



УДК 541.183:577.152.313*3.036:547.426.232

ИССЛЕДОВАНИЕ ГИДРОЛИЗА В МОНОСЛОЯХ НОВЫХ ЛИПИДОПОДОБНЫХ СУБСТРАТОВ И ТРИЛАУРИНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЛИПАЗЫ *Pseudomonas fluorescens*

© 2000 г. С. Ю. Зайцев, Б. Аха*, Т. А. Волченкова, С. В. Белов, М. П. Шнайдер*, А. Е. Иванов#

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ул. Миклухо-Макляя, 16/10;

* Университет г. Вупперталь, ФРГ

Поступила в редакцию 18.02.99 г. Принята к печати 15.10.99 г.

Предложен простой метод определения параметров ферментативного гидролиза липидоподобных субстратов и трилаурина, организованных в монослой на поверхности раздела фаз. Начальные скорости липолиза пропорциональны уменьшению площади монослоя субстрата при его гидролизе под действием фермента, растворенного в водной субфазе однокюветных весов Ленгмюра, при поверхностном давлении 10 мН/м. Получены кинетические параметры гидролиза трилаурина и трех 1,3-дилаурилпсевдоглицеридов, ацилированных в положении 2 аминокислотами (фенилаланином, лейцином и валином), под действием липазы из *Pseudomonas fluorescens*. В отличие от моделей ферментативного гидролиза, пренебрегающих толщиной монослоя субстрата, предложенный метод позволяет получить кинетические константы в стандартных размерностях. Установлено, что при близких значениях $K_{m(\text{каж})}$ для синтетических псевдоглицеридов величины k_{cat} заметно выше, чем для трилаурина. Этот факт может быть связан с наличием в молекулах псевдоглицеридов положительно заряженных первичных аминогрупп.

Ключевые слова: ферментативный гидролиз; монослой; липаза; весы Ленгмюра; псевдоглицериды; триглицериды.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение кинетики ферментативного гидролиза липофильных субстратов, организованных в монослой на границе раздела фаз вода-воздух, привлекает внимание исследователей [1–3]. Причина этому – уникальная возможность регистрировать скорость превращения субстрата, находящегося в ориентированном состоянии, характерном для липидов клеточных мембран, мицелл в биологических жидкостях и т.п.

Для изучения реакций подобного типа удобно воспользоваться установкой “пленочные весы” (называемой также “весы Ленгмюра”), широко используемой для получения и исследования монослоев ПАВ [2]. Для проведения реакции фермент растворяют в водной фазе, находящейся в ванне “пленочных весов”, а субстрат наносят на ее поверхность в количестве, соответствующем образованию монослоя [2–4]. Скорость ферментативного гидролиза определяют путем регистрации изменения площади, занятой субстратом на поверхности раздела фаз при заданном поверхно-

стном давлении с течением времени [5]. В общем случае гидролиз ПАВ, липидов и других липидоподобных субстратов сопровождается отщеплением жирных кислот, частично растворимых в воде (по крайней мере в области низких концентраций, имеющих место при гидролизе монослоя). Вследствие растворения продуктов гидролиза в водной фазе площадь монослоя ПАВ уменьшается. Характерно, что вместе с этим уменьшается и количество фермента, контактирующего с монослоем. Наложение двух указанных процессов приводит к получению интегральной кинетической кривой, математическая обработка которой довольно сложна. Для упрощения расчетов предложено использовать “пленочные весы”, состоящие из двух отсеков, соединенных неглубоким каналом, так что монослой в обоих отсеках представляет собой единое целое, а водные фазы существенно разъединены [4–6]. Указанная конструкция позволяет регистрировать скорость ферментативной реакции, протекающей при постоянном количестве контактирующих фермента и субстрата, что облегчает обработку данных.

В настоящей работе предложен альтернативный подход к изучению кинетики ферментативного гидролиза в однокюветных “пленочных весах”, основанный на регистрации его начальных

Сокращения: ПАВ – поверхностно-активное вещество; PG – псевдоглицерид.

Автор для переписки (тел.: (095) 336-06-00; e-mail: zubov@ibch.siobc.ras.ru).

