



УДК 577.152.34.03

ФАЗОВЫЙ ПЕРЕХОД В МАТРИЦЕ КАК РЕГУЛЯТОР ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОТЕИНАЗ

© 1998 г. Н. Л. Еремеев, Н. Ф. Казанская*

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

Поступила в редакцию 16.07.97 г. Принята к печати 29.01.98 г.

Рассмотрено кинетическое поведение протеолитических ферментов, иммобилизованных в термочувствительных гидрогелях, при фазовом переходе (коллапсе) носителей. Существующие взаимосвязи между активностью иммобилизованного фермента и состоянием матрицы позволяют использовать фазовый переход гидрогеля как регулятор ферментативной активности иммобилизованных препаратов. Продемонстрирован ряд вариантов подобной регуляции.

Ключевые слова: ферментативная активность, терморегуляция; гидролазы; термочувствительные гидрогели; протеиназы; иммобилизация.

Существуют классы полимеров [1], энергия взаимодействия которых с растворителем изменяется в зависимости от изменения некоторых физических или химических параметров среды (рН, ионная сила раствора, состав растворителя, температура, свет, электрические поля и т.д.). При достижении критических значений вышеуказанных параметров происходит процесс дегидратации полимерных цепей [2] – вытеснение молекул растворителя из сольватной оболочки полимера в результате гидрофобных взаимодействий полимерных звеньев (с точки зрения физикохимии – фазовый переход первого рода). При этом истинный раствор полимера расслаивается на две фазы – растворитель и собственно полимер. В случае гелей, сформированных из полимеров, обладающих указанными свойствами, процесс изменения степени гидратации выражается в коллапсе – уменьшении линейных размеров и веса геля пропорционально содержанию растворителя в образце [3]. Следует отметить, что для линейных водорастворимых полимеров фазовый переход – расслоение раствора – происходит обычно в весьма узком интервале условий, в то время как коллапс гелей может происходить в достаточно широком интервале изменения параметров среды [4]. Термочувствительные полимеры (а также гели

на их основе) входят в состав семейства материалов, для обозначения которых в последнее время принято использовать термин “стимулчувствительные материалы” [5].

Обратимое изменение степени набухания стимулчувствительных гелей в ответ на изменения внешнего сигнала и соответствующие изменения свойств материала (гидрофильно-гидрофобный баланс матрицы, проницаемость и скорость выделения включенных веществ, заряд полимерной сетки и т.п.) находит применение в фундаментальных и прикладных исследованиях [6]. В частности, термочувствительные гели [7] используются для выделения и очистки биологически активных макромолекул [8, 9], создания форм препаратов с контролируемой скоростью высвобождения лекарственного начала [10, 11], конструирования биореакторов повышенной продуктивности [12, 13] и биосенсоров с ускоренным аналитическим циклом [14] и т.п.

Первые же работы, посвященные исследованию активности ферментов, иммобилизованных в коллапсирующих термочувствительных гелях, показали весьма интересный результат – на графиках зависимостей Аррениуса появлялись участки с отрицательными значениями тангенса угла наклона, т.е. с кажущейся отрицательной энергией активации реакции, причем эти участки появлялись в области температур фазового перехода полимерной матрицы [15, 16]. Факт весьма примечательный, поскольку известно, что изломы на зависимостях Аррениуса часто наблюдаются для мембраносвязанных ферментов в области “плавления” фосфолипидных мембран (т.е. фазовом

Сокращения: АТФЕ – этиловый эфир *N*-ацетил-*L*-тирозина, ИРАА – *N*-изопропилакриламид, МВА – метиленбисакриламид, NPPA – *n*-нитрофенилфосфат аммония, poly(NIPAA)-гель – поли-*N*-изопропиламидный гель, TEMED – *N,N,N,N*-тетраметилэтилендиамин.

* Автор для переписки (e-mail: nfk_lab@enzyme.chem.msu.su).

переходе твердое тело – жидкий кристалл) [17–19], и предполагается, что это явление играет важную роль в регуляции ферментативных процессов *in vivo*. Явные аналогии в температурном поведении мембраносвязанных и иммобилизованных в термообратимых гелях ферментов позволили высказать предположение о сходном характере влияния фазового перехода матрицы на активность связанного с ней бискатализатора. Таким образом, изучение более простой модельной системы может пролить свет на сложные механизмы регуляции ферментативной активности в живой природе. С чисто практической точки зрения интересно, можно ли направленно управлять активностью ферментов, иммобилизованных в термочувствительных гелях, и если можно, то каким образом.

