



УДК 577.152.110.32.03:541.128.135

© 1992 г. А. К. Гладилин, Ю. Л. Хмельницкий*,
В. Л. Рубайло, К. Мартинек**, А. В. Левашиов***

**ПОЛИМЕРНЫЕ ОБРАЩЕННЫЕ МИЦЕЛЛЫ НА ОСНОВЕ
МОДИФИЦИРОВАННОГО ПОЛИЭТИЛЕНИМИНА. ПОЛУЧЕНИЕ
И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В КАЧЕСТВЕ НЕВОДНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ
ПРОВЕДЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ (НА ПРИМЕРЕ
ЛАККАЗЫ И α -ХИМОТРИПСИНА)**

Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, Москва;

** Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва;*

*** Институт органической химии и биохимии ЧСАН, Прага;*

**** Московский государственный университет, химический факультет*

Предложена новая микрогетерогенная неводная среда для проведения ферментативных реакций, основанная на обращенных мицеллах полимерного поверхностно-активного вещества (СЕ-РЕИ), синтезированного последовательной модификацией полиэтиленimina (РЕИ) цетилбромидом и этилбромидом. В растворах полученного полимера СЕ-РЕИ в смесях бензол – *n*-бутанол наблюдалась солюбилизация значительных количеств воды. Гидродинамический радиус обращенных мицелл, оцененный методом квазиупругого рассеяния лазерного света, составил 20–50 нм в зависимости от содержания воды в системе. Полимерные обращенные мицеллы способны солюбилизировать ферменты (лакказу и α -химотрипсин) в неполярных растворителях с сохранением каталитической активности. СЕ-РЕИ, обладая сильными буферными свойствами в широком диапазоне рН, способен поддерживать предварительно доведенное значение рН внутри полимерной обращенной мицеллы. Каталитическая активность включенных ферментов зависела главным образом от кислотности полимерного ПАВ, при этом водный буферный раствор, вводимый в систему, может быть заменен на дистиллированную воду. Ферменты, включенные в полимерные обращенные мицеллы, достаточно стабильны для проведения в системе ферментативных реакций. Установлена возможность длительного хранения ферментов в виде готовой формы в составе «сухого фермент-полимерного комплекса». При помощи двухкамерного мембранного реактора продемонстрирована принципиальная возможность регенерации фермента и отделения от полимерного ПАВ продукта ферментативной реакции, проведенной в системе полимерных обращенных мицелл.

В последнее время наблюдается возрастающий интерес исследователей к конструированию биокаталитических систем в органических растворителях с малым содержанием воды (см. обзоры [1, 2]). Использование таких систем позволяет решить ряд важных вопросов: превращение водонерастворимых субстратов, сдвиг термодинамического равновесия реакций в сторону образования требуемых продуктов, подбор оптимального микроокружения фермента. Одной из наиболее перспективных биокаталитических систем в органической среде являются гидратированные обращенные мицеллы ПАВ [1]. К преимуществам этих систем следует отнести

Сокращения: ПАВ – поверхностно-активное вещество; РЕИ – полиэтиленимин; СЕ-РЕИ – полиэтиленимин, модифицированный цетилбромидом и этилбромидом; Bz-Tyr-pNa – *p*-нитроанилид *N*-бензил-L-тирозина.

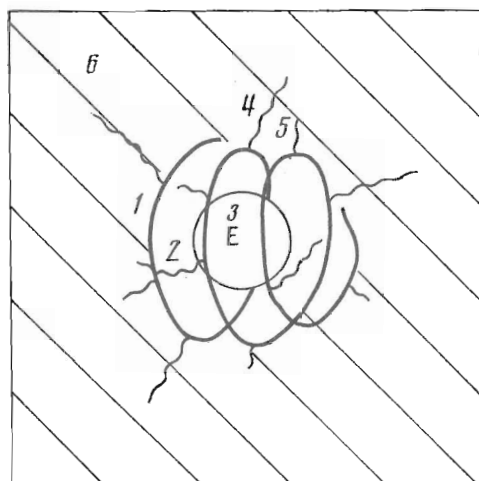


Рис. 1. Предполагаемая схема строения ферментсодержащей полимерной обращенной мицеллы: 1 — основная цепь SE-PEI, несущая положительные заряды на атомах азота; 2 — внутренняя водная полость обращенной мицеллы; 3 — молекула фермента, 4 — цетиловая боковая цепь; 5 — этиловая боковая цепь; 6 — органический растворитель

универсальность (в настоящее время продемонстрировано сохранение каталитической активности нескольких десятков ферментов различных классов в таких системах), оптическую прозрачность, практически полное отсутствие диффузионных ограничений, простоту приготовления. Однако с точки зрения практического применения системы обращенных мицелл не лишены существенного недостатка, который заключается в сложности отделения продукта ферментативной реакции, проведенной в такой системе, от ПАВ. Возможным решением этой проблемы нам представляется использование полимеров в качестве ПАВ. В этом случае продукт ферментативной реакции и высокомолекулярное ПАВ можно разделить по размерам.

Один из путей создания полимерных обращенных мицелл заключается в сополимеризации полимерного ПАВ с водорастворимым мономером (таким, как акриламид) в составе готовой обращенной мицеллы. Этот способ был предложен нами недавно [3]. В результате реакции образуются так называемые поверхностно-модифицированные полимерные наногранулы, представляющие собой сферические частицы с жестким (полиакриламидным) ядром, с которым ковалентно связаны гидрофобные фрагменты полимерного ПАВ. Если перед стадией сополимеризации в систему ввести фермент, он включается в наногранулы с сохранением каталитической активности в среде органического растворителя. Недостатком таких систем являются жесткие условия получения полимерных наногранул: при проведении реакции радикальной сополимеризации в ряде случаев наблюдается инактивация ферментов [4].

