

УДК 612.124.017:577.15

## ОСОБЕННОСТИ ИММОБИЛИЗАЦИИ СУБСТРАТА И КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТРИПСИНА В ОБРАЩЕННОЙ МИКРОЭМУЛЬСИИ

Ю.Ф. Зуев, Н.Л. Захарченко, Е.А. Ступишина, Д.А. Файзуллин, Н.Н. Вылегжанина

(Казанский институт биохимии и биофизики КНЦ РАН; e-mail: zuev@mail.knc.ru)

При совместном изучении перколяционных переходов в микроэмульсии вода–масло и скорости гидролиза  $N\alpha$ -бензоил-L-аргинин этилового эфира (BAEE) и  $N\alpha$ -бензоил-DL-аргинин-*n*-нитроанилида (BAPNA) трипсином показано, что эффективность действия иммобилизованного в обращенных мицеллах фермента помимо прочих факторов зависит от локализации субстрата и доступности его атакуемого центра.

Изучение зависимости каталитических свойств ферментов от структурных особенностей микроэмульсионной реакционной среды важно для понимания природы взаимодействий в белково-мицеллярных комплексах, а также молекулярных механизмов функционирования ферментов при их иммобилизации в микроэмульсионных системах. Существует большое количество работ по каталитическим свойствам ферментов в обращенных микроэмульсиях [1–3], однако информации о локализации субстрата в этих системах, а следовательно, о его доступности для функционирования фермента недостаточно. Цель настоящей работы состояла в выяснении взаимосвязи между особенностями иммобилизации субстрата и реакционной способностью трипсина в обращенных мицеллах.

### Методы исследования

В работе использовали трипсин (Т-0303, IX-S, *Sigma*). Для ферментативного гидролиза были взяты разные по степени гидрофильности специфические катионные субстраты: гидрофильный субстрат  $N\alpha$ -бензоил-L-аргинин этилового эфира (BAEE, *Sigma*) в концентрации  $1,3 \times 10^{-3}$  М и более гидрофобное соединение  $N\alpha$ -бензоил-DL-аргинин-*n*-нитроанилид (BAPNA, *Sigma*) в концентрации  $(5-15) \times 10^{-5}$  М. Структурные формулы субстратов приведены на рис. 1. Навески BAPNA предварительно растворяли в диметилсульфоксиде и вносили в виде концентрированного раствора в буфер (0,1 М трис-НСl, pH 8,2). Концентрация фермента в измерительной кювете ( $E_0$ ) при гидролизе BAEE составляла  $1,2 \cdot 10^{-6}$  М, при гидролизе BAPNA –  $9,3 \times 10^{-6}$  М. Кинетические измерения гидролиза BAEE проводили на полосе поглощения продукта (длина волны  $\lambda = 255$  нм, коэффициент экстинкции  $\epsilon = 700 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ ). При использовании BAPNA в качестве субстрата кинетические измерения проводили на полосе поглощения продукта реакции *n*-нитроанилина (длина волны 388 нм,  $\epsilon = 12440 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ ). Кинетику ферментативных реакций регистрировали при 20° на приборе “UV-VIS

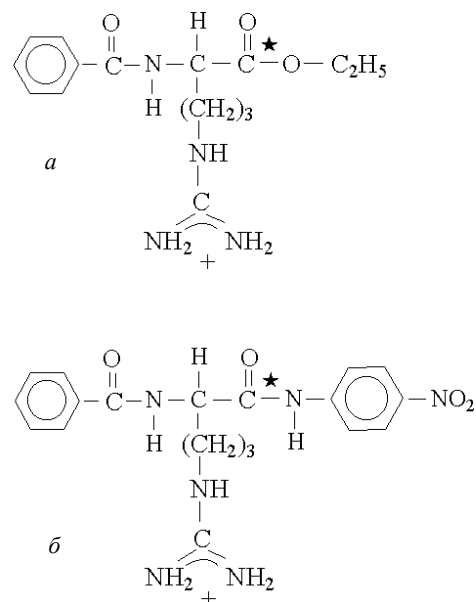


Рис. 1. Структурные формулы: *a* –  $N\alpha$ -бензоил-L-аргинин этилового эфира (BAEE); *б* –  $N\alpha$ -бензоил-DL-аргинин-*n*-нитроанилида (BAPNA); звездочкой показана атакуемая химическая связь

*SPECORD M40*”). Начальную скорость ферментативной реакции ( $V_0$ ) определяли по наклону линейной части кривой накопления продукта во времени в течение 30–40 с после начала реакции. Значение  $V_0$  определяли по формуле  $V_0 = D/\epsilon l \Delta t$ , где толщина кюветы  $l = 0,5$  см.

