



УДК 544.183+577.15.02

**КАТАЛИЗ ФЕРМЕНТАМИ, ВКЛЮЧЕННЫМИ В ОБРАЩЕНИЕ
МИЦЕЛЛЫ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
В ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЯХ****III. ВЛИЯНИЕ СТЕПЕНИ ГИДРАТАЦИИ АЭРОЗОЛЯ ОТ В ОКТАНЕ НА
СКОРОСТЬ ГИДРОЛИЗА ЦИННАМОИЛ- α -ХИМОТРИПСИНА****Левашов А. В., Клячко Н. Л., Мартинек К.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Показано, что *N*-транс-циннамоилимидазол является субстратом α -химотрипсина, солюбилизированного с помощью аэрозоля ОТ (АОТ) в октане, и эта реакция, так же как и в водных растворах, может быть использована для титрования активных центров фермента. Исследованы зависимости константы скорости реакции дезацилирования *N*-транс-циннамоил- α -химотрипсина от pH и количества солюбилизированной воды в системе АОТ – вода – октан. Найдено, что величина рК ионогенной группы фермента, контролирующей реакцию, зависит от содержания H₂O в исследованной системе. Зависимость предельного (pH-независимого) значения константы скорости дезацилирования *N*-транс-циннамоил- α -химотрипсина имеет колоколообразный вид, причем в оптимальном значении константы скорости такое же, как в воде. Обнаружено, что аналогичный характер имеют зависимости активности негидролитического фермента лактатдегидрогеназы, солюбилизированной в системе бридж 5б – вода – циклогексан, и изменения интенсивности флуоресценции *N*-ацетил-L-триптофана в обращенных мицеллах АОТ в октане от содержания воды в системе. Обсуждены причины этого явления. Изученная система может представить интерес как модель для исследования свойств воды, включенной в биомембраны, а также роли воды в структуре белков и механизме ферментативного катализа.

Живая природа во всем ее многообразии фактом своего существования в привычном нам виде обязана в первую очередь воде. Вода выполняет (либо непосредственно – с образованием водородных связей, либо опосредованно – в виде гидрофобных взаимодействий) структурирующую функцию, а также активно участвует в самых разнообразных биофизических и биохимических процессах (мембранный транспорт или ферментативные реакции). Свойства воды, включенной в биомембрану или активный центр фермента, могут резко отличаться от характеристик водной макрофазы [2]. Однако, несмотря на очевидную важность познания свойств воды, включенной в биосистемы, по этому вопросу в литературе нет достаточно полной информации. Это связано главным образом с известными трудностями при изучении сложных систем. Именно поэтому возникает необходимость в исследовании моделей.

Для исследования роли воды в структуре белков и в механизме ферментативного катализа (особенно тех процессов, где вода – химический реагент) наиболее перспективными модельными системами нам представ-

* Предыдущее сообщение см. [1].

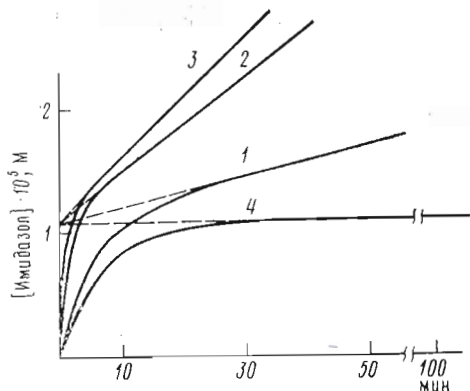


Рис. 1

Рис. 1. Кинетические кривые продукт (имидазол) – время, характеризующие гидролиз *N-транс*-циннамоилимидазола под действием α -химотрипсина, солюбилизованного в системе 0,1 М АОТ – 0,025 М трис-ацетат, рН 5,0, – октан при соотношении $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{АОТ}]$, равном 4,17 (1), 5,6 (2), 8,3 (3). Кривая 4 – 0,5 М АОТ при $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{АОТ}] = 1,1$. Концентрация циннамоилимидазола $2,5 \cdot 10^{-4}$ М, α -химотрипсина $1,1 \cdot 10^{-5}$ М (26° С)

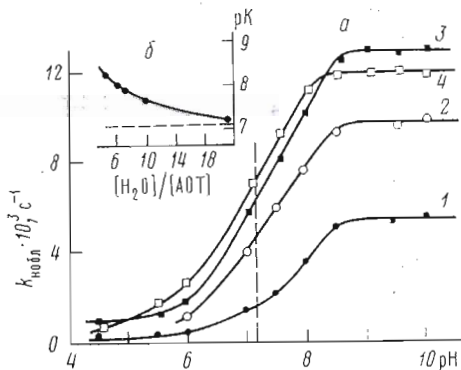


Рис. 2

Рис. 2. Каталитические характеристики α -химотрипсина в системе обращенных мицелл АОТ в октане. а) Зависимость константы скорости реакции дезацилирования *N-транс*-циннамоилхимотрипсина от рН в системе АОТ – буфер А (или Б) – октан при соотношении $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{АОТ}]$, равном 5,28 (1); 6,95 (2); 8,06 (3); 10,84 (4). б) Зависимость рК ионогенной группы фермента от степени гидратации ($[\text{H}_2\text{O}]/[\text{АОТ}]$) обращенных мицелл АОТ в октане; концентрация АОТ 0,1 М, циннамоилимидазола $2,5 \cdot 10^{-4}$ М, α -химотрипсина 10^{-5} М (26° С). Пунктиром обозначено значение рК в водном растворе