Решением данной проблемы может стать использование для создания полимерных обращенных мицелл предварительно приготовленных полимерных ПАВ. В литературе нет данных о включении белков (ферментов) в полимерные обращенные мицеллы в органических растворителях. В то же время при изучении ряда амфифильных разветвленных [5—9] и блок-сополимеров [10—14] установлено, что они способны образовывать обра-

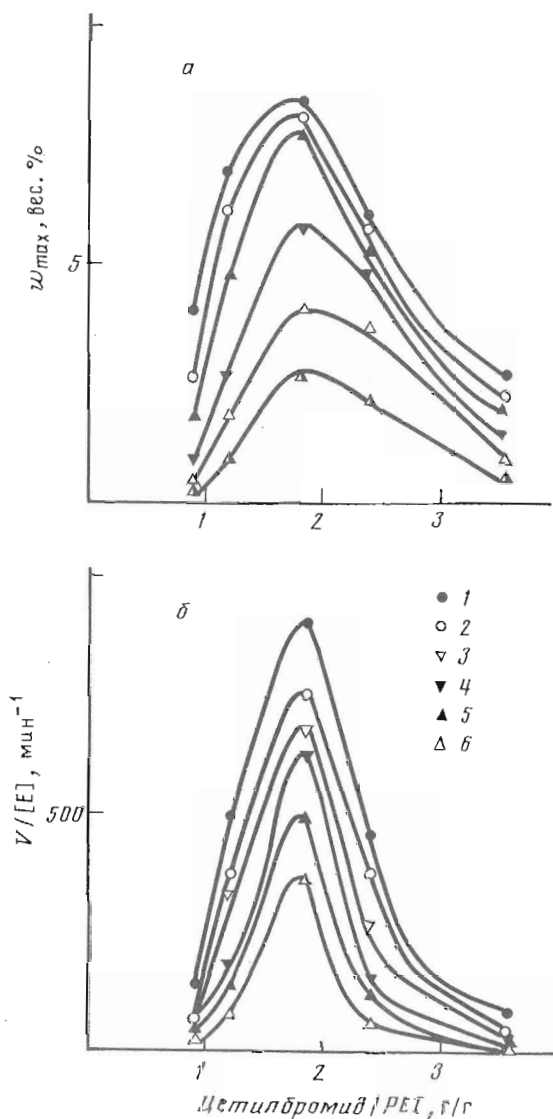


Рис. 2. Зависимость максимальной солюбилизации воды, $w_{\max}$ (а) и каталитической активности лакказы, включенной в полимерные обращенные мицеллы, $V/[E]$ (б), от исходного соотношения цетилбромида и РЕИ в реакционной смеси при синтезе СЕ-РЕИ. Объемное соотношение бензол – *n*-бутанол: 2:1 (1); 8:5 (2); 8:3 (3); 4:3 (4); 8:7 (5); 4:1 (6). Фермент солюбилизировали в виде раствора в 0,05 М цитратном буфере, pH 4,5. $pH_{\text{эф}}$ СЕ-РЕИ 4,8 во всех случаях. Значения $V/[E]$ измеряли в условиях максимальной солюбилизации воды, когда каталитическая активность лакказы, включенной в полимерные обращенные мицеллы, максимальна (см. текст)

щенные мицеллярные структуры в органических растворителях. В некоторых случаях было также показано, что такие полимерные обращенные мицеллы способны солюбилизовать значительные количества воды в неполярных растворителях [5, 12]. Однако приготовление высокомолекулярных ПАВ, описанных в работах [5–14], включает в себя сложные, с нашей точки зрения, синтетические процедуры, что ограничивает возможности практического применения этих полимеров.

Таким образом, цель данной работы состояла, во-первых, в поиске и осуществлении достаточно простого метода синтеза полимерного ПАВ, образующего полимерные обращенные мицеллы, способные солюбилизировать значительные количества воды, во-вторых, во включении в полимерные обращенные мицеллы ферментов с сохранением каталитической активности, в-третьих, в установлении принципиальной возможности отделения продукта ферментативной реакции, проведенной в таких системах, от ПАВ.

Оптимизация системы

Для приготовления полимерного ПАВ в качестве исходного полимера мы выбрали полиэтиленimina, так как, с одной стороны, это достаточно дешевый коммерческий препарат, с другой — в литературе подробно описана методика модификации его алкилбромидами. В результате последовательной модификации PEI цетил- и этилбромидом был получен амфифильный полимер SE-PEI, в котором часть атомов азота алкилирована цетильными радикалами, в то время как остальные доступные для модификации атомы азота алкилированы этильными радикалами. В модифицированном полимере бромид-анионы выступают в качестве противоионов к положительно заряженным атомам азота, т. е. SE-PEI представляет собой катионное полимерное ПАВ. Учитывая это, мы исследовали возможность использования тех растворителей, которые обычно применяются для создания способных солюбилизовать воду обращенных мицеллярных систем на основе катионных ПАВ: октан — хлороформ, *n*-октанол, бензол — *n*-бутанол [15]. SE-PEI растворялся во всех указанных растворителях, однако солюбилизация воды наблюдалась только в растворах SE-PEI в смеси бензол — *n*-бутанол, которая и использовалась во всех дальнейших экспериментах. Более того, оказалось, что выбранная система способна солюбилизовать значительные количества водных растворов ферментов с сохранением каталитической активности. Нам удавалось легко получать мицеллярные системы, содержащие ферменты в микромолярных концентрациях, т. е. в количествах, достаточных для изучения ферментативных реакций, протекающих в системе. Для изучения закономерностей ферментативного катализа в системе полимерных обращенных мицелл были использованы ферменты различных классов — лакказы и α -химотрипсин (окислительно-восстановительный и гидролитический ферменты соответственно). Мы полагаем, что солюбилизация происходит благодаря образованию полимерных обращенных мицелл, предполагаемое строение которых схематически представлено на рис. 1. В такой мицелле основная цепь SE-PEI, несущая положительные заряды, образует внутреннюю оболочку, окружающую водную полость, содержащую солюбилизированную молекулу фермента. Гидрофобные цетильные и этильные боковые цепи обращены к органическому растворителю.

Солюбилизирующая способность растворов SE-PEI в смеси бензол — *n*-бутанол и каталитическая активность включенных в полимерные обращенные мицеллы ферментов зависят от амфифильных свойств полимера, определяющихся главным образом содержанием цетильных боковых цепей в молекуле SE-PEI, и состава внешней органической фазы. Поэтому для создания оптимальной системы с наивысшей солюбилизирующей способностью и максимальной каталитической активностью включенных ферментов мы изучили зависимость солюбилизации воды и каталитической активности включенной в полимерные обращенные мицеллы лакказы от соотношения цетилбромид — PEI при синтезе SE-PEI (которое определяет содержание цетильных боковых цепей в получаемом полимере) и соотношения бензол — *n*-бутанол в системе. Результаты показали (рис. 2), что

Таблица 1

Размеры полимерных обращенных мицелл и стабильность лакказы в исследуемой системе

Концентрация воды вес. %	Гидродинамический радиус мицелл, нм	$k_{ин} \cdot 10^2, \text{ч}^{-1}$
3,6	$22,0 \pm 5,0$	10,0
5,2	$28,5 \pm 5,0$	7,9
6,9	$51,0 \pm 10,0$	5,5
8,4		4,2

как максимальная сольubilизация воды, так и наивысшая каталитическая активность включенной лакказы наблюдаются во всех случаях при весовом соотношении цетилбромид — PEI, равном 1,82. Более того, максимальный уровень сольubilизации воды и каталитической активности включенной лакказы наблюдается в случае системы с объемным соотношением бензол — *n*-бутанол 2 : 1 (кривые 1 на рис. 2а и 2б). Аналогичные значения были определены при изучении зависимости каталитической активности включенного в полимерные обращенные мицеллы α -химотрипсина от соотношений цетилбромид — PEI и бензол — *n*-бутанол. Полученные соотношения использовались во всех дальнейших экспериментах.