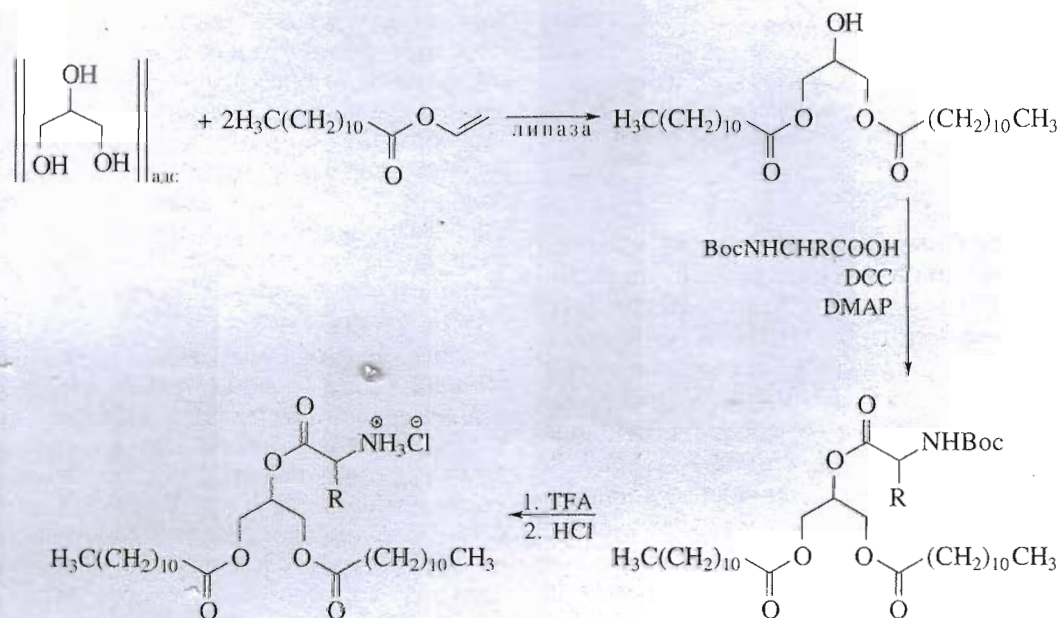
скоростей, подобно тому как это принято для реакций, протекающих в гомогенной среде [7].

Цель работы – сравнительное изучение кинетики ферментативного гидролиза новых поверхностно-активных производных глицерина и некоторых аминокислот, которые являются удобными липофильными субстратами для выяснения особенностей механизма действия липаз. В ряду гидролитических ферментов липазы (КФ 3.1.1.3) занимают особое место ввиду того, что липиды, их природные субстраты, сильно ассоциированы в водной среде, и активация фермента происходит именно в контакте с границей раздела фаз [8]. Известно, что адсорбция липаз на гидрофобных но-

сителях увеличивает их каталитическую активность [9, 10]. В связи с этим представляет интерес изучение взаимодействия липазы *Pseudomonas fluorescens* с монослоями ориентированных субстратов, а также влияния строения их молекул на каталитическую активность фермента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Липофильные субстраты – производные глицерина и аминокислот синтезированы впервые на кафедре органической химии Университета г. Вупперталь (ФРГ) по следующей общей схеме:



На первом этапе синтеза проводили ферментативную этерификацию глицерина, адсорбированного на силикагеле, двукратным молярным избытком винилового эфира лауриновой кислоты в присутствии 1,3-*sn*-специфической липазы *P. fluorescens* (далее – липаза) [11]. На втором этапе свободная гидроксильная группа в положении 2 у полученного 1,3-*sn*-дилаурина реагировала с *N*-Boc-защищенной аминокислотой в присутствии дициклогексилкарбодимида (DCC) и каталитических количеств *N,N*-диметил-4-аминопиридина (DMAP). Реакцию проводили в дихлорметане. После окончания реакции *N*-Boc-защитную группу снимали обработкой продукта сначала трифторуксусной, а затем – соляной кислотой, с образованием гидрохлорида соответствующей аминокислоты. Таким образом были получены три новых 1,3-дилаурил-2-аминоацилглицериды (псевдоглицериды) – гидрофобных производных аминокислот: валина (Val-PG), лейцина (Leu-PG) и фенилаланина (Phe-PG).