При использовании микроэмульсии вода–масло на основе анионного ПАВ бис(2-этилгексил)сульфосукцината натрия (АОТ) производства *Serva* в качестве органического растворителя использовался декан. Концентрация АОТ в микроэмульсии ( $C_{\text{АОТ}}$ ) составляла 0,42 М, молярное отношение воды (буферный раствор) к ПАВ  $W_0 = 20$ . Структурные [4–6] и каталитические [7, 8] свойства микроэмульсии вода–АОТ–декан были изучены нами ранее. Из других работ известно, что при  $W_0 = 20$  стабилизируется большинство физико-химических характеристик обращенных мицелл, например, уровень гидратации молекул АОТ [9, 10]. Размер обращенных мицелл

**Начальная скорость ( $V_0$ ) гидролиза ВАЕЕ и ВАРНА трипсином в буферном растворе и в микроэмульсии на основе АОТ ( $T = 20^\circ$ )**

Реакционная среда	Начальная скорость гидролиза, $M \cdot c^{-1}$	
	<i>BAEE</i> , $E_0=1,2 \cdot 10^{-6} M$ , $S_0=1,3 \cdot 10^{-3} M$	<i>VARNA</i> , $E_0=9,3 \cdot 10^{-6} M$ , $S_0=12,0 \cdot 10^{-5} M$
Буфер (0,1 М трис–HCL, pH 8,2)	$10,7 \cdot 10^{-6}$	$0,37 \cdot 10^{-6}$
АОТ – декан – буфер, $W_0=20$ , $C_{AOT}=0,42 M$	$9,5 \cdot 10^{-6}$	не фиксируется

существенно не изменяется при солюбилизации в них молекул трипсина [11], а в изученном интервале температур используемая микроэмульсия сохраняет свою мицеллярную структуру [12]. Кроме того, были использованы микроэмульсии на основе катионного ПАВ цетилтриметиламмоний бромида (*Merck*) с *n*-бутанолом в качестве со-ПАВ и гексаном в качестве органической среды. Соотношение компонент этой микроэмульсии было подобрано таким образом, чтобы максимально приблизиться к микроэмульсии на основе АОТ по размеру водных ядер обращенных мицелл и концентрации дисперсной фазы.

Локализацию субстратов в микроэмульсии изучали с помощью измерения электропроводности кондуктометром ОК-102 (“*Radelkis*”, Венгрия) на частотах 50 Гц и 3 кГц.

### Результаты исследования и их обсуждение

В таблице представлены данные кинетических исследований процесса гидролиза ВАЕЕ и ВАРНА трипсином в микроэмульсии на основе АОТ. Как оказалось, гидролиз ВАЕЕ, подробно изученный нами ранее [8], идет как в буферном растворе трипсина, так и при его иммобилизации в обращенных мицеллах. В случае ВАРНА продукт гидролиза в микроэмульсии на основе

АОТ не был зафиксирован. Мы предположили, что в отличие от ВАЕЕ, который вследствие хорошей растворимости в воде локализуется, как и трипсин, в водных ядрах обращенных мицелл, строение ВАРНА не позволяет ему осуществить реакционный контакт с ферментом в микроэмульсионной среде. Для проверки этой гипотезы были проведены сравнительные исследования электрической перколяции в микроэмульсиях, содержащих оба субстрата.