СЕ-PEI, синтезированный при оптимальном весовом соотношении цетилбромид — PEI 1,82, представляет собой желтый порошок, хорошо растворимый в алифатических спиртах и смесях алифатический углеводород — хлороформ и ароматический углеводород — алифатический спирт, умеренно растворимый в воде ($\sim 0,1$ мг/мл) и нерастворимый в диэтиловом эфире и чистых углеводородах. При исследовании образца данного полимера методом элементного анализа были получены следующие результаты (вес. %): С 48,42, Н 9,66, N 9,74, Br 32,18. Такие значения соответствуют структуре СЕ-PEI, в которой 17% атомов азота модифицировано цетильными, 53% — этильными радикалами. Молекулярная масса СЕ-PEI, рассчитанная исходя из такой структуры полимера, составляет 110—140 кДа.

Для оценки размеров полимерных обращенных мицелл был использован метод квазиупругого рассеяния лазерного света. Результаты свидетельствуют (табл. 1), что полимерные обращенные мицеллы монотонно увеличиваются в размерах при возрастании содержания воды в системе. Такие же закономерности наблюдались в случае систем обращенных мицелл низкомолекулярных ПАВ [1, 2].

Свойства ферментов, включенных в полимерные обращенные мицеллы. Влияние pH на каталитические параметры ферментов

Модифицированный полимер, являясь полиэлектролитом, обладает сильными буферными свойствами в широком диапазоне pH (2,0—9,5). Исходя из этого можно ожидать, что каталитические свойства ферментов, включенных в полимерные обращенные мицеллы, будут зависеть не только от pH вводимого в систему водного буферного раствора, но и от кислотности используемого образца полимерного ПАВ, т. е. от величины $pH_{эф}$ СЕ-PEI. Результаты изучения зависимости каталитической активности лакказы и α -химотрипсина, включенных в полимерные обращенные мицеллы, от pH водного буферного раствора и $pH_{эф}$ полимера представлены на рис. 3 (для лакказы) и рис. 4а (для α -химотрипсина). Видно (рис. 3, 4а), что включенный фермент действительно гораздо чувствительнее к изменениям pH, обусловленным полимерным ПАВ, т. е. $pH_{эф}$, чем к

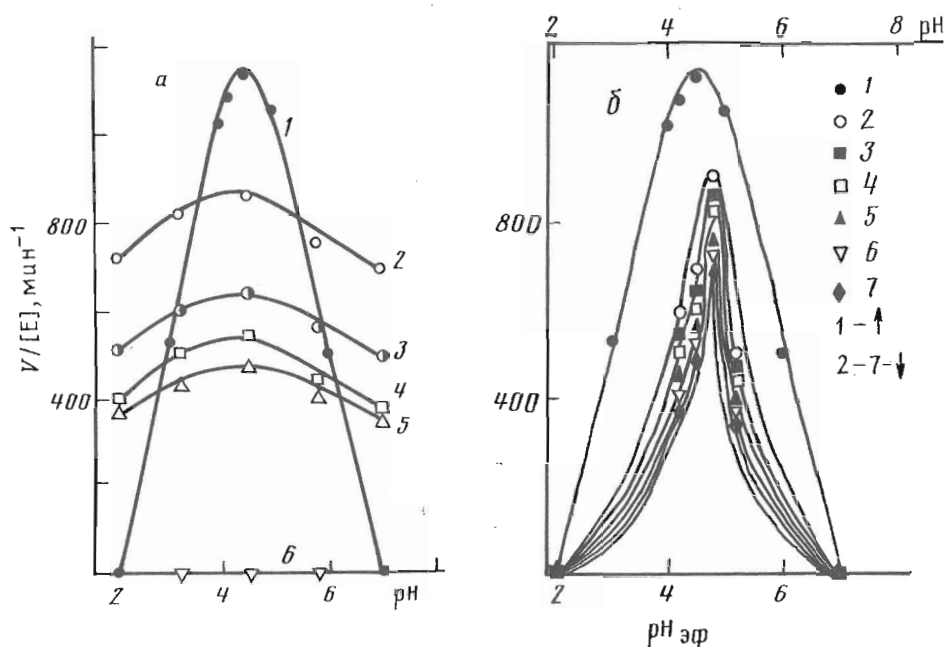


Рис. 3. Влияние pH водного буферного раствора (а) и $\text{pH}_{\text{эф}}$ полимера (б) на каталитическую активность лакказы, включенной в полимерные обращенные мицеллы. Условия определения: $w=8,4$ вес.%, вводимый буферный раствор — 0,05 М цитрат Na; для сравнения приведен профиль pH-зависимости, полученный в водном растворе (кривая 1). а — значения $\text{pH}_{\text{эф}}$: 4,8 (2); 4,5 (3); 4,2 (4); 5,2 (5); 2,0 и 7,0 (6). б — значения pH буферного раствора: 4,5 (3); 3,2 (4); 5,8 (5); 7,0 (6); 2,0 (7); кривая 2 получена при использовании дистиллированной воды в качестве водного компонента.

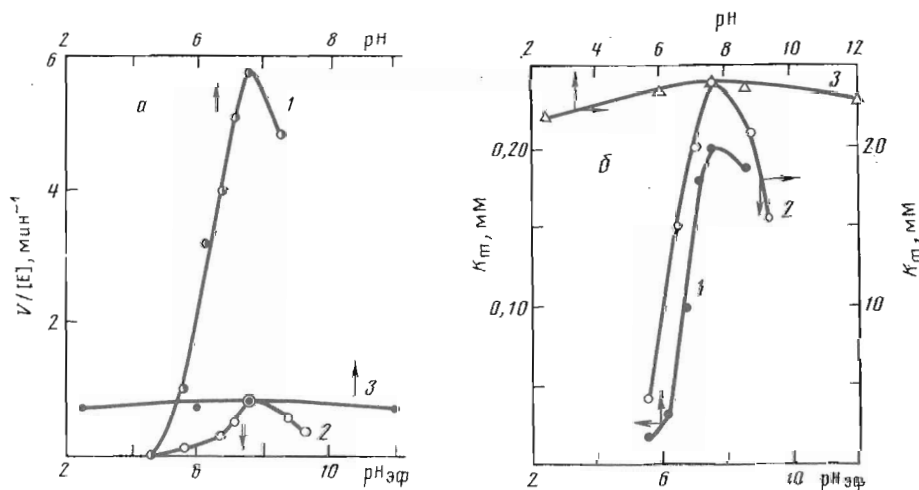


Рис. 4. Влияние на каталитическую активность α -химотрипсина (а) и на константу Михаэлиса для Вэ-Туг-рNa (б) pH водного буферного раствора (1, 3) и $\text{pH}_{\text{эф}}$ полимера (2) при проведении реакции в водном растворе (1) и в полимерных обращенных мицеллах (2, 3). Условия определения: $w=6,9$ вес.%, 0,05 М Na-фосфатный буфер. 2 — pH буфера 7,6 (аналогичная кривая получена при использовании в качестве водного компонента дистиллированной воды); 3 — $\text{pH}_{\text{эф}}$ 7,6.