Обнаружено, что синтезированные липофильные субстраты, а также трилаурин способны образовывать стабильные монослои на границе раздела вода/воздух. Как видно из рис. 1, изотермы зависимости поверхностного давления от площади, приходящейся на молекулу (A), для всех синтезированных липофильных субстратов в монослое качественно подобны: имеют практически одинаковый наклон и протяженный “квазилинейный участок”, что свидетельствует о наличии только одного жидкоконденсированного состояния монослоя. Средние значения давлений коллапса монослоя (33–34 мН/м) для всех указанных соединений позволяют сделать заключение об их относительной устойчивости на границе раздела вода/воздух [2]. При давлении коллапса монослоя минимальные значения A для производных псевдоглицеридов (Val-PG, Leu-PG и Phe-PG) составляют 0.85, 0.76 и 0.68 нм². При этом величина площади, приходящейся на молекулу, для Phe-PG, имеющего два лаурильных и объемистый гидро-

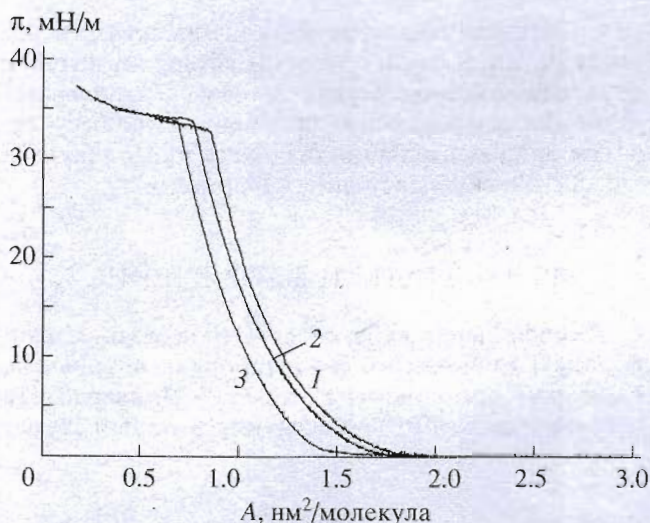


Рис. 1. Изотермы поверхностное давление – площадь, приходящаяся на молекулу, для монослоев Val-PG (1), Leu-PG (2) и Phe-PG (3) на границе раздела вода-воздух (температура 18°C).

фобный фенилаланильный заместители, практически равна утроенной площади сечения на молекулы жирной кислоты в монослое (0.22 nm² [2]), что указывает на плотную упаковку молекул в слое. Увеличение площади монослоя, приходящейся на молекулу, для Leu- и Val-псевдоглицеридов (что свидетельствует о соответствующем уменьшении степени упорядоченности молекул в монослое) коррелирует с уменьшением длины третьего гидрофобного заместителя. Аналогичная последовательность значений A в монослое (1.23, 1.17 и 1.05 nm²) наблюдается для указанных псевдоглицеридов (Val-PG, Leu-PG и Phe-PG) и в случае поверхностного давления 10 мН/м (именно

при этом поверхностном давлении, когда начинается протяженный квазилинейный участок на изотерме, и осуществляли изучение кинетики гидролиза указанных субстратов в монослое липазой из водной субфазы).

Для описания кинетики ферментативного гидролиза нами использована простейшая модель, представленная на рис. 2. Ориентированный в монослой субстрат находится на поверхности водной фазы и занимает объем I . Фермент распределен между водной фазой, объемом (V) и монослоем субстрата. В нашем предположении молекула фермента, контактирующая с монослоем, немедленно образует фермент-субстратный комплекс. Отметим, что большинство известных из литературы моделей взаимодействия молекулы фермента с монослоем субстрата учитывает стадию перехода фермента в сорбированное состояние и лишь затем – образование фермент-субстратного комплекса [4–6, 12]. Это необходимо при медленной сорбции фермента, когда ее скорость определяет скорость ферментативной реакции в целом, что приводит к появлению предстационарных эффектов: вначале реакция идет медленно с постепенным увеличением скорости (lag period) [4]. В нашем случае, как следует из рис. 3, такие эффекты отсутствуют.