Естественно, что вначале необходимо было прояснить вопрос об обратимости наблюдаемых температурных эффектов. Сам по себе фазовый переход в термогелях – процесс обратимый, но иммобилизованный в таких матрицах фермент мог необратимо инактивироваться в процессе коллапса геля. На рис. 1 приведены наблюдаемые активности препарата иммобилизованного в поли-*N*-изопропилакриламидном (poly(NIPAA)) геле α -химотрипсина при циклическом увеличении-уменьшении температуры. Видно, что наблюдаемая активность зависит только от конкретной температуры, при которой проводятся измерения, но не от “термической предыстории” препарата. Это свидетельствует о том, что необратимой термической инактивации фермента в препарате не происходит. Аналогичный результат был получен и при исследовании других ферментов, иммобилизованных в термогелях [12, 14–16, 20–22].

Первым и наиболее очевидным объяснением наблюдаемых эффектов явились диффузионные затруднения. Действительно, в ряде случаев коэффициенты диффузии веществ через полимерную матрицу уменьшались при коллапсе на полтора-два порядка [23]. Чтобы проверить это предположение на использованной нами системе (α -химотрипсин, ковалентно включенный в poly(NIPAA)-гель), мы построили график зависимости активности иммобилизованного фермента от его концентрации в полимеризационном растворе. Как видно (рис. 2а), эти зависимости прямолинейны и идут из нуля как при низких, так и при высоких температурах, что свидетельствует об отсутствии диффузионных затруднений в использованных нами условиях. В то же время для более активных ферментов были получены аналогичные зависимости, которые говорят о появлении внутридиффузионных затруднений при повышении концентрации фермента в геле – для примера приведена зависимость для щелочной фосфатазы (рис. 2б). Безусловно, прямым ответом на данный вопрос было бы титрование числа активных центров фермента при различных тем-

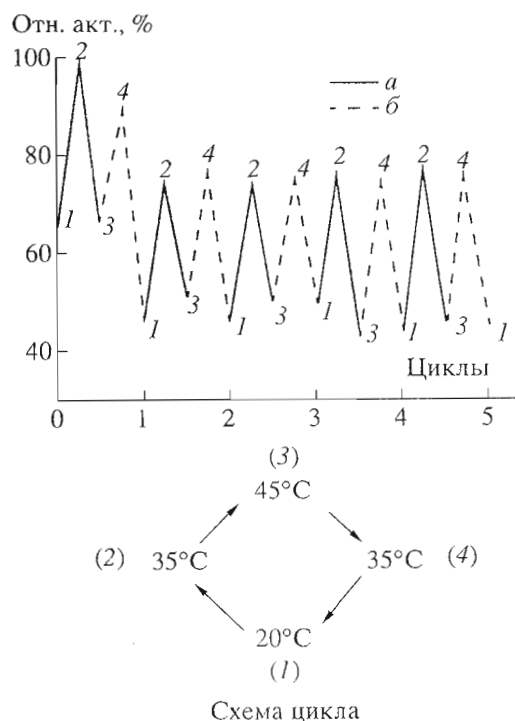


Рис. 1. Циклическая работа α -химотрипсина, иммобилизованного в poly(NIPAA)-геле: а – режим нагревания (25–35–45°C); б – режим охлаждения (45–35–25°C) [26].

пературах, однако из-за трудностей методического характера до сих пор это так и не удается осуществить.

Появление внешнедиффузионных затруднений (либо изменение коэффициента распределения субстрата между раствором и гелем), которые могли бы возникать при фазовом переходе в матрице, должно было бы влиять исключительно на константу Михаэлиса без изменения величины максимальной скорости реакции [24]. Чтобы проверить наличие такого рода эффектов, мы провели определение температурного хода максимальной скорости реакции и кажущейся константы Михаэлиса для гидролиза субстратов различными гидролазами [22, 25]. Было показано, что температурная зависимость константы Михаэлиса для иммобилизованных ферментов (α -химотрипсин, щелочная фосфатаза, уреазы) практически всегда коррелирует с таковой для нативного биокатализатора, а наблюдаемое падение активности препарата связано именно с уменьшением максимальной скорости реакции. Более того, для построения зависимостей Аррениуса значения параметров V_{max} и K_m необходимо было определять в рН-оптимуме действия нативного и иммобилизованного α -химотрипсина при каждой конкретной температуре (с повышением температуры узкий рН-профиль смещается в область более кислых значений рН). Из трехмерных плоскостей