изменениям pH вводимого водного буферного раствора. Так, максимумы на кривых 2—6 (рис. 3а), отражающих зависимость каталитической активности лакказы от pH водного буферного раствора, в значительной степени сглажены по сравнению с максимумами на кривых 3—7 (рис. 3б), описывающих зависимость каталитической активности лакказы от $pH_{эф}$ CE-PEI. Эта тенденция проявляется также в случае α -химотрипсина (ср. кривые 2 и 3 на рис. 4а). Более того, вместо водного буферного раствора можно использовать дистиллированную воду в качестве единственного водного компонента системы. При этом эффективный pH микроокружения фермента внутри полимерной обращенной мицеллы определяется исключительно кислотностью полимерного ПАВ. В этом случае каталитическая активность α -химотрипсина не изменяется по сравнению с активностью в системе, содержащей буферный раствор (рис. 4а, 2), в то время как каталитическая активность лакказы становится даже несколько выше (рис. 3б, 2). Необходимо отметить, что положение оптимумов зависимости каталитической активности от $pH_{эф}$, определенных для лакказы и α -химотрипсина, включенных в полимерные обращенные мицеллы, практически совпадает с положением pH-оптимумов, наблюдаемых в водных растворах (кривые 1 на рис. 3 и 4а).

Закономерности, аналогичные описанным выше, наблюдались также при изучении влияния pH на значения K_m катализируемой α -химотрипсином реакции гидролиза Bz-Tyr-pNA. Результаты показали (рис. 4б), что величина K_m , определенная в системе полимерных обращенных мицелл, практически не зависит от pH вводимого буферного раствора (кривая 3), но обнаруживает сильную зависимость от $pH_{эф}$ CE-PEI (кривая 2); при этом профиль pH-зависимости в последнем случае сходен с pH-профилем, наблюдаемым в водном растворе (кривая 1).

Поскольку наличие буфера не обязательно для проявления каталитической активности ферментов, включенных в полимерные обращенные мицеллы, все дальнейшие исследования проводились с использованием дистиллированной воды в качестве водного компонента и CE-PEI, предварительно доведенного до оптимального значения $pH_{эф}$ (4,8 для лакказы, рис. 3б, и 7,6 для α -химотрипсина, рис. 4а).

Следует подчеркнуть, что способность полимерного ПАВ поддерживать любое значение pH (в диапазоне 2,0—9,5), требуемое для проявления максимальной каталитической активности включаемого фермента, внутри обращенной мицеллы открывает новый путь регулирования pH микроокружения включенного в мицеллы фермента, а именно при помощи $pH_{эф}$ полимера вместо pH вводимого буферного раствора.

Влияние концентрации воды на каталитические параметры ферментов

Зависимость кинетических параметров ($V/[E]$ и K_m) реакций, катализируемых лакказой и α -химотрипсином, от концентрации воды, w , в системе полимерных обращенных мицелл представлена на рис. 5. Как каталитическая активность, так и константа Михаэлиса в случае обоих ферментов монотонно возрастают с увеличением w вплоть до предела сольватации воды, обозначенного стрелками (8,4 вес. % в случае лакказы и 6,9 вес. % в случае α -химотрипсина). Максимальная каталитическая активность лакказы в мицеллярной системе составляет ~80%, а α -химотрипсина ~13% от соответствующих значений, наблюдаемых в водном растворе.

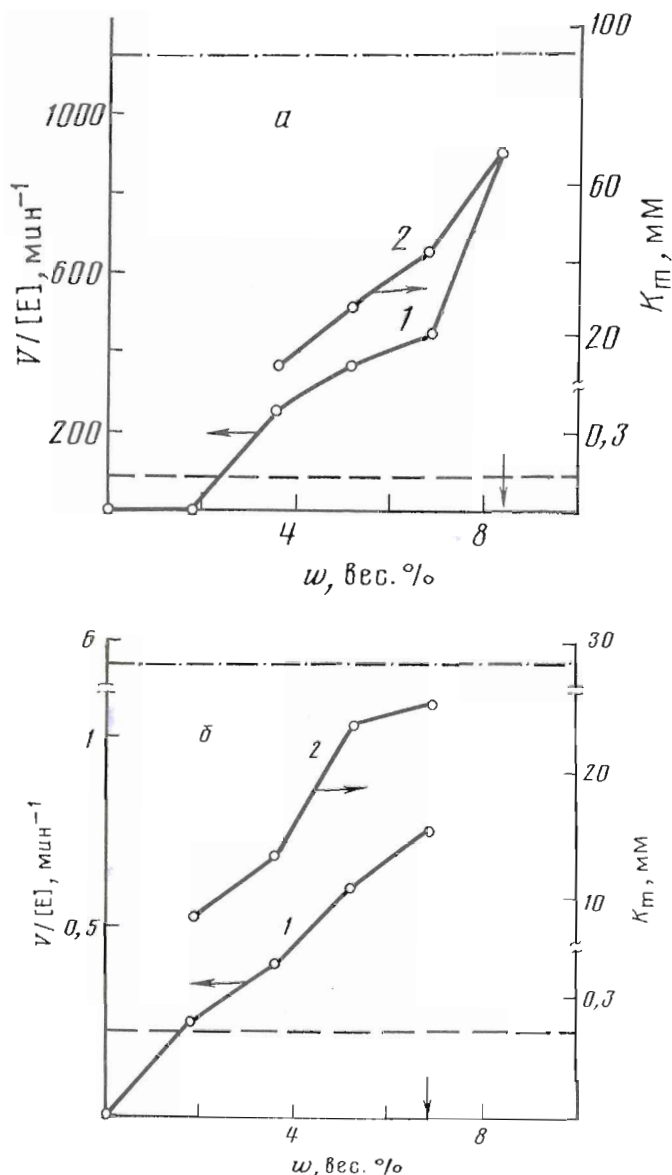


Рис. 5. Влияние содержания воды в системе полимерных обращенных мицелл на каталитическую активность (1) и величину K_m (2), определенные для реакций окисления пирокатехина и гидролиза Bz-Tyr-pNA, катализируемых лакказой (а, $pH_{оп}$ 4,8) и α -химотрипсином (б, $pH_{оп}$ 7,6) соответственно. Значения соответствующих параметров, измеренные в водном растворе, показаны штрихпунктирной (каталитическая активность) и штриховой (константа Михаэлиса) линиями. Стрелками обозначены пределы солюбилизации воды в системе.