Еще одно отличие нашей модели от цитированных выше [4–6, 12] заключается в том, что концентрация субстрата в монослое выражается в объемных величинах, а не в количестве молекул на единицу поверхности. Для изученных нами псевдоглицеридов и трилаурина толщина монослоя была принята равной 1.5 нм на основании ряда литературных данных [2]. В этом случае начальная скорость химической реакции, регистрируемая в пределах 10%-ной конверсии субстрата, вычисляется по формуле:

$$v_0 = \frac{\text{количество прореагировавшего субстрата в монослое (моль)}}{\text{время его превращения (с)} \cdot \text{объем монослоя (л)}}$$

Такой расчет скорости реакции дает возможность получить эффективные значения k_{cat} и $K_{\text{m(каж)}}$ в привычных размерностях (с⁻¹ и М соответственно). В соответствии со схемой, представленной на рис. 2, запишем уравнения материального баланса для фермента и субстрата, условие стационарности ($[ES] = \text{const}$) и уравнение скорости реакции:

$$V[E]_0 = V[E] + I[ES],$$

$$I[S]_0 = I[S] + I[ES] + V[P],$$

$$k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_{\text{cat}}[ES] = \frac{d[ES]}{dt} = 0, \quad (1)$$

$$v_0 = k_{\text{cat}}[ES].$$

При $[P] \rightarrow 0$ получим следующее выражение для начальной скорости:

$$v_0 = k_{\text{cat}}[ES] = \frac{k_{\text{cat}}[E]_0[S]_0}{\frac{k_{-1} + k_{\text{cat}}}{k_1} + [E]_0 + [S]_0 \frac{I}{V}}. \quad (2)$$

В выбранных нами условиях концентрация фермента $[E]_0$ варьирует от 0.75×10^{-11} до 3.40×10^{-10} М, а отношение $\frac{I}{V}$ составляет $1.4\text{--}1.8 \times 10^{-7}$.

Поскольку молярная концентрация субстрата в объеме монослоя $[S]_0$ для всех изученных веществ близка к 1.0 М, вкладом слагаемого $[E]_0$ в знаменателе правой части уравнения (2) следует

пренебречь. Легко заметить, что в таком виде из экспериментально полученной зависимости v_0 от $[E]_0$ невозможно раздельно получить константы

$$k_{cat} \text{ и } K_{m(\text{каж})} = \frac{(k_{-1} + k_{cat})}{k_1}. \text{ Для определения } k_{cat} \text{ восп-}$$

пользуемся следующим методическим подходом. При заданной концентрации фермента определим начальную скорость гидролиза, подобно тому как представлено на рис. 3. Затем при постоянном поверхностном давлении удалим монослой с поверхности водной фазы при помощи шприца. Конечно, при этом удаляется и часть водной фазы, но она невелика (не более 0.5% от общего объема) и ею можно пренебречь. Нанесем на поверхность новый монослой и вновь определим начальную скорость гидролиза (v_1). Повторим эту операцию несколько раз. Очевидно, что в каждом цикле количество фермента, равное $[ES]I$, удаляется с поверхности водной фазы. После первого цикла общая концентрация фермента в системе $[E]_1$ составит: $[E]_1 = k[E]_0$, а после i -го цикла $[E]_i = k^i[E]_0$. Логарифмируя последнее уравнение, получим $\ln[E]_i = i \ln k + \ln[E]_0$. Поскольку v_0 прямо пропорционально $[E]_0$, можно записать: $\ln v_i = i \ln k + \ln v_0$.

Из зависимости $\ln v_i$ от i были определены значения k , равные 0.92 для Phe-PG и 0.93 для трилаурина (см. вставку на рис. 3). Таким образом, 7–8% от внесенного в водную фазу фермента концентрируется в монослое, объем которого в миллионы раз меньше объема водной фазы!

