

АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

На правах рукописи

УДК 577.152.1. + 577.152.3. +
577.158.52.02. + 541.128.135.

ПУЧКАЕВ Андрей Витальевич

РЕАКЦИИ ПЕРОКСИДАЗЫ, ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И УРЕАЗЫ
В НЕВОДНЫХ СРЕДАХ

03.00.04. - Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата
химических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор

Д. И. Метелица

Минск - 1993



Ab. 36. 434

Работа выполнена в лаборатории прикладной энзимологии
Института биоорганической химии АН Беларуси, г. Минск.

Научный руководитель: доктор химических наук
профессор Д.И. МЕТЕЛИЦА

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук В.Н.НИКАНДРОВ

кандидат химических наук М.А.КИСЕЛЬ

Ведущая организация - Биологический факультет Белорусского
Государственного Университета
(кафедра биохимии)

Защита диссертации состоится "25" ноября 1993 Г.
в "___" часов на заседании специализированного совета
Д 006.22.01. по защите диссертаций на соискание ученой степени
доктора наук при Институте биоорганической химии АН Беларуси по
адресу: 220141, Минск, Академгородок, ул. Жодинская, 5/2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
биоорганической химии АН Беларуси.

Автореферат разослан "___" октября 1993 Г.

Ученый секретарь
специализированного совета,
кандидат химических наук

Н.М. ЛИТВИНКО

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Современная биохимия, биотехнология и инженерная энзимология выдвигают требования по использованию ферментов в неводных средах. Органические среды дают преимущества при синтезе пептидов и получении эфиров, модифицировании ферментов труднорастворимыми в воде соединениями, которые могут быть объектами биоаналитического определения в иммунохимических методах с использованием ферментных конъюгатов, трансформации плохо растворимых в воде биологически активных веществ (стероиды, канцерогены, токсиканты окружающей среды).

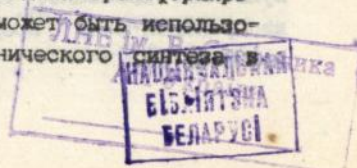
Ожидается, что использование неводных сред для проведения ферментативных реакций станет новым крупным шагом в биотехнологии, исследовании аналитических свойств ферментов и при разработке методов тонкого органического синтеза.

Наряду с большой практической значимостью изучение ферментативных процессов в нетрадиционных средах имеет фундаментальное значение, так как эти процессы часто сопровождаются изменением скорости, субстратной специфичности и региоселективности биокатализаторов, диссоциацией олигомерных белков на субъединицы. Важной задачей исследователей становится предотвращение нежелательных процессов инактивации и денатурации белков органическими растворителями.

В качестве нетрадиционных сред для ферментативных реакций в последнее время особенно интенсивно изучаются водно-органические смеси, микроэмульсии и обращенные мицеллы ПАВ в органических растворителях.

Объектами данного исследования в перечисленных средах стали три фермента, различающиеся молекулярной массой, строением, типом катализируемых реакций и свойствами субстратов: пероксидаза хрена (КФ 1.11.1.7.), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.49) и уреазы (КФ 3.5.1.5).

Пероксидаза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа и уреазы широко применяются в ИФА. Практические потребности очистки сточных вод определяют необходимость изучения воздействия органических растворителей на уреазу. Способность пероксидазы трансформировать широкий ряд ароматических соединений может быть использована при разработке методов тонкого органического



неводных средах.

В литературе отсутствуют систематические данные о каталитической активности трех вышеперечисленных ферментов в органических растворителях. Поэтому изучение каталитических свойств пероксидазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и уреазы в различных неводных средах является весьма актуальным и представляет значительный фундаментальный интерес.

Работа выполнялась в соответствии с заданиями Государственной научно-технической программы "Новейшие методы биоинженерии" и Республиканской научно-технической программы 69.03 р "Здоровье".