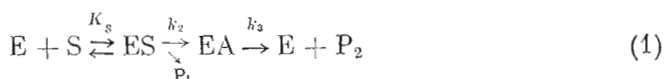
ляются [3, 4] обращенные мицеллы поверхностно-активных веществ (ПАВ) в органических растворителях с включенными в них ферментами. Как было впервые показано нами [3], а затем подтверждено в работах других исследователей [5–8], ферменты, солюбилизованные с помощью ПАВ в органических растворителях, сохраняют свою каталитическую активность и специфичность. Количество воды, окружающей солюбилизованный фермент, можно строго дозировать, варьируя степень гидратации обращенных мицелл.

В данной работе мы изучили зависимость скорости дезацилирования *N-транс*-циннамоил- α -химотрипсина, солюбилизованного с помощью ди-(2-этил)гексилового эфира сульфоянтарной кислоты (аэрозоль ОТ, АОТ) в октане, от содержания воды в этой системе. В механизме катализа протеолитическими ферментами дезацилирование промежуточного ацилфермента (примером которого является *N-транс*-циннамоил- α -химотрипсин) – одна из ключевых стадий. Она происходит в результате нуклеофильной атаки ацилфермента молекулой воды с образованием кислотного продукта и регенерацией свободного фермента. Таким образом, выбранная нами реакция должна оказаться чувствительной к содержанию и состоянию воды, солюбилизованной в системе обращенных мицелл.

Кинетика гидролиза N-транс-циннамоилимидазола, катализируемого α -химотрипсином, солюбилизованным с помощью АОТ в октане. В условиях, когда начальная концентрация субстрата намного превышает концентрацию фермента, кинетические кривые продукт (имидазол) – время, характеризующие гидролиз *N-транс*-циннамоилимидазола под действием α -химотрипсина, солюбилизованного с помощью АОТ в октане, обнаруживают ярко выраженный двухфазный характер (рис. 1)*. В рамках классической

* Скорость образования продукта измеряли спектрофотометрически по исчезновению исходного субстрата [9].

трехстадийной схемы каталитической реакции гидролиза *N-транс*-циннамонлимидазола (S) α -химотрипсином (E)



вид кинетических кривых на рис. 1 указывает на выполнение соотношения $k_2 \gg k_3$, характерного, как известно [9], для этой реакции в водном растворе. Мы убедились, что характер получаемых кинетических кривых не изменяется при варьировании содержания солюбилизованной воды в системе обращенных мицелл (от 0,25 до 4 об. %). Кинетические кривые, приведенные на рис. 1, позволяют определить кинетические параметры реакционной схемы (1), а именно константу скорости ацилирования k_2 (из предстационарной кинетики гидролиза *N-транс*-циннамонлимидазола, отражаемой начальным криволинейным участком кинетических кривых на рис. 1) и константу скорости дезацилирования k_3 (по линейному стационарному участку кинетических кривых на рис. 1). Анализ кривых проводили как указано в работе [10]. Кроме того, первоначальный быстрый выброс основного продукта P_1 (отрезок, который на оси ординат отсекает асимптота, — см. пункт на рис. 1) соответствует в указанных условиях ($[S]_0 \gg [E]_0$, $k_2 \gg k_3$) концентрации активных центров фермента. Иными словами, *N-транс*-циннамонлимидазол, как и в водных растворах [11], может служить удобным титрантом α -химотрипсина, солюбилизованного с помощью ПАВ в органических растворителях (см. «Экспериментальную часть»).

pH-Зависимость константы скорости дезацилирования N-транс-циннамоил- α -химотрипсина в обращенных мицеллах АОТ в октаноле. Реакция гидролиза *N-транс*-циннамоил- α -химотрипсина в водных растворах зависит от pH, и ее скорость контролируется ионогенной группой фермента с рК 7,15 [11]. Нами была изучена зависимость константы скорости дезацилирования *N-транс*-циннамоил- α -химотрипсина в обращенных мицеллах АОТ в октаноле от pH солюбилизованного буферного раствора. Экспериментальные данные, полученные при различных содержаниях воды в исследуемой системе, приведены на рис. 2. Согласно рис. 2а, pH-профили константы скорости дезацилирования *N-транс*-циннамоил- α -химотрипсина в системе АОТ — вода — октан имеют сигмоидальный вид, такой же, как и в чистой воде [11]. Величины рК, определенные из кривых на рис. 2а, представлены на рис. 2б в виде зависимости от степени гидратации мицелл. Как видно, в системе обращенных мицелл АОТ в октаноле происходит сдвиг рК, причем наибольшая величина сдвига (около единицы pH) наблюдается при низком содержании воды. По мере гидратации ПАВ величина рК уменьшается, приближаясь по значению к величине, характеризующей реакцию в водном растворе (пункт на рис. 2б). Сходное явление имеет место в реакции гидролиза специфического субстрата (Ас-Три-ОМе), катализируемой α -химотрипсином, солюбилизованным в системе АОТ — гептан [8].