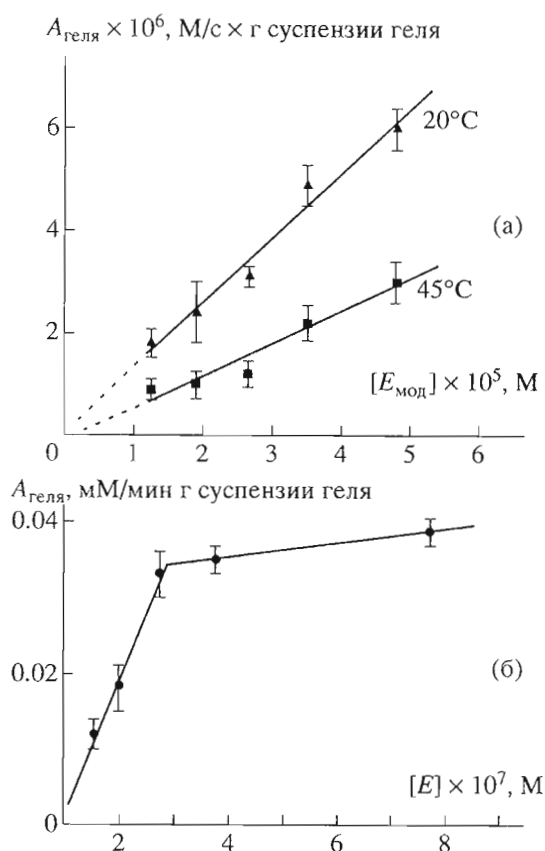


Рис. 2. Зависимости наблюдаемой активности препаратов иммобилизованных ферментов от концентрации фермента в растворе при полимеризации. (а) – α -химотрипсин: активность определяли по начальной скорости гидролиза АТЭЕ (10^{-2} М), 0,2 М NaCl + 0,02 М CaCl₂, рН 8,0; (б) – щелочная фосфатаза: активность определяли по начальной скорости гидролиза NPPA (10^{-2} М), 0,03 М трис-НСl-буфер, рН 7,8 [22]. $E_{\text{мод}}$ – α -химотрипсин, модифицированный акрилоилхлоридом

активность фермента (K_m/V_{max})/температура/рН мы получили возможность вычислить и построить температурную зависимость равновесных констант ионизации фермент-субстратного комплекса. На температурной зависимости этих констант также не отражается фазовый переход матрицы (рис. 3). Коллапс матрицы не оказывает влияния и на температурную зависимость равновесных констант связывания субстрата с ферментом для уреазы [25] и субстратного ингибирования для щелочной фосфатазы [22].

Суммируя полученные данные, можно сказать, что фазовый переход в термогелях не влияет на температурную зависимость равновесных параметров реакций, катализируемых иммобилизованными в таких гелях ферментами, и все наблюдаемые эффекты понижения ферментативной активности препаратов с увеличением температуры связаны именно с изменениями

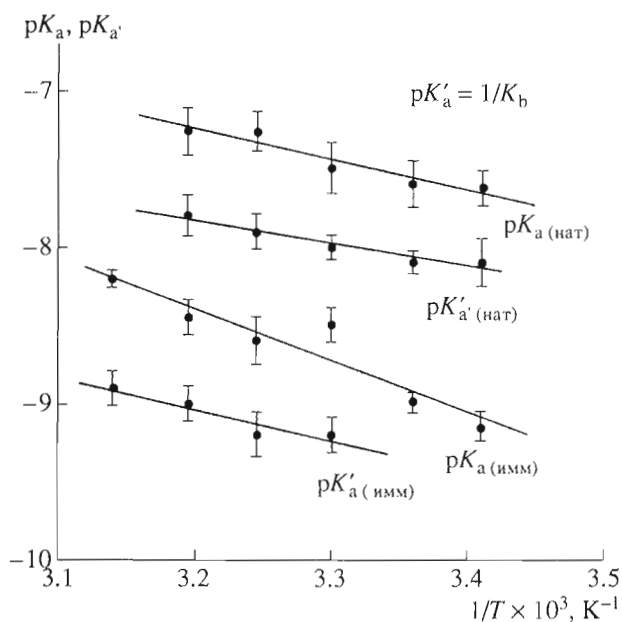


Рис. 3. Зависимость от температуры констант ионизации фермент-субстратного комплекса K_a и K_b в координатах $(\ln(\text{параметра}) - 1/T)$ для реакции гидролиза АТЭЕ нативным и иммобилизованным в poly(NIPAA)-геле α -химотрипсином [22].

кинетических параметров, т.е. с величиной максимальной скорости реакции. Этот феномен может объясняться возникновением при коллапсе матрицы стерических затруднений для протекания ферментативной реакции, т.е. уменьшением реальной концентрации активных центров фермента. Была предложена формально-кинетическая схема поведения ферментов, иммобилизованных в термочувствительных гелях, в области высоких температур, предполагающая наличие равновесия между активной и неактивной формами биокатализатора [26]. Как уже было сказано, нам не удалось провести титрование числа активных центров фермента в иммобилизованном препарате. Однако для прояснения вопроса о возникновении стерических затруднений нами был проведен процесс взаимодействия иммобилизованного α -химотрипсина с инактиватором – фенолметилсульфонилфторидом (PMSF) – в условиях коллапса полимерной матрицы (50°C). Было показано [27], что при этом в течение не более чем 10 мин весь фермент связывается с инактиватором и отсутствует регенерация ферментативной активности при переходе к пониженным температурам. Данный эксперимент свидетельствует о том, что даже в условиях полного коллапса матрицы, когда абсолютные значения скоростей ферментативной реакции понижаются, все активные центры иммобилизованного α -химотрипсина доступны для взаимодействия с молекулами, соизмеримыми по величине с молекулой PMSF.

