике же главным образом используют методы, основанные на реакциях фосфоро-молибдатных комплексов (см. краткий обзор методов в работе [18]), а также предлагаются ферментативные методы, которые используют системы из нескольких ферментов, катализирующих цепь химических превращений с участием в качестве одного из субстратов неорганического фосфата [19, 20]. Однако все эти методы предназначаются для анализа водных растворов и в оригинальном виде оказались непригодными для определения неорганического фосфата в исследуемой нами системе бридж 56 — вода — циклогексан, в первую очередь вследствие образования непрозрачных эмульсий. Возникшие затруднения были нами преодолены путем модификации метода [21], основанного на восстановлении фосфоро-молибдатного комплекса хлоридом олова (II). Используя в качестве реакционной среды смесь изобутилового и этилового спиртов, мы добились образования стабильного окрашенного комплекса в оптически прозрачной системе (подробно см. «Экспериментальную часть»). На рис. 1 представлена зависимость поглощения образующегося комплекса от концентрации введенного в систему неорганического фосфата (10—200 мкМ), которую мы использовали в дальнейших экспериментах как калибровочную, дополнительно убедившись, что ни пирофосфат, ни пирофосфатаза не мешают определению неорганического фосфата в системе бридж 56 — вода — циклогексан.

Гидролиз пирофосфата, катализируемый пирофосфатазой, солюбилизированной обращенными мицеллами бридж 56 в циклогексане. Прежде все-

го мы убедились, что пирофосфатаза, солюбилизированная в циклогексане с помощью бридж 56, сохраняет свою каталитическую активность в отношении гидролиза пирофосфата, причем нами было отмечено, что в отсутствие пирофосфатазы образования неорганического фосфата из пирофосфата в системе обращенных мицелл практически не происходит. Величины начальной стационарной скорости образования P_i при условии $[S]_0 \gg [E]_0$ прямо пропорциональны концентрации фермента в диапазоне 0,3–3 нМ, который мы использовали в дальнейшей работе. Варьирование концентрации субстрата (пирофосфата) от 20 до 100 мкМ практически не влияло на определяемую величину начальной скорости реакции, что в рамках уравнения Михаэлиса — Ментен свидетельствует о достижении режима насыщения фермента субстратом*, т. е. режима максимальной скорости реакции. V. Кишечный режим реакции ферментативного гидролиза пирофосфата не изменяется при варьировании содержания воды в системе бридж 56 — вода — циклогексан, поэтому в дальнейшем мы будем рассматривать эту реакцию с точки зрения величины ее кинетического параметра V.

Зависимость максимальной скорости реакции гидролиза пирофосфата, катализируемого пирофосфатазой, солюбилизированной в системе бридж 56 — вода — циклогексан, от содержания воды. С увеличением гидратации системы скорость ферментативной реакции сначала возрастает, а затем начинает понижаться (рис. 2). Следует допустить, что вводимая в систему вода распределяется между молекулами ПАВ и фермента, причем недостаточно гидратированный фермент проявляет пониженную каталитическую активность. По мере увеличения содержания воды в исследуемой системе величина максимальной скорости ферментативной реакции возрастает, достигая значения, характеризующего кинетику протекания реакции при аналогичных условиях в водном растворе. По-видимому, можно полагать, что степень гидратации пирофосфатазы в условиях оптимума ее каталитической активности в системе бридж 56 — вода — циклогексан (при содержании воды 4%) соответствует гидратации фермента в водном растворе. Снижение эффективности катализа пирофосфатазой при более высоком содержании воды в системе следует, по-видимому, отнести на счет структурных перестроек мицелл (в пользу этого предположения могут свидетельствовать изменения физических свойств системы, происходящие в этой области гидратации [8, 23]). Необходимо отметить, что аналогичный характер зависимости каталитической активности от содержания воды в системе бридж 56 — вода — циклогексан был нами обнаружен и в случае другого фермента — лактатдегидрогеназы (см. следующее сообщение). А так как лактатдегидрогеназа не является гидролитическим ферментом, то можно полагать, что наблюдаемая на рис. 2 зависимость является неспецифической для пирофосфатазы и отражает эффект гидратации всей белковой глобулы на каталитическую активность фермента.