Наблюдаемый сдвиг рК имеет по крайней мере четыре причины. Во-первых, использование ионогенных ПАВ, образующих вокруг фермента заряженный (двойной электрический) слой, может приводить к локальному сдвигу pH (в зависимости от знака заряда и степени ионизации ПАВ), как при иммобилизации фермента на заряженной матрице [12, 13] (величина кажущегося сдвига pH и соответственно рК в таком случае составляет обычно 1–2 ед. pH). С аналогичных позиций объясняют обычно сдвиг рК, наблюдаемый при солюбилизации ионогенных соединений как нормальными, так и обращенными мицеллами (см., например, [14, 15]).

Во-вторых, в случае обращенных мицелл АОТ следует допустить, что их отрицательно заряженный поверхностный слой, образованный из сульфогрупп, непосредственно может взаимодействовать с имидазольной

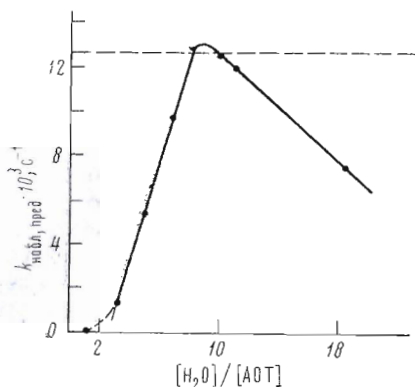


Рис. 3

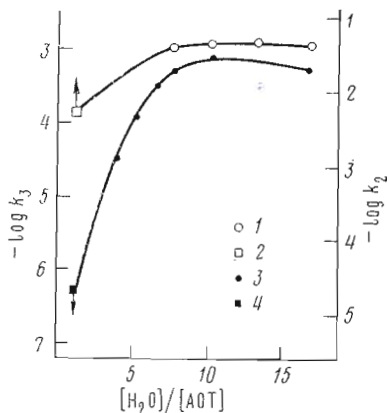


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость предельной константы скорости деацилирования *N*-транс-циннамоил- α -химотрипсина от содержания воды, солюбилизированной в системе 0,1 М АОТ – буфер А (или Б) – октан. Пунктиром обозначено значение константы в водном буфере. Концентрация циннамоилмидазола $2,5 \cdot 10^{-4}$ М, α -химотрипсина 10^{-5} М (26°C)

Рис. 4. Зависимость констант скорости (с^{-1}) ацилирования k_2 и деацилирования k_3 α -химотрипсина в реакции с транс-циннамоилмидазолом от степени гидратации ($[\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}]$) обращенных мицелл АОТ в октане: 0,1 М АОТ – буфер А – октан, концентрации циннамоилмидазола $2,5 \cdot 10^{-4}$ М; α -химотрипсина 10^{-5} М; рН 4,5; 26°C . 1 – экспериментальные значения k_2 ; 2 – нижний предел k_2 при $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}] = 1,5$, оцененный по полупериоду реакции ацилирования; 3 – экспериментальные значения k_3 при рН 4,5, полученные для области гидратации мицелл $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}] \geq 7$; значение k_3 при $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}] = 5,3$ получено экстраполяцией рН-зависимости, значение k_3 при $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}] = 4$ вычислено при использовании значений $k_{3(\text{пред})}$ $1,3 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ и рК 8,35; 4 – верхний предел значения k_3 при $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{AOT}] = 1,5$, оцененный по экспериментальному верхнему пределу $k_{3(\text{пред})}$ и значению рК 8,35

группой активного центра α -химотрипсина, образуя с ней ионную пару. В результате она становится менее кислой. В связи с этим важно отметить, что прочность ионных пар в обращенных мицеллах АОТ снижается по мере их гидратации [16]; следовательно, эффект сдвига рК тоже должен ослабляться с ростом содержания воды в системе, что согласуется с данными рис. 2а.

В-третьих, значения рК ионогенных групп фермента, солюбилизированного в обращенных мицеллах, могут изменять истинную величину вследствие изменения характера среды, окружающей фермент, в результате, например, его частичной дегидратации. Хорошо известно, что дегидратация ионогенных групп, происходящая при замене водного раствора на водно-органический или чисто органический, приводит к существенным (несколько единиц рН) изменениям величин рК простых соединений [17]. По существующим в литературе представлениям (см., например, [18]) среда обращенных мицелл ПАВ, в том числе мицелл АОТ в октане [19], менее полярна, чем вода. Именно поэтому следует ожидать уменьшения констант диссоциации ионогенных соединений, солюбилизированных обращенными мицеллами.