Цель работы. Целью настоящего исследования было сравнительное изучение каталитической активности пероксидазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и уреазы в различных неводных средах. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- Изучить влияние полярных органических растворителей на каталитическую активность ПХ, ГбФДГ и уреазы в водно-органических смесях;
- Исследовать реакции ПХ, ГбФДГ и уреазы в бездетергентных микроэмульсиях "гексан-спирт-вода" и найти оптимальные условия проведения этих ферментативных процессов;
- Изучить каталитическую активность ГбФДГ и уреазы в обращенных мицеллах ПАВ разной природы в органических растворителях;
- Выявить общие закономерности и дать практические рекомендации по использованию ПХ, ГбФДГ и уреазы в водно-органических смесях и микроэмульсиях в неполярных органических растворителях.

Научная новизна. Определены кинетические параметры ферментативных реакций в водно-органических смесях диметилформамида (ДМФ), диметилсульфоксида (ДМСО), формамида, изопропанола, диоксана и предложен механизм действия этих органических растворителей на каталитическую активность ферментов.

Проведено пероксидазное окисление орто-фенилендиаминна и люминола и уреазный гидролиз мочевины в бездетергентных микроэмульсиях. Доказано, что использование тройной системы "гексан-изопропанол-вода" предпочтительнее системы "гексан-трет. бутанол-вода".

Оптимизированы условия реакции уреазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в обращенных мицеллах ПАВ разного состава в органических растворителях и показано, что максимальная эффективность этих ферментов достигается в смешанных мицеллах анионного и нейтрального ПАВ.

Практическая значимость работы. Изучено пероксидазное окисление в неводных средах люминола и орто-фенилендиамина (о-ФДА). о-ФДА применяется в ИФА для регистрации пероксидазной метки, а люминол широко используется в ХИФА и люминесцентных процессах. Данные, полученные при изучении каталитической активности пероксидазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и уреазы в различных неводных средах могут быть использованы при разработке аналитических систем с участием этих ферментов и методов тонкого органического синтеза (пероксидаза). Полученные в работе результаты представляют интерес для специалистов в области инженерной и мицеллярной энзимологии.

Апробация работы. Основные результаты работы доложены на 8-ой Международной конференции молодых ученых по органической и биоорганической химии (Латвия, Рига, 1990) и на 9-ом Международном симпозиуме по поверхностно-активным веществам в растворе (Болгария, Варна, 1992).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 статей и тезисы 3-х докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы (1 глава), экспериментальной части (4 главы), заключения, выводов, списка цитируемой литературы и списка работ автора по теме диссертации. Работа изложена на 197 страницах, включает 14 таблиц и 56 рисунков. Библиография - 178 названий.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования: пероксидаза хрена (ПХ) со спектральным показателем чистоты $RZ = 2,7$, гемин, глюкозо-6-фосфатде-

гидрогеназа из микроорганизмов *Leuconostoc sp. 5_S* и уреазы из соевых бобов.

Пероксидазное окисление орто-фенилендиамина (о-ФДА) и люминола проводили в цитратном (рН 4,7-5,0) и боратном буфере (рН 8,5-9,5) в присутствии перекиси водорода. При окислении о-ФДА за реакцией следили спектрофотометрически по накоплению продуктов реакции. Реакцию окисления люминола характеризовали величиной максимальной интенсивности хемилюминесценции в условных единицах, соответствующих показаниям рекордера в вольтах.

Дегидрирование глюкозо-6-фосфата с участием ГБФДГ проводили в 0,1 М NaOH-глициновом буфере с рН 9,1 при 20°. За реакцией следили спектрофотометрически по росту оптической плотности образующегося НАДФ·Н.

Активность уреазы определяли спектрофотометрически двумя способами - по увеличению концентрации образующегося аммиака с использованием реактива Несслера или по образованию индофенольной сини в реакции Бертра. В бездетергентных микроэмульсиях и обращенных мицеллах ПАВ в октане использовали только второй метод.

Все ферментативные процессы (кроме пероксидазного окисления люминола) характеризовали начальными скоростями в М/с.