Таким образом, причины, обуславливающие аномальное температурное поведение ферментных препаратов под действием фазового перехода в термообратимых матрицах, до сих пор неясны. Тем не менее при исследовании ферментных систем, иммобилизованных в термогелях, прослеживалась достаточно четкая корреляция между величиной определяемой максимальной скорости реакции и степенью гидратации матрицы [16, 20, 22, 28, 29]. Рассмотрим рис. 4. Экстраполяция низкотемпературной ветви в область более высоких температур дает теоретическое описание температурного поведения препарата в отсутствие влияния коллапса матрицы. Тогда отношение величины реально измеряемой активности к теоретической даст нам долю наблюдаемой активности препарата при данной температуре. На рис. 5 видна корреляция между степенью гидратации матрицы и долей наблюдаемой активности. Это позволило нам предположить, что факторы, влияющие на коллапс матрицы, будут симбатно влиять и на активность иммобилизованного в ней фермента.

Из литературы известно, что композиция геля и состав окружающего раствора влияют как на температуру начала фазового перехода, так и на протяженность температурного интервала коллапса [30-33]. По аналогии с этими параметрами для температурного поведения ферментов, иммобилизованных в термочувствительных гелях, можно выделить "критическую" температуру (т.е. температуру, при которой наблюдается излом в координатах Аррениуса) и кажущуюся отрицательную энергию активации в высокотемпературной области (чем ближе эта величина к нулю, тем меньше выражено наблюдаемое падение активности препарата с повышением температуры). Ранее было показано, что температура начала коллапса геля, синтезированного из смеси мономеров с различными индивидуальными значениями нижней критической температуры растворения, зависит от процентного содержания мономеров в исходной смеси [15, 16]. При этом критическая температура для иммобилизованной в таких гелях аспарагиназы коррелировала с температурой начала коллапса использованных сополимеров. Мы исследовали еще два типа факторов, влияющих на коллапс термочувствительных матриц: концентрацию сшивающего агента и ионную силу раствора. Известно, что увеличение концентрации сшивающего агента делает структуру геля более жесткой, поэтому коллапс начинается при более высоких температурах и происходит в более широком температурном интервале [31]. Аналогичные закономерности наблюдаются для иммобилизованного в таких гелях α -химотрипсина – критическая температура увеличивается, а кажущаяся отрицательная энергия активации уменьшается (рис. 6а). Увеличение ионной силы

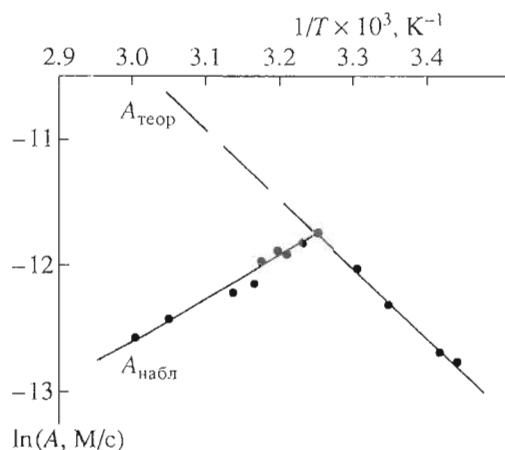


Рис. 4. Зависимость активности иммобилизованного в poly(NIPAA) -геле α -химотрипсина от температуры в координатах Аррениуса. Штриховой линией показана экстраполяция низкотемпературной ветви зависимости в область температур выше температуры фазового перехода геля [26].

окружающего раствора также приводит к более широкому температурному интервалу фазового перехода, но при этом температура начала коллапса понижается [32]. И в этом случае температурные зависимости препаратов иммобилизованного α -химотрипсина изменяются аналогичным образом (рис. 6б).

Еще один путь регуляции активности ферментов, иммобилизованных в термочувствительных гелях, – это "включение" фермента независимо протекающей биоспецифической реакции в изотермических условиях [34]. Так, степень набухания сколлапсированной матрицы при фиксированной температуре увеличивается при взаимодействии отрицательно заряженного декстрансульфата с иммобилизованным в геле конканавалином А (лектин, специфически связывающий углеводы) за счет повышения в матрице плотности зарядов одного знака. Вытеснение декстрансульфата из комплекса более специфическим, но нейтральным α -метил-D-маннопиранозидом приводит к уменьшению степени набухания до исходного значения [35]. Было также показано, что добавление мочевины к уреазе, иммобилизованной в слабосшитом poly(NIPAA) -геле, при 33°C приводит к увеличению объема геля в 8 раз, причем отмывка субстрата возвращает гель в исходное состояние [36]. При исследовании температурной зависимости иммобилизованной в подобных гелях уреазы нами было продемонстрировано [25, 29], что падение максимальной скорости реакции в интервале $30\text{--}35^\circ\text{C}$ сменяется последующим ростом, причем степень набухания матрицы увеличивается именно при протекании ферментативной реакции (рис. 7). Мы провели соиммобилизацию уреазы и α -химотрипсина в poly(NIPAA) -