И наконец, необходимо учитывать возможность конформационного изменения фермента при солюбилизации и связанного с этим явлением изменения рК ионогенных групп фермента, в том числе групп активного центра, контролирующих ферментативную реакцию.

Зависимость рН-независимых предельных значений константы скорости деацилирования *N*-транс-циннамоил- α -химотрипсина от содержания воды в системе АОТ – вода – октан имеет колоколообразный вид и обнаруживает ярко выраженные три области (рис. 3). При низких степенях

гидратации обращенных мицелл реакция дезацилирования включенного в них *N-транс*-циннамоил- α -химотрипсина практически не идет. Дезацилирование становится возможным лишь по достижении некоторого критического значения степени гидратации $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{ПАВ}] \approx 2$. По мере дальнейшего увеличения содержания воды в исследуемой системе величина константы скорости дезацилирования сначала возрастает, а при высоких степенях гидратации ($[\text{H}_2\text{O}]/[\text{ПАВ}] > 9$) снижается.

Для обсуждения этих фактов нужно рассмотреть закономерности солиubilизации воды в системе обращенных мицелл АОТ. Известно [20, 21], что в этой системе солиubilизация воды протекает в три последовательные стадии. Первые порции воды (до двух молекул H_2O на молекулу ПАВ) наиболее прочно связываются АОТ, образуя сольватную оболочку катионов натрия. Гидратация анионной головной группы в молекуле ПАВ происходит при содержании воды в системе от 2 до 10–15 молекул H_2O на молекулу ПАВ. При дальнейшей солиubilизации воды структура мицеллы изменяется: в ее ядре происходит образование и рост самостоятельной водной фазы. Рассмотрим каждую из этих трех областей солиubilизации воды отдельно, анализируя каталитическую активность включенного в мицеллу фермента.

Отсутствие реакции гидролиза N-транс-циннамоил- α -химотрипсина при низких степенях гидратации мицелл. Этот факт, один из главных результатов работы, обусловлен, по-видимому, тем, что введенная в систему вода практически полностью связана катионами ПАВ. С другой стороны, фермент в этих условиях не теряет способность вступать в реакцию ацилирования, причем образование ацилфермента происходит количественно (рис. 1, 4). Этот факт находит аналогию в том, что активный центр α -химотрипсина в твердой фазе (в кристалле) также можно проацилировать, однако дальнейший гидролиз ацилфермента не идет [22]. Следовательно, в твердофазном и мицеллярном состояниях «первые» молекулы воды, гидратирующей фермент, выполняют только структурообразующую функцию в создании «каталитически активной» конформации, не выступая в роли химического реагента. Масштаб изменений кинетических параметров k_2 и k_3 исследуемой ферментативной реакции при снижении содержания воды в системе обращенных мицелл показан на рис. 4. Видно, что переход от высоких степеней гидратации мицелл ($[\text{H}_2\text{O}]/[\text{ПАВ}] \geq 9$) к низкой ($[\text{H}_2\text{O}]/[\text{ПАВ}] = 1,5$) характеризуется небольшим снижением величин k_2 (менее чем в 10 раз), тогда как значение k_3 в этих условиях уменьшается более чем в 1000 раз. На рис. 4 отражены закономерности изменений k_2 и k_3 не в рН-оптимуме, а при рН 4,5, поскольку при более высоких значениях рН вследствие высоких скоростей реакции определение величин k_2 требует использования методов быстрой кинетики, например метода остановленной струи. Таким образом, факт существенной регуляции соотношения констант отдельных «элементарных» стадий ферментативных реакций в системах обращенных мицелл требует дальнейшего специального изучения. Обнаруженное нами подавление гидролиза ацилфермента при низком содержании воды в системе обращенных мицелл можно будет использовать, по-видимому, для фиксирования ферментных промежуточных соединений, лабильных в водных растворах.

Оптимальная концентрация воды в обращенных мицеллах. Область возрастания величины константы скорости дезацилирования *N-транс*-циннамоил- α -химотрипсина (рис. 3) соответствует, как было отмечено выше, тем степеням влажности мицелл, при которых происходит гидратация анионов ПАВ. Дальнейшее увеличение влажности мицелл, когда образуется самостоятельная водная микрофаза внутри обращенных мицелл АОТ, вызывает снижение ферментативной активности. Рассмотрим три возможные причины (механизмы) такого изменения скорости ферментативной реакции.