В основе явления перколяции в микроэмульсиях вода–масло лежит процесс кластеризации (ассоциации) обращенных мицелл, позволяющий ионам “перескакивать” с мицеллы на мицеллу при обмене веществом в процессе их кратковременного слияния [4, 12–16]. Возникающая вследствие переноса ионов электрическая проводимость микроэмульсии вода–масло возрастает на три–четыре порядка при изменении температуры ( $T$ ) или удельной доли дисперсной фазы ( $\Phi$ ). Точка максимального роста электропроводности соответствует перколяционному переходу, а соответствующие значения  $T_p$  и  $\Phi_p$  являются характеристиками конкретной микроэмульсии, которые могут зависеть от многих факторов, в частности от введения в микроэмульсию дополнительных реагентов. Влияние добавок, взаимодействующих непосредственно с монослоем молекул

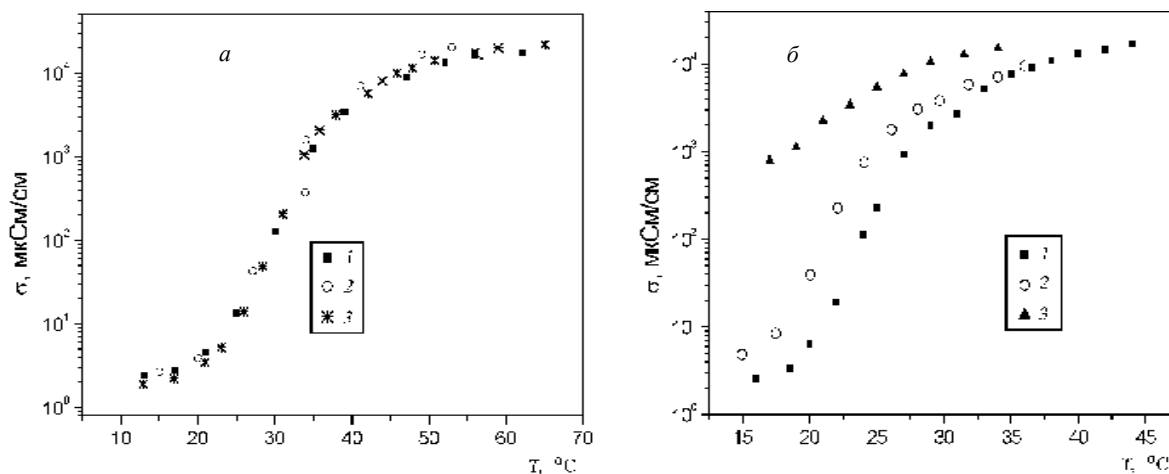


Рис. 2. Температурные перколяционные переходы в микроэмульсиях на основе АОТ в присутствии: *a* – ВАЕЕ (при  $C_{BAEE}$  (M): 1 – контроль; 2 –  $0,9 \cdot 10^{-3}$ ; 3 –  $1,3 \cdot 10^{-3}$ ); *б* – ВАРНА (при  $C_{BAEE}$  (M): 1 –  $1,2 \cdot 10^{-4}$ ; 2 –  $2,4 \cdot 10^{-4}$ ; 3 –  $4,8 \cdot 10^{-4}$ );  $W_0 = 20$ ,  $C_{AOT} = 0,42 M$

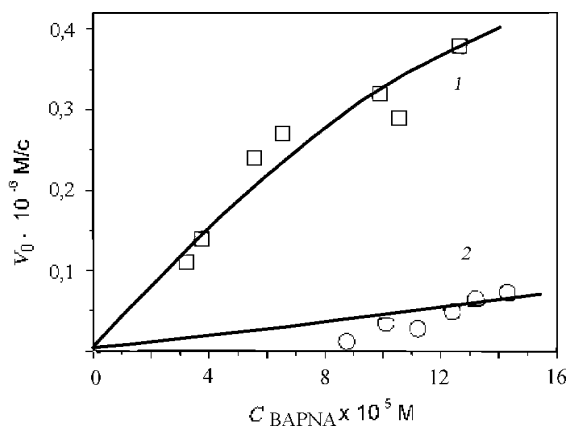


Рис. 3. Начальная скорость гидролиза BAPNA трипсином в буферном растворе (1) и в микроэмульсии на основе ЦТАБ (2)

ПАВ, образующим границу раздела водного ядра мицелл и непрерывной органической фазы, может проявляться в блокировке перколяции (увеличение значений  $T_n$  и  $\Phi_n$ ) или облегчении формирования путей переноса зарядов (уменьшение значений  $T_n$  и  $\Phi_n$ ) [17].