При обработке ГБФДГ бифункциональными швивающими реагентами использовали глутаровый диальдегид, диметиладипимидат и диметилсуберимидат.

Микроэмульсионные системы готовили встряхиванием необходимых количеств воды и органических компонентов до образования оптически прозрачных смесей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

КИНЕТИКА ПЕРОКСИДАЗНЫХ РЕАКЦИИ В НЕВОДНЫХ СРЕДАХ

Водно-органические среды. В качестве органических соразворителей при пероксидазном окислении о-ФДА были выбраны изопропанол, ДМФ, ДМСО, формамид и диоксан. Независимо от природы органического компонента среды каталитическая активность ПХ уменьшается в 4-5 раз с ростом содержания органического растворителя до 20-25% и затем монотонно снижается при дальнейшем увеличении концентраций соразворителей.

Показано, что зависимости начальной скорости пероксидазного

окисления от начальных концентраций о-ФДА и H_2O_2 во всех водно-органических смесях, содержащих до 30% органического компонента, описываются уравнением Михаэлиса-Ментен. Из анаморфоз этих зависимостей в координатах Лайнуивера-Берка вычислены значения каталитических констант ($k_{кат}$) и констант Михаэлиса (K_M).

Значения $k_{кат}$ снижаются с увеличением концентрации органических компонентов смесей до 30%. Константы Михаэлиса в тех же условиях не изменяются. Таким образом, для большинства смесей (кроме "буфер-формаид") проявляется неконкурентное ингибирование ферментативного процесса органическим растворителем, то есть реализуется связывание молекул растворителя с ПХ вдали от ее активного центра (иначе ингибирование было бы конкурентным). При больших концентрациях органических растворителей происходит инактивация пероксидазы.

Бездетергентные микроэмульсии

Окисление орто-фенилендиамина. Окисление о-ФДА проводилось в двух типах бездетергентных микроэмульсий: гексан-изопропанол-вода и гексан-трет.бутанол-вода. Полученные кинетические характеристики процесса представлены в таблице 1.

Каталитическая активность ($k_{кат}$) в бездетергентных микроэмульсиях составляет 8% по сравнению с активностью в водном растворе. Эффективность фермента, выраженная отношением $k_{кат}/K_M$, в бездетергентных микроэмульсиях двух типов меньше, чем в воде. Тройная система гексан-изопропанол-вода предпочтительнее для ферментативного катализа чем система гексан-трет.бутанол-вода (см. табл. 1). Этот вывод подтверждается при сравнении каталитических параметров пероксидазного окисления о-ФДА в разных микроэмульсиях по перекиси водорода (данные представлены в таблице 2).

Окисление люминола. В бездетергентных микроэмульсиях ПХ и гемин являются эффективными катализаторами окисления люминола (см. табл. 3). На рис. 1 представлена зависимость каталитической активности гемина (в % по отношению к воде) в тройной системе гексан-изопропанол-вода. Как видно из рисунка, максимальная каталитическая активность наблюдается именно в области микроэмульсий. Аналогичные зависимости наблюдаются для всех изученных нами ферментов.

Таблица 1

Кинетические параметры пероксидазного окисления орто-фенилендиамина в разных средах при 20°C.

№	Среда пероксидазной реакции	$10^3 \cdot K_M$, М	$10^{-3} \cdot k_{кат}$, с ⁻¹	$10^{-6} \cdot (k_{кат}/K_M)$, М ⁻¹ ·с ⁻¹
1	0,1 М цитратно-фосфатный буфер, рН 4,7	1,5 ± 0,1	21,4 ± 0,9	14,30
2	Микроэмульсия, содержащая 8х 0,01 М цитратного буфера с рН 5,0 в смеси гексан-изопропанол (1:1)	1,5 ± 0,3	1,7 ± 0,2	1,10
3	Микроэмульсия, содержащая 4х 0,01 М цитратного буфера с рН 5,0 в смеси гексан-трет.бутанол (1:1)	2,6 ± 0,8	1,6 ± 0,2	0,62