Изучение интегрального режима реакции, катализируемой пирофосфатазой, солюбилизированной в системе бридж 56 — вода — циклогексан. Равновесие в реакции $PP_i \rightleftharpoons 2P_i$ в водном растворе характеризуется величиной константы порядка 10^4 М [24], что обеспечивает практически 100% превращение пирофосфата в неорганический фосфат. Нам представлялось важным проанализировать вопрос о положении равновесия в системе обращенных мицелл бриджа 56 в циклогексане. С этой целью мы изучили полноту химического превращения пирофосфата в неорганический фосфат при больших временах инкубации реакционной смеси (интегральный кинетический режим). Было найдено, что в условиях оптимальной гидрата-

* В аналогичных условиях в водном растворе скорость ферментативного гидролиза пирофосфата также практически не зависит от концентрации субстрата, поскольку K_m составляет величину порядка 10 мкМ [22].

ции пирофосфатазы (при содержании воды в системе 3—4%, см. рис. 2) реакция протекает полностью, т. е. весь пирофосфат превращается в неорганический фосфат. Однако уже относительно небольшое понижение содержания воды в системе (до ~1%) приводит к тому, что выход неорганического фосфата в реакции сокращается от 100 до 10—15%. Если этот результат свидетельствует о сдвиге равновесия в исследуемой реакции, то того же конечного состояния в системе можно достигнуть, исходя из продукта — неорганического фосфата. Однако мы убедились, что в этих условиях, т. е. при данной гидратации системы, свободный неорганический фосфат не подвергается химическому превращению ни в отсутствие, ни в присутствии пирофосфатазы. Таким образом, предположение о сдвиге равновесия в реакции $PP_i \rightleftharpoons P_i$ следует считать несостоятельным. Поэтому мы попытались дать другие объяснения фактам резкого снижения выхода фосфата из пирофосфата.

Поскольку проведение реакции до ее завершения требует значительного времени (около суток), в первую очередь возник вопрос, связанный со стабильностью пирофосфатазы. Известно, что пирофосфатаза в аналогичных условиях в водном растворе за сутки инактивируется на 75%, причем ПАВ, в частности неионные, оказывают также инактивирующее действие на фермент [25]. Таким образом, можно было бы допустить, что наблюдаемая нами остановка реакции в системах обращенных мицелл вызвана инактивацией фермента с полной потерей активности задолго до потенциального завершения реакции.

Однако мы обнаружили, что пирофосфатаза, включенная в обращенные мицеллы бриджа 56 в циклогексане, приобретает повышенную по сравнению с водными растворами стабильность. При низком содержании воды (0,5%) в системе бридж 56 — вода — циклогексан пирофосфатаза практически не теряет активности в течение 3 сут. Наоборот, инактивация фермента начинает проявляться при повышении содержания воды в исследуемой системе. Так, при содержании воды 4,5% падение активности пирофосфатазы за сутки составляет 40—50%, но и в этом случае фермент более стабилен, чем в водном растворе.

Для объяснения описанного выше факта прекращения реакции гидролиза пирофосфата можно было бы также допустить, что фермент инактивируется в процессе функционирования, например, под действием промежуточных соединений и/или продукта. Это предположение опровергает следующий эксперимент: после прекращения реакции (накопления неорганического фосфата) в системе, содержащей 0,5% воды, ферментативный процесс можно инициировать и довести гидролиз пирофосфата до 100% только путем повышения содержания воды в системе до 4%.

Резкое снижение скорости ферментативной реакции в интегральном режиме может также вызываться ингибированием продуктом реакции. Эта возможность в случае пирофосфатазы представляется реальной, так как для реакции в водном растворе известно, что фосфат ингибирует фермент с константой ингибирования $K_i \sim 1$ мМ [26]. Для экспериментальной проверки этого предположения мы изучили реакцию в системе обращенных мицелл бриджа 56 с 1—1,5% солюбилизированной воды, содержащей пирофосфат и пирофосфатазу, при введении в начальный момент эквивалентных количеств неорганического фосфата. Обнаружилось, что в этом случае действительно не накапливается фосфат, как если бы активность фермента подавлялась присутствующим в системе продуктом. Более того, происходит уменьшение фосфата за сутки на 15—20%. Регистрируемое изменение концентрации неорганического фосфата имеет хорошую воспроизводимость и выходит за рамки ошибок измерения, поэтому можно сделать вывод, что пирофосфатаза в слабогидратированных мицеллах бриджа 56 в циклогексане катализирует реакцию образования дополнительного химического продукта с участием фосфата и пирофосфата. Попытка выявить образующееся соединение (предположительно пирофосфат или триполифосфат)