Изученные нами субстраты оказывают разное влияние на перколяцию в микроэмульсиях на основе АОТ (рис. 2). В отличие от ВАЕЕ, который концентрируется в водных ядрах обращенных мицелл и не влияет на положение перколяционного перехода (рис. 2, а), существенное изменение  $T_n$  в случае с BAPNA (рис. 2, б) свидетельствует о его локализации на границе раздела

водной и органической фаз. Локализация субстрата в монослое ПАВ не исключает возможность его контакта с ферментом, иммобилизованным в водном ядре обращенной мицеллы. Очевидно, это связано с ориентацией BAPNA в монослое АОТ. Можно предположить, что электростатическое взаимодействие положительного заряда BAPNA с отрицательно заряженными полярными головными группами АОТ и наличие у субстрата двух бензольных колец ориентируют его атакуемую связь (рис. 1, б) в сторону органической фазы, что делает ее недоступной для трипсина. Однако при замене АОТ на ЦТАБ скорость реакции гидролиза BAPNA в обращенной микроэмульсии на основе катионного ПАВ, хотя и уступает скорости в буферном растворе, имеет явно не нулевое значение (рис. 3). Это свидетельствует о том, что в результате электростатического отталкивания положительного заряда и головной группы ЦТАБ возникает такая ориентация молекул BAPNA, при которой у трипсина появляется доступ к атакуемой связи субстрата.

Таким образом, для реализации ферментативных реакций в мицеллярных средах (помимо многих других факторов) большое значение имеют не только локализация субстрата, но и его ориентация относительно активного центра фермента.

Авторы выражают свою признательность проф. А.В. Левашеву (МГУ) за ценные советы и постоянный интерес к их работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 02-03-32923).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rahaman R.S., Hatton T. // J. Phys. Chem. 1991. **95**. P. 1799.
2. Creagh A., Prausnitz J., Blanch H. // Enzyme Microb. Technol. 1993. **15**. P. 383.
3. Клячко Н.Л., Пшежецкий А.В., Кабанов А.В. и др. // Биол. мембраны. 1990. **7**. С. 467.
4. Feldman Y., Kozlovich N., Nir I. et al. // J. Phys. Chem. 1996. **100**. P. 3745.
5. Fedotov V.D., Zuev Yu.F., Archipov V.P. et al. // Colloids and Surfaces A. 1997. **128**. P. 39.
6. Архипов В.П., Идиятуллин З.Ш., Архипов Р.В. и др. // Коллоидный ж. 2000. **62**. № 4. С. 456.
7. Zakharova L.Ya., Valeeva F.G., Kudryavtseva L.A. et al. // Mendeleev Communications. 1998. № 6. P. 224.
8. Stupishina E.A., Faizullin D.A., Zakharchenko N.L. et al. // Mendeleev Communications. 2001. № 6. P. 237.
9. Hauser H., Haering G., Pande A., Luisi P.L. // J. Phys. Chem. 1989. **93**. P. 7869.
10. Jain T.K., Varshney M., Maitra A. // J.Phys. Chem. 1989. **93**. P. 7409.
11. Шаниро Ю.Е., Горбатюк В.Я., Левашов А.В., Клячко Н.Л. // Биол. мембраны. 1993. **10**. С. 293.
12. Alexandridis P., Holzwarth J., Hatton T. // J. Phys. Chem. 1995. **99**. P. 8222.
13. Safran S.A., Webman I., Grest G.S. // Phys. Rev. A. 1985. **32**. P. 506.
14. Eicke H.F., Bercovec M., Das-Gupta B. // J. Phys. Chem. 1989. **93**. P. 314.
15. Jada A., Lang J., Zana R. // J. Phys. Chem. 1989. **93**. P. 10.
16. Feldman Y., Kozlovich N., Nir I., Garti N. // Phys. Rev. E. 1995. **51**. P. 478.
17. Hait S.K., Moulik S.P., Rodgers M.P. et al. // J. Phys. Chem. B. 2001. **105**. P. 7145.

Поступила в редакцию 25.10.02