Учитывая, что $[ES]I = V([E]_0 - [E]_1)$, получим

$$\frac{I[ES]}{V[E]_0} = \frac{[E]_0 - [E]_1}{[E]_0} = 1 - k \quad (3)$$

$$\text{и } [ES] = [E]_0(1 - k) \frac{V}{I}.$$

Перепишем уравнение (2) в виде:

$$v_0 = k_{cat}[E]_0(1 - k) \frac{V}{I}. \quad (4)$$

Экспериментально полученные зависимости v_0 от $[E]_0$ представлены на рис. 4. Видно, что предложенная нами кинетическая схема описывает процесс ферментативного гидролиза в монослоях лишь приблизительно. В пределах ошибки эксперимента скорость химической реакции монотонно возрастает с увеличением концентрации фермента, но не является ей строго прямо пропорциональной. При высоких концентрациях $[E]_0$ v_0 , по-видимому, стремится к предельному значению по крайней мере в реакции гидролиза трилаурина. Указанное явление не может быть описано уравнением (2), поскольку, повторим, $[E]_0 \ll \ll [S]_0 \frac{I}{V}$. Одним из возможных объяснений явля-

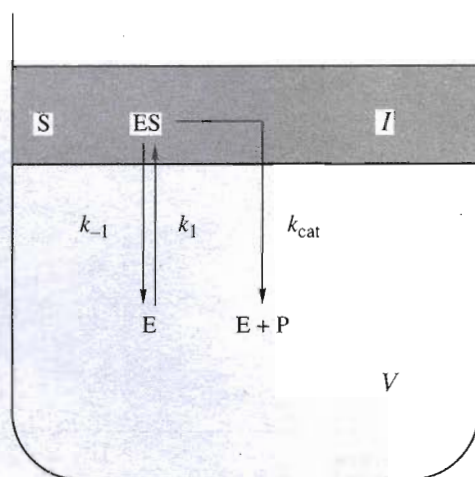


Рис. 2. Модель ферментативного гидролиза триглицеридов и псевдоглицеридов в монослое. I — объем субстрата в монослое, V — объем водной фазы.

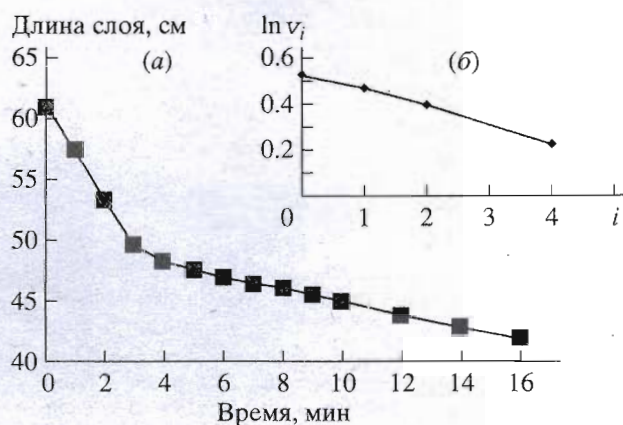


Рис. 3. Изменение длины монослоя субстрата в процессе ферментативного гидролиза трилаурина при концентрации липазы 1.7×10^{-10} М (а) и зависимость начальной скорости гидролиза (v_i) от количества последовательных нанесений трилаурина (i) в монослой над раствором фермента (б).

ется присутствие в препарате фермента примесей, способных влиять на связывание фермента с монослоем. В области малых концентраций фермента указанное влияние слабее, в связи с чем значение k_{cat} определяли согласно уравнению (4) из начальных участков кривых (см. таблицу). Приравнявая правые части уравнений (2) и (4), получим выражение для определения $K_{m(\text{каж})}$:

$$K_{m(\text{каж})} = \frac{[S]_0 - [S]_0(1 - k)}{(1 - k) \frac{V}{I}} = \frac{k[S]_0 I}{1 - k V}. \quad (5)$$

Концентрации субстратов $[S]_0$ в монослоях и соответствующие значения кажущихся констант Михаэлиса приведены в таблице. Интересно, что из уравнения (3) можно непосредственно опреде-