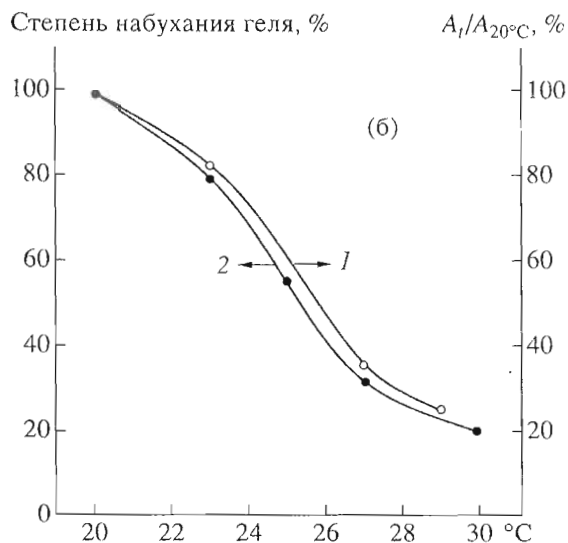
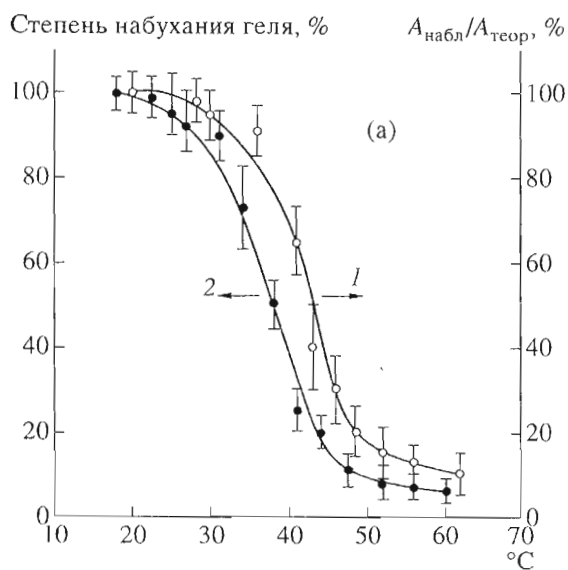


Рис. 5. Зависимости от температуры доли наблюдаемой активности иммобилизованных ферментов (1) и степени набухания препарата рор(NIPAA)-геля (2). (а) – α -химотрипсин [27], (б) – щелочная фосфатаза.

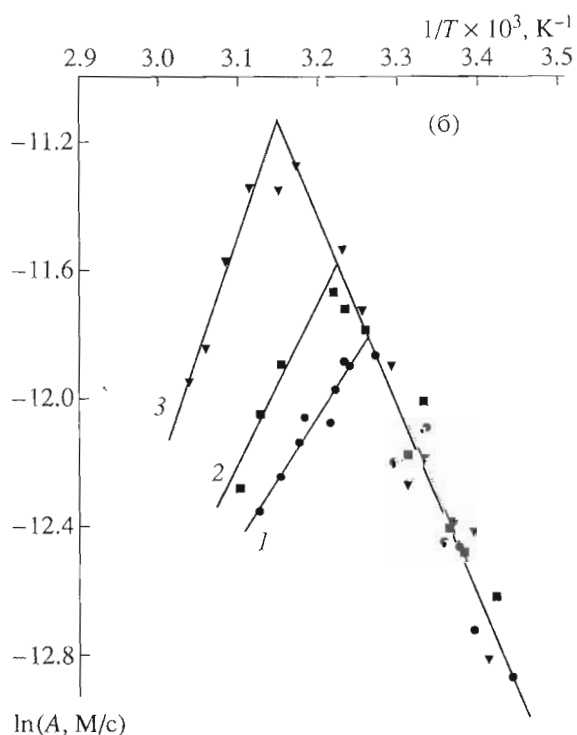
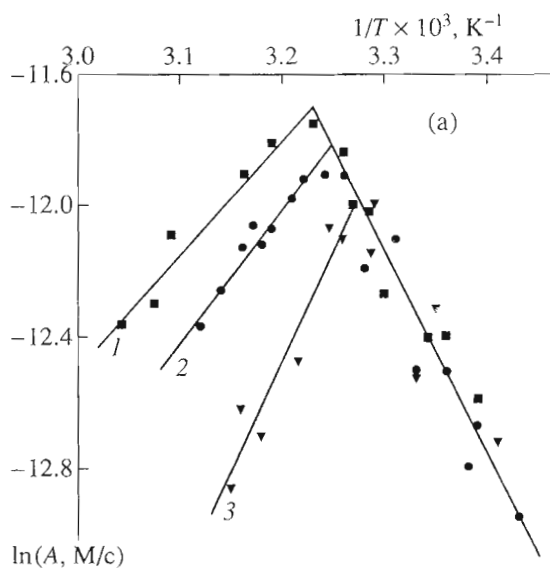