Механизм А: при низкой степени гидратации ПАВ концентрация воды

в мицеллах явно меньше, чем в чистой воде (где она равна 55 М). Следовательно, при увеличении концентрации воды в мицеллах скорость дезацилирования ацилфермента должна была бы возрастать вплоть до некоторого предела, обусловленного тем, что локальная концентрация воды в районе активного центра фермента стала 55 М. Однако следует принять во внимание, что по мере увеличения содержания воды в обращенных мицеллах может изменяться ее состояние, в частности число образуемых водородных связей [16]. Это в свою очередь должно было бы привести, как показано на примере модельного процесса — нейтрального гидролиза пикрилхлорида [4], к снижению реакционной способности сольбилизованной воды. При наложении указанных эффектов, а именно концентрирования и снижения реакционной способности воды, зависимость скорости гидролитической реакции от содержания воды в системе обращенных мицелл должна принять колоколообразный вид, аналогичный приведенному на рис. 3.

Механизм Б: немаловажную роль в регуляции ферментативной реакции могло бы в принципе играть геометрическое соответствие молекулы фермента размером (форме) мицеллы. Дело в том, что радиус мицеллы АОТ в октате в отсутствие воды характеризуется величиной порядка 15 Å, а по мере гидратации ПАВ радиус мицеллы существенно возрастает (до 50 Å при $[H_2O]/[ПАВ]=22$, см. [23]). Хотя влияние сольбилизации фермента на размеры обращенных мицелл пока не изучено, можно допустить, что при низких степенях гидратации ПАВ, т. е. при малых по сравнению с ферментом размерах мицелл, фермент может испытывать со стороны мицеллярного слоя значительное «давление», неблагоприятно сказывающееся на его конформации и каталитической активности. В результате увеличения содержания воды, когда мицеллы становятся более крупными, этот отрицательный эффект, естественно, должен исчезать. Не исключено, что наличие оптимума на зависимости каталитической активности фермента от степени гидратации мицелл соответствует условиям создания внутримицеллярной полости, комплементарной молекуле фермента.

Механизм В: фермент, находясь при низких содержаниях воды в мицеллах в дегидратированной среде, сам также (хотя бы частично) дегидратируется. В результате дегидратации должна измениться конформация белковой молекулы, что может неблагоприятно сказаться на каталитической активности. По мере увеличения содержания воды в мицеллах степень гидратации белка должна возрастать, пока не достигнет оптимальной, при которой фермент примет нативную конформацию. Возможно, именно в этот момент локальная концентрация воды в районе активного центра фермента становится равной 55 М, как в чистой воде. При дальнейшем увеличении содержания воды конформация фермента может продолжать изменяться (как в благоприятную для катализа сторону, так и в неблагоприятную) вследствие изменения характера среды, окружающей фермент, например повышения ионной силы за счет диссоциации гидратированных головных групп ПАВ, а также вследствие конформационно-сольватационных изменений самих мицелл.

В итоге зависимость, приведенная на рис. 3, может получить объяснение в рамках достаточно широкого набора различных причин, из которых пока трудно выделить наиболее значимые, не располагая детальным знанием физико-химических свойств исследуемой системы. Тем не менее попытаемся хотя бы качественно оценить вклад отдельных факторов в изменение скорости ферментативной реакции. Прежде всего отметим, что аналогичный колоколообразный вид зависимости ферментативной активности от содержания воды в системе обращенных мицелл характеризует фосфолипазу A_2 в системе фосфатидилхолин — вода — диэтиловый эфир [24] и пиррофосфатазу в системе бридж 56 — вода — циклогексан [1]. Поскольку перечисленные ферменты, включая исследуемый в данной работе α -химотрипсин (рис. 3), являются гидролитическими, естественно было бы

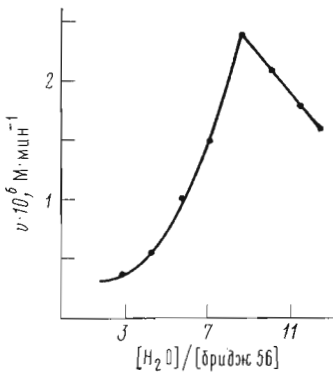


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость активности лактатдегидрогеназы в системе 0,2 М бридж 56 — буфер В — циклогексан от степени гидратации обращенных мицелл. Концентрация NADH $1,9 \cdot 10^{-4}$ М; пирувата $4,8 \cdot 10^{-5}$ М; лактатдегидрогеназы $5 \cdot 10^{-4}$ мг/мл; pH 6,8; 30° С

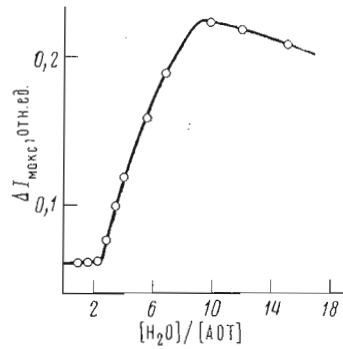


Рис. 6

Рис. 6. Изменение относительной интенсивности флуоресценции Ас-Трп-ОН, солюбилизированного в системе 0,1 М АОТ — буфер ($3 \cdot 10^{-2}$ М натрий-фосфат) — октан, в зависимости от содержания воды. Концентрация Ас-Трп-ОН $2,5 \cdot 10^{-5}$ М; pH 7,5; 26° С

допустить, что наблюдаемый во всех этих случаях характер зависимости каталитической активности солюбилизированного фермента от степени гидратации мицелл определяется химической спецификой катализируемой реакции, а именно участием в ней воды в качестве реагента (механизм А). Однако это не так.