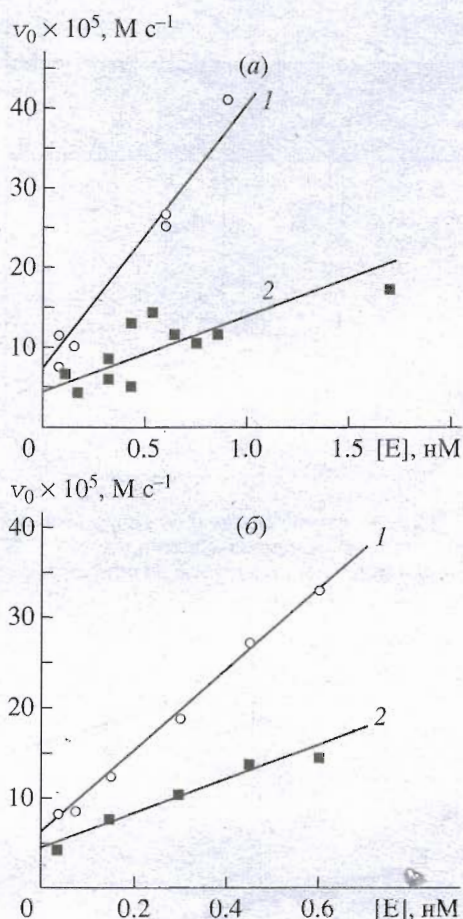


Рис. 4. Зависимости начальной скорости ферментативного гидролиза липофильных субстратов в монослое при поверхностном давлении 10 мН/м от концентрации липазы. Субстраты: Phe-PG (1), трилаурин (2) (а); Val-PG (1) и Leu-PG (2) (б).

лить концентрацию фермент-субстратного комплекса в монослое трилаурина, равную $9 \times 10^{-6} \text{ M}$ при исходной концентрации фермента в растворе $1.7 \times 10^{-10} \text{ M}$ (см. подпись к рис. 3). Зная объем монослоя, можно вычислить поверхностную концентрацию $[ES]$, равную приблизительно 8 молекул/мкм². Другими словами, площадь монослоя, приходящаяся на одну молекулу фермента в условиях эксперимента в несколько сот раз

Кинетические параметры ферментативного гидролиза липазой трилаурина и псевдоглицеридов в монослоях

| Субстрат | $[S]_0, \text{ M}$ | $k_{\text{cat}}, \text{ c}^{-1}$ * | $K_{\text{m(каж)}} 10^6, \text{ M}$ |
|-----------|--------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Трилаурин | 0.97 | 4 | 1.9 |
| Phe-PG | 0.81 | 11 | 1.7 |
| Leu-PG | 0.94 | 7 | 1.9 |
| Val-PG | 0.97 | 13 | 2.0 |

* Ошибка измерений $\pm 2 \text{ c}^{-1}$.

превышает площадь сечения самой молекулы фермента.

Из данных таблицы следует, что величины каталитических констант ферментативного гидролиза (k_{cat}) для псевдоглицеридов приблизительно соответствуют константам, найденным ранее для некоторых эмульгированных субстратов. Например, при гидролизе трибутирина, под действием липазы *Rhizopus oryzae*, в эмульсии, стабилизированной поливиниловым спиртом, $k_{\text{cat}} = 5 \text{ c}^{-1}$ и $K_{\text{m(каж)}} = 2.6 \times 10^{-3} \text{ M}$ [13], при этом на величины кинетических констант сильно влияют процессы эмульгирования субстрата. В отсутствие эмульгатора k_{cat} становится ниже, а $K_{\text{m(каж)}}$ — выше приведенных значений. Отметим, что сравнение вышеприведенных констант с найденными в данной работе носит приблизительный характер и показывает лишь примерное соответствие величин, полученных двумя различными способами. Авторы работы [13] не рассматривали процесс ассоциации фермента с мицеллами эмульгированного субстрата, а обрабатывали результаты кинетических экспериментов по классической схеме Михаэлиса–Ментен, в связи с чем обнаружили сильное влияние процессов эмульгирования на кажущиеся параметры ферментативной реакции.

Значения каталитических констант k_{cat} , полученные в данной работе, свидетельствуют о более высоких скоростях превращения синтетических псевдоглицеридов по сравнению с трилаурином. Этот, в общем, неожиданный результат можно объяснить особенностями строения псевдоглицеридов, содержащих в положении 2 остаток аминокислоты и, следовательно, алифатическую аминогруппу, протонированную в условиях проведения реакции (рН 7.0, см. “Эксперимент. часть”). Электростатическое взаимодействие положительно заряженного субстрата с молекулой липазы *P. fluorescens*, содержащей большое количество карбоксильных групп аспарагиновой (33 остатка) и глутаминовой (24 остатка) кислот [8], может приводить к снижению свободной энергии переходного состояния реакции образования ацилированного фермента, что является ключевым условием эффективности ферментативного катализа [14].