Стабильность ферментов

Лакказа. Во всех изученных случаях процесс инактивации лакказы описывался кинетическим уравнением первого порядка. Зависимость константы скорости инактивации первого порядка ($k_{ин}$) от содержания воды в системе полимерных обращенных мицелл при 20° С представлена в табл. 1. Видно, что с увеличением концентрации воды стабильность лак-

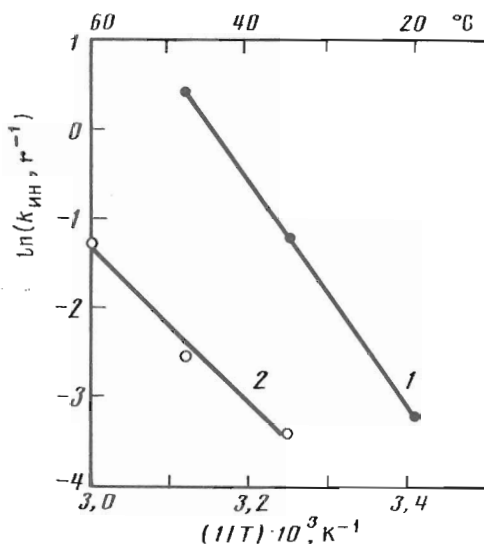


Рис. 6. Влияние температуры на константы скорости и активации лакказы, включенной в полимерные обращенные мицеллы СЕ-РЕИ ($pH_{эф}$ 4,8, $w=8,4$ вес.%) (1) и растворенной в водном буферном растворе (2). Общая концентрация лакказы 0,33 мкМ

казы возрастает, оставаясь, однако, значительно ниже, чем у нативного фермента в водном растворе. В последнем случае не наблюдалось какого-либо изменения каталитической активности в течение по крайней мере 24 ч. Стабильность лакказы, включенной в полимерные обращенные мицеллы, сравнима с соответствующими характеристиками фермента, полученными в других неводных микроэмульсионных системах [16].

Термостабильность лакказы была изучена в интервале температур 20–45° С. Результаты представлены на рис. 6 в координатах Аррениуса. Видно, что термостабильность фермента в системе полимерных обращенных мицелл (кривая 1) ниже, чем в водном растворе (кривая 2). Более того, фермент, включенный в полимерные обращенные мицеллы, более чувствителен к изменениям температуры, чем фермент, находящийся в водном растворе. Это показывает сравнение энергий активации, определенных из рис. 6 (102,15 и 70,79 кДж/моль соответственно). Надо отметить, что ферменты, включенные в обращенные мицеллы низкомолекулярных ПАВ, обладают низкой термостабильностью: уже при температурах, немного превышающих 30° С, наблюдается практически полная потеря каталитической активности [1]. Применение систем полимерных обращенных мицелл позволяет расширить температурный интервал использования ферментов в обращенных мицеллярных средах.

α -Химотрипсин. Результаты изучения стабильности α -химотрипсина (табл. 2) свидетельствуют, что если при инкубировании α -химотрипсина в водном растворе через 24 ч остается ~10% активности фермента в начальный момент времени, то при инкубировании в системе полимерных обращенных мицелл в зависимости от содержания воды в системе через тот же промежуток времени остается ~50 или даже 100% активности. Таким образом, стабильность α -химотрипсина в системе полимерных обращенных мицелл выше, чем в водном растворе. С другой стороны, стабильность α -химотрипсина в системе полимерных обращенных мицелл сравнима или значительно превышает соответствующие характеристики фер-

Стабильность α -химотрипсина в водном растворе (1)
и в системе полимерных обращенных мицелл (2)

Система	Относительная активность фермента через 24 ч, %
1	10,8
2 ($w=6,9$ вес.%) *	48,4
2 ($w=5,2$ вес.%) *	99,1

* w — концентрация воды в системе полимерных обращенных мицелл.

мента, полученные в случае других неводных микроэмульсионных систем [17, 18]. В целом можно сделать заключение, что ферменты, включенные в полимерные обращенные мицеллы, достаточно стабильны для проведения в таких системах ферментативных реакций.

«Сухой комплекс» α -химотрипсина с модифицированным полимером

Мы изучили возможность хранения α -химотрипсина в виде готовой формы в составе «сухого комплекса» фермента с модифицированным полиэтиленимином, $pH_{эф}$ которого был предварительно доведен до требуемого значения. При растворении «сухого комплекса», полученного, как описано в «Экспериментальной части», в смеси бензол — n -бутанол нам удавалось солидифицировать такое же количество водного компонента, что и при изначальном приготовлении системы. При добавлении субстрата к такому раствору полимерных обращенных мицелл α -химотрипсин проявлял каталитическую активность. Особо следует отметить, что значение $pH_{эф}$, заданное изначальное, оставалось неизменным после процедуры высушивания и при длительном хранении полимера в комплексе. Мы установили, что α -химотрипсин в составе «сухого комплекса» полностью сохраняет каталитическую активность при хранении в течение 3 мес при 20,4 и 20° С. Это открывает перспективы длительного хранения фермента в виде готовой формы в составе фермент-полимерного комплекса.

Катализ α -химотрипсином, включенным в полимерные обращенные мицеллы, в мембранном реакторе

Полимерные обращенные мицеллы, образуемые молекулами СЕ-РЕИ в смеси бензол — n -бутанол, обладают большим гидродинамическим радиусом (табл. 1) и достаточно устойчивы к диссоциации на отдельные молекулы полимера, что вытекает из данных, полученных для сходной полимерной мицеллярной системы [19]. Таким образом, полимерные обращенные мицеллы СЕ-РЕИ с включенным в них ферментом должны эффективно удерживаться полупроницаемой мембраной с диаметром пор, меньшим, чем гидродинамический радиус мицелл. Это предположение было экспериментально подтверждено при помощи двухкамерного мембранного реактора (рис. 7, вставка); подробное описание установки см. в «Экспериментальной части». После внесения в одну из камер реактора ферментосодержащей системы полимерных обращенных мицелл во второй камере, заполненной чистым органическим растворителем, полимер отсутствовал в течение по крайней мере 4 ч (наличие СЕ-РЕИ в концентрации 0,1% от концентрации полимера в камере, содержащей мицеллярную систему, может быть легко установлено по оптическому поглощению при длине