Нами была изучена зависимость от степени гидратации мицелл бридж 56 в циклогексане негидролитического фермента — лактатдегидрогеназы из мышцы кролика. Как и в случае гидролитических ферментов, она имеет колоколообразный вид (рис. 5). Следовательно, «химический» механизм А исключается (во всяком случае, он не играет определяющей роли в существовании оптимальной концентрации воды в мицеллах) и необходимо искать какие-либо физические причины наблюдаемого явления. На это косвенно указывают также данные по изменению относительной вязкости в системе АОТ — вода — декан от содержания воды [25]. Наблюдаемая зависимость описывается кривой, которая конгруэнтна зависимости скорости ферментативной реакции от степени гидратации обращенных мицелл (рис. 3, 5).

Вряд ли справедлив также и механизм Б (во всяком случае он не является, по-видимому, решающим для дезацилирования циннаоилхимотрипсина в исследуемой системе). Это видно из проведенного нами зондирования обращенных мицелл АОТ в октане с помощью флуоресцентной метки N-ацетил-L-триптофана. Зависимость интенсивности флуоресценции метки от степени гидратации мицелл описывается кривой, аналогичной изменению ферментативной активности (рис. 6, ср. с рис. 3). Поскольку эта низкомолекулярная метка вряд ли может «чувствовать» изменения геометрической формы обращенной мицеллы, следует заключить, что наблюдаемое изменение каталитической активности (рис. 3, 5) обусловлено изменением характера реакционной среды (изменением степени гидратации белка).

В целом следует подчеркнуть, что, хотя вопрос о состоянии белка в обращенных мицеллах заслуживает дополнительного исследования, уже сейчас видно, что, варьируя степень гидратации мицелл, можно, во-первых, в широких пределах регулировать каталитическую активность включенных в них ферментов и, во-вторых, изменять соотношение скоростей элементарных стадий ферментативного процесса.

Экспериментальная часть

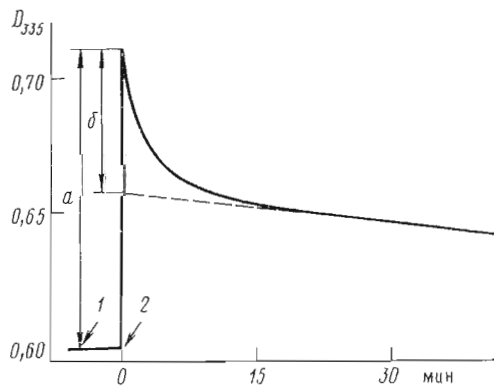
В работе использовали α -химотрипсин (КФ 3.4.21.1) производства Олайнского завода химических реактивов (Латв. СССР); лактатдегидрогеназу (КФ 1.1.1.27) из мышцы кролика; NADH и пируват (Sigma, США) любезно предоставлены д-ром Ф. Сейду (Франция); *N-транс*-циннамоилимидазол (Sigma, США); *N*-ацетил-*L*-триптофан (Reanal, Венгрия); натриевую соль ди-(2-этил)гексилового эфира сульфоянтарной кислоты (аэрозоль ОТ, АОТ) (Merck, ФРГ). Цетилполи-(10)-этиленгликоль, или бридж 56 (Atlas Serpic, Франция), любезно предоставлен проф. Ф. Пюизьс (Франция). Поверхностно-активные вещества и *n*-октан («Союзреактив») очищали по методике [4].

α -Химотрипсин растворяли в буферном растворе (0,05 М трис-ацетат, pH 4,5–8,5 (буфер А) и 0,04 М трис-борат (буфер Б), pH 8,0–11); pH раствора фермента контролировали на pH-метре «Acidimeter-325» (ЧССР).

Определение числа активных центров α -химотрипсина в системе АОТ — вода — октан проводили спектрофотометрически, используя в качестве титранта [9] *N-транс*-циннамоилимидазол. Типичный эксперимент был следующим. В кювету, содержащую 0,1 М АОТ в октане и раствор циннамоилимидазола в ацетонитриле в концентрации $2,5 \cdot 10^{-4}$ М, добавляли 10–70 мкл концентрированного раствора фермента ($4 \cdot 10^{-3}$ М), встряхивали и измеряли начальное быстрое изменение поглощения при 335 нм. В отличие от водных растворов [9] в данном случае (рис. 7) наблюдается мгновенное увеличение поглощения с последующим более медленным уменьшением его аналогично классической методике Бендера [9]. Первоначальное изменение поглощения (*a*) связано, по-видимому, с тем, что молярное поглощение циннамоилимидазола в системе АОТ — вода — октан другое, чем в воде ($9370 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [17]) и меняется от $2200 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ в практически сухих мицеллах до $3600 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ при соотношении $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{АОТ}] \sim 20$. Концентрацию активных центров фермента вычисляли аналогично методике [9] по количеству образующегося ацилферментного производного, определяемого по величине изменения поглощения (*b*) (см. рис. 7), используя значение коэффициента молярного поглощения $2800 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$, полученное нами при соотношении $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{АОТ}] = 8,1$.