В заключение отметим, что вопрос о соответствии параметров ферментативных реакций, протекающих в монослоях водонерастворимых субстратов и в их эмульсиях, до сих пор остается открытым. Данная работа является одной из первых попыток, предпринятых в направлении решения этой проблемы. В ходе исследований нами предложен оригинальный подход к определению параметров ферментативного гидролиза липидоподобных субстратов, организованных в мономолекулярные слои на границе раздела фаз. Это дает возможность дальнейшего изучения химичес-

ких превращений субстратов подобного типа под действием липаз в монослоях и в объеме и сопоставления количественных характеристик этих реакций.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез липофильных субстратов (псевдоглицеридов) – производных глицерина и аминокислот: валина (Val-PG), лейцина (Leu-PG) и фенилаланина (Phe-PG) проведен на кафедре органической химии Университета г. Вупперталь (ФРГ) и детально описан в работе [11].

В данной работе использовали препарат частично очищенной липазы *P. fluorescens* (M 33 кДа), любезно предоставленный фирмой RÖHM Pharma (ФРГ). 40 мг препарата фермента растворяли в 2 мл 10 мМ KH_2PO_4 (рН 7.0) (Sigma, США) при перемешивании и охлаждении льдом на магнитной мешалке в течение 1 ч, после чего отделяли раствор от нерастворимых примесей фильтрованием. Активность фермента определяли в реакции гидролиза 2% раствора три(ацетил)глицерина (триацетина) в 0.05 М CaCl_2 и 0.05 М NaCl (рН 7.0) путем титрования выделяющейся уксусной кислоты 0.01 М раствором NaOH (все реагенты Sigma, США) на автоматическом титраторе ТТТ 80 (Radiometer, Дания). Содержание белка в полученном растворе определяли по методу Бредфорд [15] и использовали при расчете каталитических констант. По данным фирмы-производителя липаза является основным белковым компонентом предоставленного препарата фермента. Весовое содержание белка в препарате фермента 0.25%. Перед экспериментами в монослоях 10 мкл раствора липазы переносили в водную субфазу весов Ленгмюра и смесь тщательно перемешивали.

Монослои указанных липофильных субстратов и трилаурина были получены и исследованы на установках "Lauda FW2" (ФРГ) и "NIMA" (Англия), работающих по принципу Ленгмюра и Вильгельми [2], соответственно. 10–50 мкл 10 мМ раствора трилаурина (Sigma, США) в хлороформе наносили на поверхность раздела водная субфаза/воздух. Водная субфаза представляла собой 10 мМ фосфатный буфер с рН 7.0, содержащий свежеприготовленный раствор липазы. Изотермы поверхностное давление (π) – площадь на молекулу (A) записывали при сжатии монослоя с постоянной скоростью 10 $\text{см}^2/\text{мин}$.

Из серии последовательных нанесений и удалений монослоя трилаурина на одной и той же водной субфазе был определен коэффициент распределения фермента между монослоем и субфазой. Более подробно указанные эксперименты описаны при обсуждении результатов.

Кинетику ферментативного гидролиза трилаурина и липофильных субстратов, организован-

ных в монослои на границе раздела фаз вода-воздух, проводили при постоянном поверхностном давлении 10 мН/м. Реакцию проводили на "пленочных весах" обычного типа, состоящих из одного отсека ("ванны"). Как показано на рис. 3, при конверсии субстрата в пределах 10–15% площадь монослоя линейно уменьшается с течением времени, что дает возможность надежно измерять начальную скорость реакции в широком диапазоне ее значений (правая "ветвь" кривой рис. 3а). Левая "ветвь" кривой рис. 3а отражает процесс уравнивания монослоя в течение нескольких минут после приложения к нему поверхностного давления.