Рис. 6. Зависимость активности препаратов иммобилизованного α -химотрипсина в координатах Аррениуса: (а) – от концентрации сшивающего агента, моль МВА/моль NIPAA 1/75 (∇), 1/750 (\bullet), 1/7500 (\blacksquare) (ионная сила 0.2 M NaCl + 0.02 M CaCl₂, pH 8.0); (б) – от ионной силы раствора, 0.2 M NaCl + 0.02 M CaCl₂ (\bullet), 0.02 M NaCl + 0.002 M CaCl₂ (\blacksquare), 0.002 M NaCl + 0.0002 M CaCl₂ (∇) (концентрация сшивающего агента моль МВА/моль NIPAA 1/750, pH 8.0) [28].

геле и показали, что при pH 6,0 и 45°C добавление в среду 0.1 M мочевины увеличивает наблюдаемую скорость гидролиза *n*-нитроанилида *N*-бензоил-*L*-тирозина α -химотрипсином более чем в 2 раза [34]. Нам бы очень хотелось объяснить этот факт увеличением степени гидратации термочувствительной матрицы в результате протекания реакции гидролиза мочевины уреазой и соответствующим увеличением наблюдаемой активности α -химотрипсина, однако нельзя сбрасывать со счетов возможность локального защелачивания среды продуктами гидролиза мочевины, поэтому в настоящее время эта система изучается нами более подробно.

Изучение свойств препаратов биокатализаторов, иммобилизованных в стимулчувствительных гелях, идет все более интенсивно, при этом постоянно расширяется круг потенциальных применений таких материалов. Так, разрабатывается тематика

по конверсии химической энергии ферментативных реакций непосредственно в механическую через изменение объема матрицы, в которой иммобилизован биокатализатор [37]. Предлагаются варианты устройств, в которых высвобождение лекарственного начала являлось бы функцией наличия патогенного состояния организма [38]. Триггерный характер действия ряда иммобилизованных в стимулчувствительные матрицы биокатализаторов позволяет рассматривать их как биомиметические материалы [36]. Весьма многообещающе выглядит также возможность использования таких систем в качестве основы принципиально нового поколения информационно-логических устройств, передача сигнала в которых может быть осуществлена по такому же принципу, что и в живых организмах [39, 40]. Особо хотелось бы отметить, что быстрый и продуктивный прогресс в данной области является характерным примером плодотворного сотрудничества на стыке двух областей знаний – химии полимеров и биохимии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В экспериментах использовали α -химотрипсин марки А (мясокомбинат им. С.М.Кирова, Санкт-Петербург); щелочную фосфатазу из кишечника тюленя (40 ед./мг), любезно предоставленную И.В.Сахаровым (химический факультет МГУ); уреазу (328 ед./мг; Serva, Германия); N,N' -метиленбисакриламид (МВА), персульфат аммония, N,N,N',N' -тетраметилэтилендиамин (TEMED) (Reanal, Венгрия); этиловый эфир N -ацетил- L -тирозина (АТЭЕ), n -нитроанилид N -бензоил- L -тирозина (BDH, Англия); фенилметилсульфонилфторид, n -нитрофенилфосфат аммония (NPPA) (Sigma, США). Акрилоилхлорид синтезирован по методике [41], N -изопропилакриламид (NIPAA) – по методике [42]. Мочевина, соли и компоненты буферных растворов марки не ниже ч.д.а. ("Реахим", СНГ).

Получение иммобилизованных препаратов ферментов. К 1 мл раствора фермента добавляли 200 мг мономера (NIPAA), сшивающий агент (МВА), инициаторы (0.02 мл водного 0.78 М раствора персульфата аммония и 0.01 мл TEMED) и проводили сополимеризацию в блоке. Иммобилизацию α -химотрипсина осуществляли после его предварительной модификации акрилоилхлоридом по методике [26]. Варьировали концентрацию ферментов в растворе для полимеризации и концентрацию сшивающего агента. Для измерения активности иммобилизованных ферментов полученный блок-сополимер измельчали в гомогенизаторе до частиц размером 20-150 мкм; для измерения степени набухания гелей образцы нарезались на пластины $10 \times 2 \times 5$ мм. Гель отмывали солевым раствором (0.2 М NaCl + 0.02 М CaCl₂)