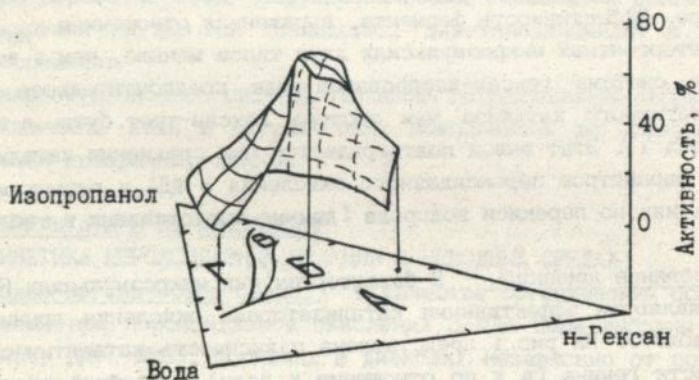


Рис. 1. Зависимость активности гемина (в % от активности в водном растворе NaOH) в тройной системе гексан-изопропанол-0,04 М NaOH. Концентрации компонентов даны в мольных долях. А - расслоение, Б - бездетергентные микроэмульсии, В - ассоциаты воды и изопропанола, Г - истинные тройные растворы. Границы областей определены кондуктометрическим титрованием (Smith G.D., 1982).

Таблица 2

Кинетические параметры пероксидазного окисления орто-фенилендиамина в микроэмульсиях по перекиси водорода (20°C).

Состав микроэмульсии, объемные про- центы	$10^3 \cdot K_M$ М	$10^{-3} \cdot k_{кат}$ с ⁻¹	$10^{-6} \cdot (k_{кат}/K_M)$ М ⁻¹ ·с ⁻¹
Гексан - 47,1			
Изопропа- нол - 45,2	0,17 ± 0,02	1,0 ± 0,05	6,1
Вода - 7,7			
Гексан - 50,0			
Трет. бута- нол - 46,0	1,90 ± 0,30	0,8 ± 0,07	0,4
Вода - 4,0			

Интенсивность хемилюминесценции при пероксидажном окислении в бездетергентных микроэмульсиях фиксированных концентраций люминола в 3 раза выше по сравнению с водным раствором. Гемин сохраняет 80% каталитической активности в этом процессе (см. табл. 3). Скорость достижения максимальной интенсивности хемилюминесценции в 5-6 раз выше, чем в воде. Введение в реакционную среду циклогексанола (4-10%) вместо изопропанола увеличивает интенсивность хемилюминесценции на 20-50% для ПХ и в 2 раза для гемина. Стимулирующая роль циклогексанола может быть связана с реакцией окисления вторичного спирта радикалами $HO\cdot$, то есть циклогексанол в процессе окисления выводит из реакции радикалы $HO\cdot$, которые ингибируют окисление люминола из-за образования аминофенолов.

Инактивация ПХ в бездетергентных микроэмульсиях гексан-изопропанол-вода при малых рН (окисление о-ФДА при рН 5,0) намного меньше, чем при высоких (окисление люминола при рН 9,5). При щелочных рН наблюдается сильная диссоциация гема из ПХ, который сам по себе является эффективным катализатором окисления люми-

Таблица 3

Эффективность пероксидазы хрена (ПХ) и гемина в пероксидазном окислении люминола в разных средах: $I_{\text{макс}}$ приведено в расчете на 2.5 нМ биокатализатора.

Катализатор	Среда реакции	Люминол, мМ	H_2O_2 , мМ	$I_{\text{макс}}$, В
ПХ	Буферный раствор*	1.8	2.0	0.2
ПХ	Гексан - 49%	2.0	2.0	0.6
	Изопропанол-45%			
	Буферный раствор - 4.5%			
	ДМСО - 1.5%			
ПХ	Гексан - 49%	2.0	2.0	1.1
	Изопропанол-45%			
	Водный раствор - 4.5%			
	Циклогексанол-5.0%			
	ДМСО - 1.5%			
Гемин	Водный раствор**	0.06	2.0	0.6
Гемин	Гексан - 48.3%	0.06	2.0	0.5
	Изопропанол - 40%			
	Водный раствор-7.4%			

* - 0,02 М боратный буфер с рН 9,5 ;

** - водный раствор 0,04 М NaOH.

нола. Следует отметить, что в бездетергентных микроэмульсиях при окислении о-ФДА гемин не проявлял каталитической активности.