Величину I (объем монослоя) вычисляли, умножая площадь монослоя на его толщину, приняв за 1.5 нм (см. "Результаты и обсуждение"). Площадь монослоя рассчитывали, умножая его начальную длину на ширину ванны. Начальную длину монослоя определяли путем экстраполяции линейного участка зависимости длины монослоя к оси ординат (рис. 3). Далее, зная объем ванны V (для установок Lauda и NIMA, 0.7 дм^3 и 1 дм^3 соответственно), рассчитывали отношение I/V.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Н.А. Калабиной за помощь в работе. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Volkswagen № I/69913 (ФРГ) и РФФИ (Россия).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ransac S., Moreau H., Riviere C., Verger R. // *Methods in Enzymology*. 1991. V. 197. P. 49–65.
2. Birdi K.S. *Lipid and Biopolymer Monolayers at Liquid Interfaces*. New York, London: Plenum Press, 1989.
3. Бадер Х., Дорн К., Хунфер Б., Ринддорф Х. // *Успехи химии*. 1987. Т. 56. С. 2028–2077.
4. Verger R., de Haas G.H. // *Chem. Phys. Lipids*. 1973. V. 10. P. 127–136.
5. Verger R., Mieras M.C.E., de Haas G.H. // *J. Biol. Chem.* 1973. V. 248. P. 4023–4034.
6. Ransac S., Riviere C., Soulie J.M., Gancat C., Verger R., de Haas G.H. // *Biochem. Biophys. Acta*. 1990. V. 1043. P. 57–66.
7. Березин И.В., Клесов А.А. *Практический курс химической и ферментативной кинетики*. М.: МГУ, 1976.
8. *Lipases* / Eds B. Borgstrom, H.L. Brockman. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier, 1984.
9. Bosley J.A., Clayton J.C. // *Biotechnol. Bioeng.* 1994. V. 43. P. 934–938.
10. Ivanov A.E., Schneider M.P. // *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic*. 1997. V. 3. P. 303–309.
11. Dever M., Schneider M. // *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 1992. V. 69. P. 961–965.
12. Dever A.M.Th.J., Dijkman R., Leuweling-Tjeenk M., van der Berg L., Ransac S., Batenburg M., Egmont M., Ver-

- heji H.M., de Haas G.H. // *Biochemistry*. 1991. V. 30. P. 1034–1042.
13. Неклюдов А.Д., Шведов Б.Д., Цибанов В.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 1981. Т. 17. С. 510–515.
14. Березин И.В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа. М.: Высшая школа, 1977.
15. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1978. V. 86. P. 142–146.

The Hydrolysis of New Lipid-like Substrates and Trilaurin in Monolayers Catalyzed with the Lipase from *Pseudomonas fluorescens*

S. Yu. Zaitsev*, B. Aha**, T. A. Volchenkova*, S. V. Belov*, M. P. Schneider**, and A. E. Ivanov*#

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia

**Bergische Universität Gesamthochschule, Gauss-Strasse 20, 42097 Wuppertal, Federal Republic of Germany

A simple method for determining the enzymic hydrolysis parameters of lipid-like substrates and trilaurin assembled in monolayers at the water-air interface was suggested. At a surface pressure of 10 mN/m, the initial rates of lipolysis were found to be proportional to the decrease in area of the substrate monolayer caused by the enzymic hydrolysis in a single-compartment Langmuir balance. The kinetic parameters for the hydrolysis of trilaurin and three 1,3-dilaurylpseudoglycerides acetylated in position 2 with an amino acid (phenylalanine, leucine, or valine) catalyzed with lipase from *Pseudomonas fluorescens* were determined. Unlike models of enzymic hydrolysis that neglect the thickness of the substrate monolayer, our method allows the determination of kinetic parameters in standard dimensions. The values of k_{cat} for the synthetic pseudoglycerides were found to be significantly higher than that for trilaurin, while the values of $K_{\text{m(app)}}$ were close. This may be due to the presence of positively charged primary amino groups in the molecules of pseudoglycerides.

Key words: enzymic hydrolysis, lipase, Langmuir film balance, monolayers, pseudoglycerides, triglycerides

To whom correspondence should be addressed; phone +7 (095) 336-0600; e-mail: zubov@ibch.siobc.ras.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 3. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.