*Скорость реакции дезацилирования *N-транс*-циннамоилимидазола* измеряли спектрофотометрически (335 нм) по расходованию *N-транс*-циннамоилимидазола в условиях насыщения фермента этим субстратом. К 2 мл 0,1 М раствора АОТ в октане добавляли 5 мкл концентрированного раствора циннамоилимидазола, 5–20 мкл раствора фермента ($4 \cdot 10^{-3}$ М) в водном буфере, интенсивно перемешивали и добавляли соответствующее количество буферного раствора (от 5 до 100 мкл), снова интенсивно встряхивали и в полученной гомогенной (оптически прозрачной) системе измеряли скорость ферментативной реакции, учитывая неферментативный гидролиз субстрата. Порядок добавления реагентов можно изменять. Спек-

Рис. 7. Спектрофотометрическое титрование активных центров α -химотрипсина с помощью *N-транс*-циннамоилимидазола в системе АОТ — буфер А — октан. Концентрация АОТ 0,1 М; циннамоилимидазола $2,6 \cdot 10^{-4}$ М; α -химотрипсина $2 \cdot 10^{-5}$ М; $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{АОТ}] = 8,1$; pH 4,5; 26°C . 1, 2 — моменты добавления в систему субстрата (циннамоилимидазола) и фермента (α -химотрипсина) соответственно



трофотометрические измерения проводили на двухлучевом спектрофотометре Beckman-25 (США) с термостатируемым кюветным отделением при 26° С.

Активность лактатдегидрогеназы определяли спектрофотометрически по скорости расходования NADH (340 нм) в системе 0,2 М бридж 56 — водный буфер (0,05 М фосфат — 2 мМ EDTA — 5 мМ MgCl₂ — 1 мМ дитиотреит, рН 6,8) (буфер В) — циклогексан при концентрации лактатдегидрогеназы $5 \cdot 10^{-4}$ мг/мл, NADH $19 \cdot 10^{-5}$ М и пирувата $4,8 \cdot 10^{-5}$ М (температура 30° С).

Флуоресцентные исследования обращенных мицелл проводили с помощью метки, N-ацетил-L-триптофана, в системе 0,1 М АОТ — водный буфер ($3 \cdot 10^{-2}$ М натрий-фосфат; рН 7,5) — октан при концентрации N-ацетил-L-триптофана $2,5 \cdot 10^{-5}$ М (длина волны возбуждения 290 нм, температура 26° С). Измерения проводили на спектрофлуориметре «Hitachi MPF4» (Япония).

Авторы выражают благодарность чл.-кор. АН СССР И. В. Березину за постоянную поддержку данного исследования и за полезные обсуждения полученных результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клячко Н. Л., Байков А. А., Левашов А. В., Мартинек К., Аваева С. М. Катализ ферментами, включенными в обращенные мицеллы поверхностно-активных веществ в органических растворителях. II. Неорганическая пирофосфатаза из лекарских дрожжей, солиubilizованная в циклогексане с помощью Бридж 56.— Биооргани. химия, 1980, т. 6, № 11, с. 1707—1713.
2. Water. A comprehensive treatise. (Franks F., ed.). New York — London: Plenum Press, 1975, в. 5.
3. Мартинек К., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Березин И. В. Катализ водорастворимыми ферментами в органических растворителях. Стабилизация ферментов против денатурации при включении их в обращенные мицеллы поверхностно-активного вещества.— Докл. АН СССР, 1977, т. 236, с. 920—923.
4. Мартинек К., Левашов А. В., Пантин В. И., Березин И. В. Модель биологических мембран или поверхностного слоя (активного центра) белковых глобул (ферментов). Реакционная способность воды, солиubilizованной обращенными мицеллами АОТ в октаноле при нейтральном гидролизе пикрилхлорида.— Докл. АН СССР, 1978, т. 238, с. 626—629.
5. Douzou P., Keh E., Baluy C. Cryoenzymology in aqueous media: Micellar solubilized water clusters.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 681—684.
6. Baluy C., Douzou P. New trends in cryoenzymology. II. Aqueous solutions of enzymes in a polar solvents.— Biochemie, 1979, v. 61, p. 445—452.
7. Wolf R., Luisi P. L. Micellar solubilization of enzymes in hydrocarbon solvents enzymatic activity and spectroscopic properties of ribonuclease in *n*-octane.— Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, v. 89, p. 209—217.
8. Menger F. M., Yamada K. Enzyme catalysis in water pools.— J. Amer. Chem. Soc., 1979, v. 101, p. 6731—6734.
9. Schonbaum G. R., Zerner K., Bender M. L. The spectrophotometric determination of the operational normality of an α -ChT solution.— J. Biol. Chem., 1961, v. 236, p. 2930—2935.
10. Березин И. В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа. М.: Высшая школа, 1977.
11. Bender M. L., Schonbaum G. R., Zerner B. Spectrophotometric investigations of the mechanism of α -chymotrypsin — catalyzed hydrolyses. Detection of the acyl-enzyme intermediate.— J. Amer. Chem. Soc., 1962, v. 84, p. 2562—2570.
12. Иммуobilizованные ферменты (Березин И. В., Антопов В. К., Мартинек К., ред.). М.: Изд-во МГУ, 1976.
13. Березин И. В., Клибанов А. М., Мартинек К. Кинетико-термодинамические аспекты катализа иммобилизованными ферментами.— Успехи химии, 1975, т. 44, с. 17—47.
14. Березин И. В., Мартинек К., Яцимирский А. К. Физико-химические основы мицеллярного катализа.— Успехи химии, 1973, т. 42, с. 1729—1756.
15. Martinek K., Yatsimirski A. K., Levashov A. V., Berezin I. V. The kinetic theory and the mechanisms of micellar effects on chemical reactions.— In: Micellization solubilization and microemulsions (Mittal K. L., ed.). New York — London: Plenum Press, 1977, v. 2, p. 489—508.
16. Wong M., Thomas J. K., Novak T. Structure and state of water in reversed micelles.— J. Amer. Chem. Soc., 1977, v. 99, p. 4730—4736.