КИНЕТИКА ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ РЕАКЦИИ В НЕВОДНЫХ СРЕДАХ.

Водно-органические смеси. В случае Г6ФДГ влияние органических растворителей на кинетические параметры реакции носит более сложный характер, чем для ПХ. Помимо ингибирующего действия, добавка органических растворителей в водный раствор вызывает изменение физико-химических характеристик среды, которые в свою очередь могут воздействовать на ферментативный процесс. Показано, что с уменьшением диэлектрической проницаемости реакционной среды, то есть при увеличении концентрации органических соразтворителей в водно-органических смесях (кроме формамида), происходит систематическое уменьшение константы Михаэлиса K_M по субстрату. На рис.2 показана линейная зависимость логарифма константы Михаэлиса по субстрату от обратной величины диэлектрической проницаемости водно-органических смесей. Этот факт свидетельствует о том, что в связывании полярного заряженного субстрата глюкозо-6-фосфата (ГФ) с активным центром Г6ФДГ важную роль играют электростатические взаимодействия, что отражается на сродстве субстрата к ферменту. Величина $1/\epsilon K_M$ рассматривается как мера разницы энергии свободного субстрата и субстрата, связанного с ферментом.

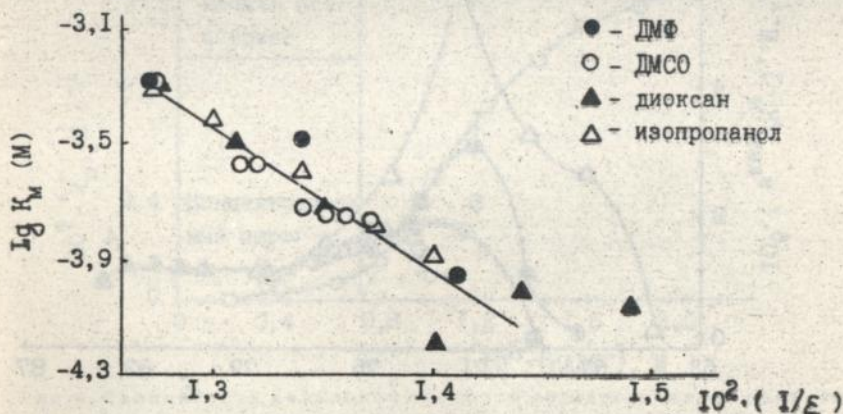


Рис.2. Зависимости логарифма констант Михаэлиса по субстрату от обратной величины диэлектрической проницаемости смесей буфера с ДМФ (1), ДМСО (2), диоксаном (3) и изопропанолом (4).

Изменение в широком интервале диэлектрической проницаемости смесей "буфер-диоксан" практически не влияет на K_M по кофактору НАДФ⁺, что подчеркивает гидрофобный характер связывания кофактора с ферментом. Уменьшение K_M по ГФ наблюдается в сравнительно узких интервалах концентраций органических растворителей (до 15-18%). Дальнейшее увеличение содержания органического компонента в системе приводит к резкому возрастанию K_M и инактивации фермента (до 25-27%). Так как при добавлении органических соразтворителей в водный раствор происходит уменьшение $k_{кат}$, а значения K_M сначала уменьшаются, а затем увеличиваются, эффективность фермента ($k_{кат}/K_M$) имеет максимумы. На рис. 3 видно, что эффективность фермента максимальна при одном и том же значении ϵ независимо от природы органического соразтворителя.