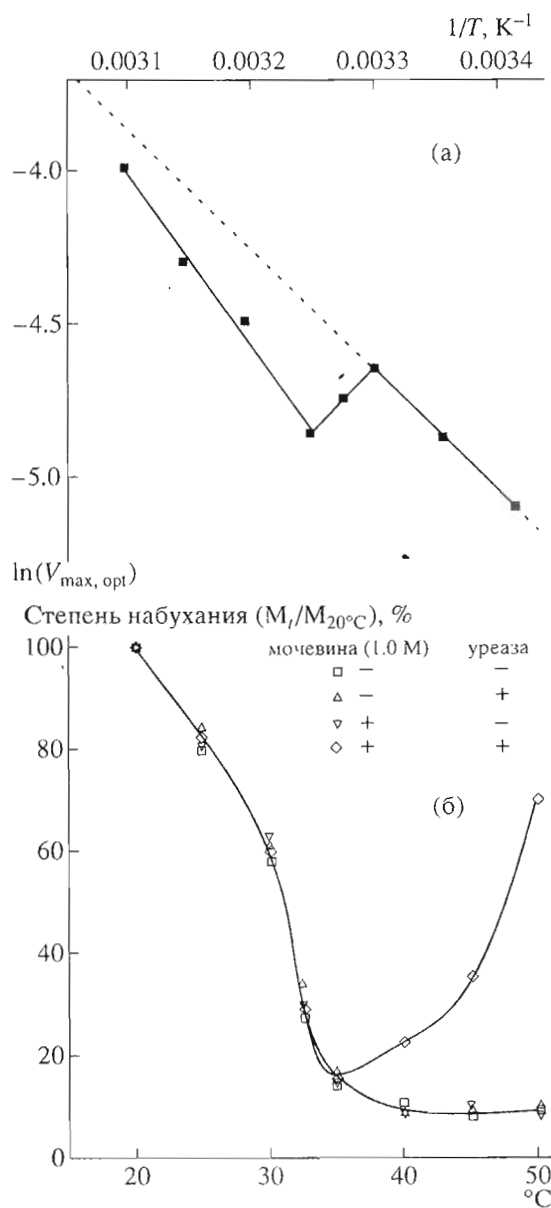


Рис. 7. Зависимости от температуры: (а) – максимальной скорости реакции гидролиза мочевины уреазой, иммобилизованной в poly(NIPAA)-геле, в координатах Аррениуса (штриховая линия – экстраполяция низкотемпературной ветви в область высоких температур); (б) – степени набухания содержащих и не содержащих уреазу препаратов poly(NIPAA) в присутствии и в отсутствие мочевины [29].

до полного отсутствия активности в промывных водах.

Определение активности ферментов. Активность нативного и модифицированного акрилоилхлоридом α -химотрипсина по АТЭЕ и уреазы по мочеvine определяли потенциометрическим методом на рН-стате RTS-822 (Radiometer, Дания); активность щелочной фосфатазы по NPPA и α -химотрипсина по n -нитроанилиду N -бензоил-

L-тирозина определяли на спектрофотометре UV-265FW (Shimadzu, Германия) по начальным скоростям гидролиза соответствующего субстрата. Варьировали концентрацию субстрата, температуру, pH и ионную силу раствора.