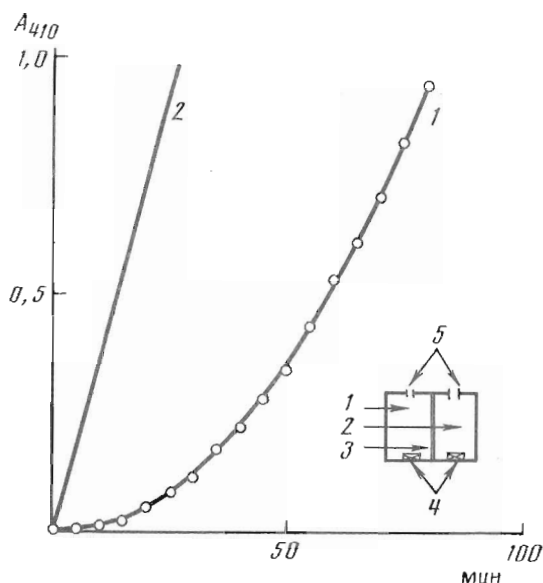


Рис. 7. Кинетика накопления *n*-нитроанилина, образующегося в результате гидролиза *Bz-Tyr-pNA*, катализируемого α -химотрипсином, включенным в полимерные обращенные мицеллы СЕ-РЕИ, в свободной от фермента камере реактора (1) и в гомогенном неразделенном растворе (2). Вставка - схема мембранного реактора: 1 и 2 - ферментсодержащая и свободная от фермента камеры, 3 - полупроницаемая мембрана, 4 - магнитные мешалки, 5 - отверстия для отбора проб

волны 410 нм). Более того, после инкубирования в течение 4 ч во второй камере не было обнаружено ферментативной активности, в то время как изменение ферментативной активности в камере, содержащей мицеллы, было точно таким же, как в отдельно инкубировавшейся системе сравнения. Основываясь на этих наблюдениях, можно заключить, что в течение по крайней мере 4 ч не происходит переноса фермента через мембрану как в активной, так и в неактивной форме. Таким образом, использование полимерных обращенных мицелл СЕ-РЕИ в смеси бензол - *n*-бутанол позволяет решить вопрос регенерации фермента и отделения продукта реакции от ПАВ при проведении ферментативного процесса в микроэмульсионной системе.

В качестве примера отделения продукта ферментативной реакции от ПАВ мы провели в мембранном реакторе модельную реакцию гидролиза *Bz-Tyr-pNA*, катализируемую включенным в мицеллы α -химотрипсином (рис. 7). Кривая 1 описывает накопление во времени продукта реакции, *n*-нитроанилина, в свободной от мицелл камере реактора. Для сравнения также приведена кинетическая кривая гидролиза *Bz-Tyr-pNA*, проведенного в неразделенной системе (например, в спектрофотометрической кювете) при прочих равных условиях (кривая 2). Кривая 1 характеризуется лаг-периодом, связанным, очевидно, с наличием мембраны, но по прошествии ~50 мин скорости реакции в обоих случаях становились сравнимыми. Полученные результаты позволяют заключить, что ферментсодержащие полимерные обращенные мицеллы представляют собой весьма перспективную систему с точки зрения использования в синтетической неводной энзимологии, так как продукт реакции, накапливающийся в свободной от

полимера и фермента камере (например, в проточном мембранном реакторе), может быть легко получен в чистом виде после упаривания органических растворителей.

Экспериментальная часть

Лакказа (КФ 1.10.3.2) из *Coriolus hirsutus* (молекулярная масса 55 кДа) была очищена, как описано в работе [20]. α -Химотрипсин (КФ 3.4.24.1) из поджелудочной железы быка (Союзреактив) использовали без дальнейшей очистки. Пирокатехин (Союзреактив) был очищен перегонкой, В₂-Туг-рНА и PEI (молекулярная масса 30–40 кДа, 50% водный раствор) были получены от фирмы Serva (США). Цетилбромид, этилбромид и органические растворители (Союзреактив) были очищены перегонкой.

Синтез полимерного ПАВ (CE-PEI). В стандартном синтезе 1,8 мл 50% водного раствора PEI (общая формула $(-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2) \cdot \text{CH}_2\text{CH}_2-)_n$, $n=230-310$) растворяли в 30 мл этилового спирта, содержащего требуемое количество цетилбромида (0,3–3,5 мл). Реакцию проводили в атмосфере аргона при 60° С. Через 20 ч к реакционной смеси добавляли избыток этилбромида (4 мл). Стадию модификации полимера этилбромидом проводили в запаянной ампуле в атмосфере аргона при 60° С в течение 6 ч. После этого ампулу вскрывали и упаривали растворитель в вакууме. Образовавшийся твердый продукт промывали 4 раза диэтиловым эфиром методом декантации и лиофилизировали.

Определение кислотности CE-PEI и ее регуляция. 50 мг CE-PEI растворяли в 1 мл метилового спирта, полученный раствор добавляли к 10 мл 0,05 М водного раствора хлорида калия и измеряли pH смеси на стандартном pH-метре. Полученное таким образом значение pH (далее pH_{эф}) принимали за меру эффективной кислотности полимера. Значение pH_{эф} полимера, полученного в результате описанного выше синтеза, составляло ~4,5. Такое низкое значение объясняется тем, что в запаянной ампуле наряду с реакцией модификации полимера этилбромидом протекает побочная реакция элиминирования $\text{C}_2\text{H}_5\text{Br}$ с образованием этилена и бромистого водорода [21]. Последний сорбируется на полимере, придавая ему кислые свойства.

Для удаления сорбированной кислоты 5 г CE-PEI растворяли в 100 мл метанола и нейтрализовали концентрированным (13,5 М) водным раствором аммиака до pH_{эф} ~10. После инкубирования в течение 2 ч нейтрализованный раствор подвергали диализу против дистиллированной воды (диализ прекращали, когда электропроводность воды, находящейся вне диализного мешка, становилась равной электропроводности чистой дистиллированной воды) и лиофилизировали. Значение pH_{эф} полимера, очищенного по такой методике, составило 9,8.

К метанольному раствору очищенного CE-PEI (50 мг/мл) прибавляли по каплям 8 М бромистоводородную кислоту до тех пор, пока величина pH_{эф} растворенного полимера не достигала требуемого значения. Далее метиловый спирт упаривали и полимер лиофилизировали. Помимо бромистоводородной уксусная, трихлоуксусная и фосфорная кислоты были также исследованы в качестве реагентов для доведения pH_{эф}. Однако полимер, обработанный этими кислотами, терял способность сольubilизировать воду в органических растворителях, поэтому во всех последующих экспериментах для доведения pH_{эф} использовалась бромистоводородная кислота.

Приготовление раствора полимерных обращенных мицелл. К раствору 145 мг CE-PEI в 1,1 мл смеси бензол — *n*-бутанол (2 : 1, по объему, если не указано иначе) прибавляли требуемое количество воды, водного буферного раствора или водного раствора фермента. Далее смесь интенсивно

перемешивали 10–30 с до образования однородного прозрачного раствора.