Обработка фермента тремя бифункциональными реагентами (глютаровым диальдегидом, диметилсуберимидатом и диметиладипимидатом) не меняет каталитических свойств ГДФДГ при содержании ДМФ в смесях выше 15%. Из этого следует, что при наличии ДМФ в среде (выше 15%) происходит инактивация субъединиц фермента, а затем его диссоциация на мономеры.

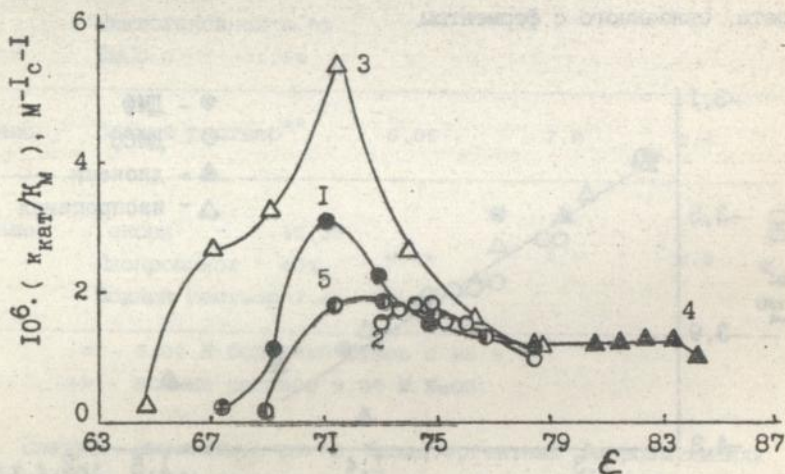


Рис. 3. Зависимости отношения $k_{кат}/K_M$ от диэлектрической проницаемости смесей при дегидрировании глюкозо-6-фосфата: 1 - ДМФ, 2 - ДМСО, 3 - диоксан, 4 - формамид и 5 - изопренал.

Обращенные мицеллы ПАВ. Каталитическая активность ГБФДГ исследована в обращенных мицеллах ПАВ разной природы: анионных (Аэрозоль ОТ), катионных (ЦТАБ), нейтральных (Тритон X-100) и смешанных (АОТ+Тритон X-45). Кинетика ГБФДГ-зного процесса в обращенных мицеллах ПАВ в октано подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен. Иногда наблюдались сигмоидные зависимости начальной скорости реакции от концентраций субстрата и кофактора, как, например, в случае смешанных обращенных мицелл для НАДФ⁺ (рис. 4). Сигмоидная зависимость, представленная на рис. 4, не спрямляется в координатах Лайнуивера-Берка, так как субстрат и кофактор сложным образом распределяются между полярной фазой мицелл и органическим растворителем и при больших концентрациях могут участвовать в формировании мицелл. При добавлении малых количеств LiCl в реакционную среду (рис. 4) кофактор первоначально принимает участие в мицеллообразовании и поэтому плохо доступен для фермента. При дальнейшем увеличении концентрации кофактор попадает в водную полость мицеллы и становится доступным для биокаталитической реакции. Этим объясняется поро-



Рис. 4. Зависимость начальной скорости реакции дегидрогеназной реакции от концентрации кофактора в смешанных мицеллах АОТ и Тритона X-45 : 0,1 М АОТ + 0,1 М Тритон X-45 в октано, 12% полярной фазы, 0,1 мг/мл ГБФДГ, 0,06 мМ ГФ. Символ (*) обозначает "модифицированную" систему координат.

вый характер зависимости на рис. 4. Линеаризация зависимости начальной скорости реакции от концентрации НАДФ⁺ в обратных координатах возможна, если учесть "концентрационный порог" - количество кофактора, недоступного для ферментативной реакции. Для этого необходимо перенести начало оси абсцисс на величину "концентрационного порога" (рис. 4). В "модифицированных" двойных обратных координатах возможна удовлетворительная линеаризация зависимости.