Степень набухания геля определяли как отношение веса геля при данной температуре к весу геля при 20°C. Уравновешивание образца при конкретной температуре проходило в течение 3 ч.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шур А.М. Высокомолекулярные соединения. М.: Высш. шк., 1981.
2. Atiya T., Tanaka T. // *Macromolecules*. 1987. V. 20. P. 1162-1164.
3. Tanaka T. // *Phys. Rev. Lett.* 1978. V. 40. P. 820-823.
4. Li Y., Tanaka T. // *Annu. Rev. Mater. Sci.* 1992. V. 22. P. 243-277.
5. Kaetsu I. // *Polysaccharides in Medical Applications*/ Ed. D. Severian. N.Y.: Marcel Dekker Inc., 1996. P. 243-262.
6. Takagi T. // *Third ICIM/ECSSM* (Eds P.F. Gobin, J. Tatibouet). Proc. SPIE 2779. 1996. P. 2-15.
7. Галаев И.Ю. // *Биохимия*. 1994. Т. 59. С. 1478-1482.
8. Trank S.J., Johnson D.W., Cussler E.L. // *Food Technol.* 1989. V. 43. P. 78-83.
9. Park C.-H., Orozco-Avila I. // *Biotechnol. Prog.* 1993. V. 9. P. 640-646.
10. D'Emanuele A., Dinarvand R. // *Int. J. Pharm.* 1995. V. 118. P. 237-242.
11. Brazel C.S., Peppas N.A. // *J. Control. Release*. 1996. V. 39. P. 57-64.
12. Park T.G., Hoffman A.S. // *Appl. Biochem. Biophys.* 1988. V. 19. P. 1-9.
13. Park T.G., Hoffman A.S. // *Biotechnol. Bioeng.* 1990. V. 35. P. 152-159.
14. Ereemeev N.L., Kukhtin A.V. // *Anal. Chim. Acta*. 1997. V. 347. P. 27-34.
15. Dong L.C., Hoffman A.S. // *J. Control. Release*. 1986. V. 4. P. 223-227.
16. Dong L.C., Hoffman A.S. // *Reversible Polymeric Gels* (Ed. P. Russo). ASC Symposium Series. ASC. Washington. DC. USA. 1987. V. 350. P. 236-244.
17. Raison J.K., Lyons J.M., Thomson W.W. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1971. V. 142. P. 83-90.
18. Watson K., Bertoli E., Griffiths D.E. // *Biochem. J.* 1975. V. 146. P. 401-407.
19. Clark P.E., Moscarello M.A. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1986. V. 859. P. 143-150.
20. Park T.G., Hoffman A.S. // *J. Biomed. Mat. Res.* 1990. V. 24. P. 21-38.
21. Kokufuta E., Ogane O., Iehijo H., Watanabe S., Hira-sa O. // *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1992. № 5. P. 416-418.
22. Еремеев Н.Л., Сиголаева Л.В., Симаков П.А., Казанская Н.Ф. // *Биохимия*. 1995. Т. 60. С. 1307-1317.
23. Palasis M., Gehrke S.H. // *J. Control. Release*. 1992. V. 18. P. 1-12.
24. Иммуобилизованные ферменты/ Ред. И.В. Березин, В.К. Антонов, К. Мартинек. М.: Изд-во МГУ, 1976. С. 19-30.
25. Ereemeev N.L., Kukhtin A.V., Belyaeva E.A., Kazan-skaya N.F. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1997 (in press).
26. Еремеев Н.Л., Сиголаева Л.В., Казанская Н.Ф. // *Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия*. 1992. Т. 33. С. 511-515.
27. Сиголаева Л.В., Еремеев Н.Л., Казанская Н.Ф. // *Биоорганическая химия*. 1994. Т. 20. С. 268-273.
28. Sigolaeva L.V., Ereemeev N.L., Kazanskaya N.F. // *Third ICIM/ECSSM* (Eds P.F. Gobin, J. Tatibouet). Proc. SPIE 2779. 1996. P. 66-71.
29. Кухтин А.В., Еремеев Н.Л., Беляева Е.А., Казанская Н.Ф. // *Биохимия*. 1997. Т. 62. С. 437-443.
30. Khokhlov A.R. // *Polymer*. 1980. V. 22. P. 243-277.
31. Pavsky M., Hrouz J. // *Polym. Bull.* 1982. V. 8. P. 387-394.
32. Василевская В.В., Хохлов А.Р. // *Высокомолекуляр. соединения*. 1986. Т. 26(А). С. 316-320.
33. Bae Y.H., Okano T., Kim S.W. // *J. Polym. Sci. Part B. Polym. Phys.* 1990. V. 28. P. 923-936.
34. Ereemeev N.L., Kukhtin A.V., Sigolaeva L.V., Komar-ovskaya Yu.G., Kazanskaya N.F. // *V Int. Workshop on Bioencapsulation*. Potsdam, 1996. P. 172-177 (P10).
35. Kokufuta E., Zhang Y.-Q., Tanaka T. // *Nature*. 1991. V. 351. P. 302-304.
36. Kokufuta E. // *Responsive Gels: Volume Transition II*/Ed. K. Dusek. B.: Springer-Verlag, 1993. P. 157-177.
37. Osada Y. // *Adv. Polym. Sci.* 1987. V. 82. P. 1-46.
38. Yoshida R., Sakai K., Okano T., Sakurai Y. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1993. V. 11. P. 85-108.
39. Gritsenko O.V., Sidelnikov D.I., Simonova A.P., Ram-bidi N.G., Chernavskii D.S. // *J. Mol. Electron.* 1991. V. 7. P. 155-166.
40. Varfolomeyev S.D., Kazanskaya N.F., Ereemeev N.L. // *ByoSystems*. 1996. V. 39. P. 35-42.
41. Weigang C., Hilgestag D. *Organisch-Chemische Experimentierkunst*. Leipzig: J. A. Marth Verlag. 1964. B. 2. P. 612.
42. Plaut H., Ritter J.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 1951. V. 74. P. 4076-4077.

The Phase Transition of the Matrix as Regulator of the Enzymic Activity of Immobilized Proteases

N. L. Ereemeev and N. F. Kazanskaya[#]

Department of Chemical Enzymology, Chemistry Faculty, Moscow State University, Vorob'evy Gory, Moscow, 119899 Russia

The kinetic behavior of proteolytic enzymes immobilized in thermosensitive hydrogels was studied at the phase transition (collapse) of the carriers. The dependence of the activity of immobilized enzymes on the state of the matrix allows the use of the hydrogel phase transition to regulate the activity of immobilized enzymes. Several cases of such regulation were demonstrated.

Key words: enzymic activity, thermoregulation; hydrolases, thermosensitive hydrogels, proteases, immobilization

[#] *To whom correspondence should be addressed (phone: +7 (095) 939-3417).*