Измерение размеров полимерных обращенных мицелл проводили методом квазиупругого рассеяния лазерного света на приборе Autosizer 2C (Malvern, Англия), используя гелий-неоновый лазер в качестве источника света (длина волны падающего света 633 нм). Измерения осуществляли в термостатируемой кювете при 25°С. Автокорреляционную функцию флуктуации интенсивности рассеяния света анализировали коррелятором Correlator K7032-OS (Malvern, Англия).

Каталитическая активность ферментов

Лакказы. Каталитическую активность лакказы определяли спектрофотометрически (λ 420 нм) по начальной скорости окисления пирокатехина кислородом воздуха. В случае полимерных обращенных мицеллярных систем реакционная смесь содержала 1,1 мл раствора полимера в смеси бензол — *n*-бутанол, 10 мкл запасного раствора фермента, а также водный буферный раствор (0,05 М цитрат Na) с заданным значением pH или дистиллированную воду, взятые в таком количестве, чтобы достичь требуемого общего содержания воды в системе. Реакцию начинали добавлением 10 мкл раствора пирокатехина в *n*-бутаноле. Окончательные концентрации фермента и субстрата составляли 0,33 мкМ и 1,0–25,0 мМ соответственно (в расчете на весь объем системы). Концентрацию второго субстрата, кислорода, принимали насыщающей, основываясь на результатах предыдущих исследований активности лакказы в обращенных мицеллярных системах [22].

Каталитическую активность лакказы в водном растворе определяли аналогично. В этом случае в качестве реакционной среды использовали водный буферный раствор (0,05 М цитрат Na, pH 4,5, если не указано иначе), а окончательные концентрации фермента и субстрата составляли 0,18 мкМ и 0,1–3,0 мМ соответственно.

Все кинетические эксперименты в случае лакказы проводили при 20°С.

Для определения коэффициента экстинкции продукта биокаталитического окисления пирокатехина был проведен неферментативный синтез этого продукта — бензохинона [23]. Коэффициент экстинкции бензохинона на длине волны 420 нм составил в воде 714 М⁻¹·см⁻¹, а в системе полимерных обращенных мицелл — 550 М⁻¹·см⁻¹ и не зависел в пределах ошибки эксперимента от количества воды в системе.

α -Химотрипсин. Каталитическую активность α -химотрипсина определяли спектрофотометрически по начальной скорости гидролиза Bz-Tyr-pNA. В случае полимерных обращенных мицеллярных систем реакционная смесь содержала 1,1 мл раствора полимера в смеси бензол — *n*-бутанол (2 : 1, по объему), 3,4–13,4 мг Bz-Tyr-pNA, а также водный буферный раствор (0,05 М фосфат Na) с заданным значением pH или дистиллированную воду, взятые в таком количестве, чтобы достичь требуемого общего содержания воды в системе. Реакцию инициировали добавлением 10 мкл запасного раствора α -химотрипсина в 10⁻³ М соляной кислоте и регистрировали изменение оптической плотности раствора при длине волны 410 нм. Окончательные концентрации фермента и субстрата составляли 6,7 мкМ и 7,1–28,0 мМ соответственно (в расчете на весь объем системы).

Каталитическую активность α -химотрипсина в водном растворе определяли аналогично. В этом случае в качестве реакционной среды использовали водный буферный раствор (0,05 М фосфат Na, pH 7,6, если не указано иначе), а изменение оптической плотности регистрировали при длине волны 380 нм. Окончательные концентрации фермента и субстрата составляли 8,0 и 20,0–82,0 мкМ соответственно. Запасной раствор Bz-Tyr-pNA готовили в смеси ацетонитрил — диоксан (1 : 1, по объему) и вносили в спектрофотометрическую кювету в количестве 10 мкл.

Все кинетические эксперименты в случае α -химотрипсина проводили при 25° С.

Коэффициент экстинкции продукта реакции, *n*-нитроанилина, составил 5400 М⁻¹·см⁻¹ в системе полимерных обращенных мицелл при длине волны 410 нм и не зависел от содержания воды в мицеллярной системе и pH вводимого водного буферного раствора, в водном растворе — 14 500 М⁻¹·см⁻¹ при λ 380 нм.

Начальную скорость реакции (*v*) во всех экспериментах измеряли при помощи спектрофотометра Beckman 25 (США), снабженного термостатируемым кюветным отделением. Значения константы Михаэлиса (*K_m*) и максимальной скорости ферментативной реакции (*V*) определяли из зависимости скорости реакции от начальной концентрации субстрата в рамках классической схемы Михаэлиса — Ментен. Каталитическую активность ферментов выражали в виде отношения *V*/[*E*], ([*E*] — общая концентрация белка в системе, определенная по методу Лоури).

Катализируемые лакказой и α -химотрипсином химические реакции (окисление пирокатехина и гидролиз Vz-Туг-pNA), протекающие в системе полимерных обращенных мицелл, являются ферментативными процессами. В этом мы убедились, используя предварительно инаktivированные ферменты (запасной водный раствор лакказы кипятили 15 мин, а α -химотрипсин инкубировали 45 мин в полимерной обращенной мицеллярной системе в присутствии специфического ингибитора — фенилметилсульфонилфторида [24]). При добавлении субстрата к системе полимерных обращенных мицелл, содержащей предварительно инаktivированные ферменты, ферментативных реакций не наблюдалось.

Стабильность ферментов. Растворы лакказы или α -химотрипсина в системе полимерных обращенных мицелл и в водном буферном растворе (0,05 М цитрат Na, pH 4,5 для лакказы, и 0,05 М фосфат Na, pH 7,6 для α -химотрипсина) инкубировали при заданной температуре. Через определенные промежутки времени отбирали пробы, в которых измеряли ферментативную активность как описано выше.

«Сухой комплекс» фермента с полимером. Для получения «сухого комплекса» фермента с модифицированным полиэтиленимином готовили раствор полимерных обращенных мицелл, содержащий α -химотрипсин в концентрации 6,7 мкМ. Воду и органические растворители упаривали в вакууме до образования твердого порошка, который хранили при 20,4 и 20° С. Каталитическую активность α -химотрипсина определяли как описано выше, растворяя навеску «сухого комплекса» в смеси бензол — *n*-бутанол и добавляя к полученному раствору дистиллированную воду и субстрат.