была предпринята в экспериментах с использованием [^{32}P]фосфата. Посредством ионообменной хроматографии компонентов реакционной смеси обнаружили лишь меченый фосфат, однако в количестве, меньшем по сравнению с исходным. С чем связано это наблюдаемое уменьшение содержания неорганического фосфата в системе, выяснить не удалось. Таким образом, вопрос о химических превращениях, катализируемых пирофосфатазой, солюбилизированной обращенными мицеллами бриджа 56 в циклогексане, остается открытым и требует дальнейшего изучения.

Экспериментальная часть

В работе использовали пирофосфатазу из пекарских дрожжей (КФ 3.6.1.1), полученную как описано в работе [27], пирофосфат натрия (Sigma, США); натрийфосфат, ос. ч. («Союзреактив»), циклогексан («Союзреактив»; очищали перегонкой), цетилполи(10)этиленгликоль (бридж 56) (Atlas, Франция), любезно предоставленный проф. Ф. Пюизье (Франция), ^{32}P (Amersham, Англия). Буферный раствор (А) содержал трис- HCl (50 мМ) и MgCl_2 (20 мМ), pH 7,0. Суспензию пирофосфатазы перед экспериментом центрифугировали, сливали надосадочную жидкость, а осадок растворяли в буферном растворе А. Все эксперименты проводили при pH 7,0 в термостате при 33° С. Для определения P_1 готовился запасной раствор SnCl_2 в конц. HCl (0,4 г/мл), который хранился в холодильнике. Непосредственно перед экспериментом 50 мкл запасного раствора SnCl_2 добавляли в 1 мл 2 М H_2SO_4 (раствор В).

Типичный эксперимент. К 1 мл 0,2 М раствора ПАВ в циклогексане добавляли 1—6% буферный раствор А и 5—10 мкл 20—100 мкМ субстрата. Реакцию начинали добавлением 1—5 мкл концентрированного раствора фермента. Скорость гидролиза пирофосфата, катализируемого пирофосфатазой, определяли по количеству образующегося неорганического фосфата. Для этой цели через определенные промежутки времени отбирали пробы из реакционной смеси и определяли P_1 по описанной ниже методике. За единицу активности (А) принимали число мкмоль P_1 , выделившегося за 1 мин на 1 мг белка.

Методика определения фосфата. К 1 мл исследуемого раствора добавляли 5 мкл 6% раствора молибдата аммония в 3 н. H_2SO_4 . Затем в пробирку добавляли 1 мл *i*-EtOH, встряхивали в течение 3 мин и к раствору добавляли 50 мкл 2 М H_2SO_4 , 0,5 мл смеси EtOH + H_2SO_4 (конц.) в соотношении 98 : 2 и 0,2 мл раствора В. В такой оптически прозрачной системе измеряли поглощение при 720 нм. Спектрофотометрические измерения проводили на двухлучевом двухволновом спектрофотометре «Hitachi-356» (Япония) и фотоэлектрическом фотометре «Spectromom-402» (Венгрия). Продукты реакции, меченные изотопом ^{32}P , после выдерживания в течение 1 сут солюбилизировали в 2% водном растворе тритона X-100 и анализировали методом ионообменной хроматографии на колонке с дауэксом 1×8 [28].