17. *Рейхардт Х.* Растворители в органической химии. Л.: Химия, 1973.
18. *Fendler J. H.* Interactions and reactions in reversed micellar systems.— *Acc. Chem. Res.*, 1976, v. 9, p. 153–161.
19. *Menger F. M., Donohue J. A., Williams R. F.* Catalysis in water pools.— *J. Amer. Chem. Soc.*, 1973, v. 95, p. 286–288.
20. *Ekwall P., Mandell L., Fontell K.* Some observations on binary and ternary AOT systems.— *J. Coll. Int. Sci.*, 1970, v. 33, p. 215–235.
21. *Левашов А. В., Паулин В. И., Мартинек К.* Кислотно-основной индикатор 2,4-динитрофенол в обращенных мицеллах АОТ в октано.— *Колл. ж.*, 1979, т. 16, с. 453–459.
22. *Хургин Ю. И.* Гидратация глобулярных белков.— *Ж. Всес. хим. о-ва*, 1976, т. 21, № 4, с. 684–690.
23. *Zulauf M., Eicke H. F.* Inverted micelles and microemulsions in the ternary system H₂O (AOT) *i*-octane as studied by photon correlation spectroscopy.— *J. Phys. Chem.*, 1979, v. 83, p. 480–486.
24. *Poon P. H., Wells M. A.* Physical studies of egg phosphatidyl-choline in diethyl ether — water solutions.— *Biochemistry*, 1974, v. 13, p. 4928–4936.
25. *Rouviere J., Couret J.-M., Lindheimer A., Lindheimer M., Brun B.* Structure des agregats inverses D'AOT. II. Effect de sel sur les micelles inverses.— *J. chim. Phys.*, 1979, v. 76, p. 297–301.

Поступила в редакцию
25.VIII.1980

**CATALYSIS BY ENZYMES ENTRAPPED IN REVERSED MICELLES
OF SURFACTANTS IN ORGANIC SOLVENTS. III. EFFECT OF HYDRATION
DEGREE OF AEROSOL OT IN OCTANE ON THE RATE
OF CINNAMYOL- α -CHYMOTRYPSIN HYDROLYSIS**

LEVASHOV A. V., KLYACHKO N. L., MARTINEK K.

M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

It has been shown that *N-trans*-cinnamoylimidazole is a substrate of chymotrypsin solubilized with the aid of aerosol OT (AOT) in octane, and this reaction can be used, as in aqueous solutions, for titration of active sites of the enzyme. The rate constant of *N-trans*-cinnamoyl- α -chymotrypsin deacylation has been studied as a function of pH and amount of solubilized water in the system AOT-water-octane. The p*K* of the enzyme ionogenic group controlling the reaction has been found to depend on H₂O content in the system. The dependence of the limit (pH-independent) rate constant of *N-trans*-cinnamoyl- α -chymotrypsin deacylation is bell-shaped, the rate constant under optimal conditions being the same as in water. Similar dependence on water content was found for the activity of nonhydrolytic enzyme lactate dehydrogenase solubilized in the system Brij 56-water-cyclohexane and for fluorescence intensity of *N*-acetyl-*L*-tryptophan in reversed AOT micelles in octane; possible reasons for the observed relations are discussed. The system can be of interest as a model to study properties of water incorporated in biomembranes and the role of water in protein structure and in mechanisms of enzymatic catalysis.