Мембранный реактор (рис. 7, вставка), аналогичный использованному в работе [3], состоял из двух камер (1 и 2), разделенных лавсановой (полиэтилентерефталатной) мембраной (3) с диаметром пор 30 нм. Мембрану предварительно вымачивали 20 ч в этиловом спирте. В одну камеру помещали систему полимерных обращенных мицелл, которая содержала CE-PEI (132 мг/мл), воду (6,9 вес. %), α -химотрипсин (21 М) и Vz-Туг-pNA (15 мМ), в другую — смесь чистых растворителей (бензол — *n*-бутанол, 2 : 1, по объему). Обе камеры были снабжены магнитными мешалками (4) и отверстиями для отбора проб (5). Все процессы в мембранном реакторе проводили при 25° С.

За протеканием катализируемой α -химотрипсином реакции гидролиза Vz-Туг-pNA следили по накоплению продукта реакции, *n*-нитроанилина, во второй камере, свободной как от фермента, так и от полимера. Для этого через заданные промежутки времени из этой камеры отбирали пробы и измеряли их оптическое поглощение при λ 410 нм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Martinek K., Levashov A. V., Khmelnitsky Yu. L., Klyachko N. L., Berezin I. V. // Eur. J. Biochem. 1986. V. 155. № 3. P. 453-468.
2. Luisi P. L., Giomini M., Pileni M. P., Robinson B. H. // Biochim. et biophys. acta. 1988. V. 947. № 1. P. 209-246.
3. Khmelnitsky Yu. L., Neverova I. N., Momtcheva R., Yeroplov A. I., Belova A. B., Levashov A. V., Martinek K. // Biotechnol. Techniques. 1989. V. 3. № 4. P. 275-278.
4. Жолд М. Физическая химия денатурации белков: Пер. с англ. М.: Мир, 1968. 364 с.
5. Candau F., Boutiller L., Tripiet F., Wittmann J.-C. // Polymer. 1979. V. 20. № 10. P. 1221-1226.
6. Winnik M. A. // Pure and Appl. Chem. 1984. V. 56. № 9. P. 1281-1288.
7. Chujo Y., Samukawa H., Yamashita Y. // I. Polym. Sci. 1989. V. 27. № 12. P. 1907-1913.
8. Watanabe A., Matsudo M. // Macromolecules. 1985. V. 18. № 3. P. 273-277.
9. Ito K., Masuda Y., Shintani T., Kitano T., Yamashita Y. // Polymer J. 1983. V. 15. № 6. P. 443-448.
10. Cogan K. A., Gast A. P. // Macromolecules. 1990. V. 23. № 7. P. 745-753.
11. Barker M. C., Vincent B. // Colloids and Surface. 1984. V. 8. № 3. P. 297-314.
12. Marie P., Collot Y. // Macromol. Chem. 1984. V. 185. № 2. P. 205-220.
13. Sikora A., Tuzar Z. // Macromol. Chem. 1983. V. 184. № 12. P. 2049-2059.
14. Price C. // Pure and Appl. Chem. 1983. V. 55. № 10. P. 1563-1572.
15. Montal M. // Reversed Micelles/Eds Luisi P. L., Straub H. E. N. Y.: Plenum Press, 1984. P. 221-229.
16. Khmelnitsky Yu. L., Gladilin A. K., Neverova I. N., Levashov A. V., Martinek K. // Coll. Czech. Chem. Commun. 1990. V. 55. № 2. P. 555-563.
17. Fletcher P. D. I., Freedman R. D., Mead J., Oldfield C., Robinson B. H. // Colloids Surf. 1984. V. 10. № 2. P. 193-203.
18. Fletcher P. D. I., Rees G. D., Robinson B. H., Freedman R. D. // Biochim. et biophys. acta. 1985. V. 832. № 2. P. 204-214.
19. Ballet F., Debeauvois F., Candau F. // Colloid Polym. Sci. 1980. V. 258. № 9. P. 1253-1262.
20. Гинделас А. Л., Жажина Е. О., Баранов Ю. А., Карякин А. А., Гаврилова В. Н., Яропов А. И. // Биохимия. 1988. Т. 53. № 5. С. 735-739.
21. Бенкер Г., Бергер В., Домашке Г., Фангхенель Э., Фауст Ю., Фишер М., Генц Ф., Гавальд К., Глаз Р., Майер Р., Мюллер К., Павель Д., Шмидт Г., Шольберг К., Шеглик К., Зейлер Э., Цепенфельд Г. Органикум. М.: Мир, 1979. Т. 1. 453 с.
22. Pshchetsky A. V., Klyachko N. L., Levashov A. V., Martinek K. // Biocatalysis. 1990. V. 4. № 2/3. P. 185-198.
23. Conat J. B., Fieser L. S. // J. Amer. Chem. Soc. 1926. V. 48. № 11. P. 1858-1884.
24. Fahrney D. E., Gold A. M. // J. Amer. Chem. Soc. 1963. V. 85. № 6. P. 997-1000.

Поступила в редакцию 4.II.1992 г

A. K. GLADILIN, Yu. L. KHMELNITSKY*, V. L. ROUBILO,
K. MARTINEK**, A. V. LEVASHOV***

POLYMERIC REVERSED MICELLES BASED ON MODIFIED POLYETHYLENEIMINE: FORMATION AND USAGE AS NONAQUEOUS MEDIA FOR ENZYMATIC REACTIONS

N. N. Semenov Institute of Chemical Physics, Moscow;

* A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Moscow;

** Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Prague;

*** Chemistry Department, Moscow State University

A new microheterogeneous non-aqueous medium for enzymatic reactions based on reversed micelles of a polymeric surfactant was proposed. The surfactant was synthesized by successive alkylation of polyethyleneimine with ethyl- and ethylbromide thus being able to solubilize considerable amounts of water in benzene/*n*-butanol mixtures. The hydrodynamic radius of polymeric reversed micelles was within the range 20-50 nm depending on the water content in the system, as determined by the quasi-elastic laser light scattering. Polymeric reversed micelles were capable of solubilizing enzymes

(α -chymotrypsin and laccase) in nonpolar solvents with retention of the catalytic activity. Due to strong buffer properties in a wide pH range the surfactant could maintain any preadjusted pH inside hydrated reversed micelles. Catalytic behavior of enzymes entrapped into polymeric reversed micelles appeared to be insensitive to the pH of the buffer solution introduced into the system as an aqueous component, but mostly determined by acid-base properties of the polymeric surfactant. Moreover, the presence of buffer salts was not necessary, i. e. straight distilled water could be used as a sole aqueous component of the system, the effective pH of the enzyme microenvironment inside reversed micelles being determined solely by the polymeric surfactant. A possibility of prolonged storage of α -chymotrypsin in 'dry enzyme - polymer complex' with retention of the catalytic activity was discovered. Polymeric reversed micelles appeared to be promising enzyme carriers in membrane reactors. Owing to large dimensions of polymeric reversed micelles they are effectively kept back by the semipermeable membrane and allow an easy separation of the reaction product and enzyme recovery.