ЛИТЕРАТУРА

1. Левашов А. В., Клячко Н. Л., Паптин В. И., Хмельницкий Ю. Л., Мартинек К. (1980) Биоорган. химия, 6, 929—943.
2. Мартинек К., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Березин И. В. (1977) Докл. АН СССР, 236, 920—923.
3. Luisi P. L., Bonner F. J., Pellegrini A., Wiget P., Wolf R. (1979) Helv. chim. acta, 62, Fasc. 3, 740—753.
4. Wolf R., Luisi P. L. (1979) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 89, 209—217.
5. Menger F. M., Yamada K. (1979) J. Amer. Chem. Soc., 101, 6733—6734.
6. Balny C., Douzou P. (1979) Biochimie, 61, 445—452.
7. Fendler J. H. (1976) Accounts Chem. Res., 9, 153—161.
8. Левашов А. В., Паптин В. И., Мартинек К. (1979) Коллоидн. ж., 41, 453—459.
9. Мартинек К., Клибанов А. М., Самохин Г. П., Семенов А. Н., Березин И. В. (1977) Биоорган. химия, 3, 696—702.

10. Клибанов А. М., Семенов А. Н., Самохин Г. П., Мартинек К. (1978) Биоорганическая химия, 4, 82-88.
11. Семенов А. Н., Мартинек К., Березин И. В. (1980) Биоорганическая химия, 6, 600-608.
12. Butler L. G. (1971) in: The Enzymes, 3rd ed. (Boyer P. D., ed.), vol. 4, pp. 529-541, Acad. Press, N. Y.
13. Ridlington J. W., Yand Y., Bulter L. G. (1972) Arch. Biochem. and Biophys., 152, 714-725.
14. Hansen G., Eifler R., Heitmann P. (1972) Acta biol. et med. Germ., 28, 977-988.
15. Henrikson R. L., Sterner R., Noyes C. (1973) J. Biol. Chem., 248, 2521-2528.
16. Cohen S. A., Sterner R., Keim P. S., Henrikson R. L. (1978) J. Biol. Chem., 253, 889-898.
17. Baykov A. A., Tam-Villoslado J. J., Avaeva S. M. (1979) Biochim. et biophys. acta, 569, 228-238.
18. Lin T.-I., Morales M. F. (1977) Anal. Biochem., 77, 10-17.
19. Woo Ik Hwang, Sungman Cha (1973) Anal. Biochem., 55, 379-387.
20. Scopes R. K. (1972) Anal. Biochem., 49, 88-92.
21. Weil-Meldherble H., Green K. (1951) Biochem. Z., 49, 286-291.
22. Braga E. A., Avaeva S. M. (1972) Biochem. and Biophys. Res. Commun., 45, 528-538.
23. Rouviere J., Couret J.-M., Lindheimer A., Lindheimer M., Brum B. (1979) J. chim. phys., 76, 297-301.
24. Flodgaard H., Fleron P. (1974) J. Biol. Chem., 249, 3465-3474.
25. Snoke R. E., Nordlie R. C. (1967) Biochim. et biophys. acta, 139, 190-192.
26. Rapoport T. A., Höhne W. E., Reich J. G., Heitmann P., Rapoport S. M. (1972) Eur. J. Biochem., 26, 237-246.
27. Брага Э. А., Байков А. А., Аваева С. М. (1973) Биохимия, 38, 344-350.
28. Baykov A. A., Bakuleva N. P., Nazarova I. I., Avaeva S. M. (1977) Biochem. et biophys. acta, 481, 184-194.

Поступила в редакцию
19.II.1980

**CATALYSIS BY ENZYMES INCORPORATED INTO REVERSED MICELLES
OF SURFACTANTS IN ORGANIC SOLVENTS. 2. INORGANIC BAKER'S YEAST
PYROPHOSPHATASE SOLUBILIZED IN CYCLOHEXANE WITH THE AID
OF BRIJ 56**

KLYACHKO N. L., BAYKOV A. A., LEVASHOV A. V., MARTINEK K.,
AVAIEVA S. M.

M. V. Lomonosov State University, Moscow

Catalytic properties of inorganic baker's yeast pyrophosphatase in Brij 56 reversed micelles in cyclohexane were studied. The enzyme activity was shown to depend strongly on the water content of the system, reaching under optimal conditions the value equal to that in aqueous solution. The enhanced stability of pyrophosphatase, as compared to aqueous solutions, was observed in the Brij 56 - water - cyclohexane system at low water content (circ. 1%). The system under study can be of interest as a model for enzyme behaviour in vivo, as well as for elucidating the role played by water incorporated in membrane structure and in enzyme active sites.