Тот факт, что ГФ может участвовать в мицеллообразовании, был непосредственно нами доказан. На рис. 5 представлена зависимость начальной скорости ферментативной реакции в смешанных мицеллах от концентрации ГФ при высоком содержании воды в системе (16%). При уменьшении концентрации субстрата наблюдалось разрушение микроэмульсий, то есть не хватало дополнительного ПАВ для стабилизации мицеллярной системы. Нам не удалось изучить каталитическую активность Г6ФДГ в бездетергентных микроэмульсиях, так как добавление даже очень малых концентраций ГФ в систему вызывало агрегацию субстрата, вследствие чего эмульсии теряли оптическую прозрачность. Мы не можем точно охарактеризовать распределение кофактора и субстрата между растворителем и полярной фазой мицелл, а такое распределение, как известно, сильно сказывается на кинетических параметрах ферментативных процессов в обращенных мицеллах.

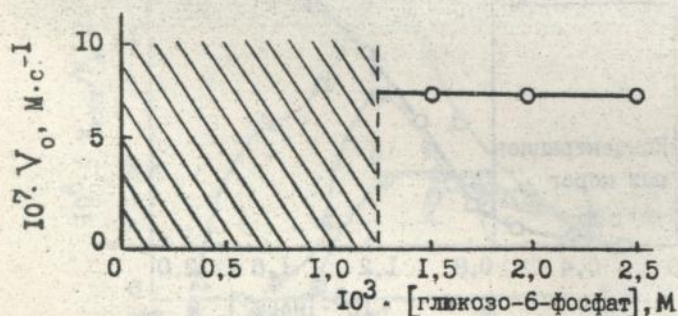


Рис. 5. Зависимость начальной скорости дегидрирования ГФ от его концентрации с участием Г6ФДГ в смешанных мицеллах при высоком содержании водного компонента: 0,1 М АДТ + 0,1 М Тритон X-45 в октане, 16% полярной фазы, 100 мкг/мл Г6ФДГ, 0,1 мМ НАДФ⁺. Заштрихована область разрушения мицеллярной системы.

В таблице 4 и 5 представлены кинетические характеристики дегидрирования ГФ в буферном растворе и в обращенных мицеллах ПАВ разной природы. Как правило, константы Михаэлиса K_M по субстрату (табл. 4) в мицеллах разного состава существенно ниже их значений в водном растворе. Это связано с концентрированием водорастворимого субстрата в полярном ядре мицелл.

Таблица 4

Кинетические параметры дегидрирования ГФ по субстрату в обращенных мицеллах ПАВ в органических растворителях при 20°C: полярная фаза обращенных мицелл включала 0,1 М NaOH-глициновый буфер с рН 9,1

Среда	$10^5 \cdot K_M$, М	$k_{кат}$, с ⁻¹	$10^{-6} \cdot (k_{кат} / K_M)$, М ⁻¹ с ⁻¹
Водный р-р	41.0 ± 3.0	533 ± 15	1.30
ЦТАБ	-	-	-
0,2 М в смеси октан-октанол (7:2)	-	-	-
АОТ	18.0 ± 4.0	2.1 ± 1.0	0.01
0,2 М в октане 7% полярной фазы	-	-	-
Тритон X-100	1.5 ± 0.2	14.6 ± 0.9	1.00
0,2 М в смеси октан-октанол (7:1) 5% полярной фазы	-	-	-
АОТ + Тритон X-45	1.2 ± 0.3*	177 ± 15*	14.75*
0,1 М + 0,1 М в октане 12% полярной фазы	-	-	-

Символ * указывает использование модифицированных систем координат.

Константы Михаэлиса по кофактору НАДФ⁺ (табл. 5) в буферном растворе и в мицеллярных системах отличаются не столь существенно и характеризуются одним порядком величин ~ 10⁻⁵ М. По нашему мнению, нельзя переоценивать истинность величин K_M в таблицах 4 и 5, помеченных символом (*) из-за сложной природы

Таблица 5

Кинетические параметры дегидрирования ГФ по кофактору в обращенных мицеллах ПАВ в органических растворителях при 20°C: полярная фаза обращенных мицелл включала 0,1 М NaOH-глициновый буфер с рН 9,1

Среда	$10^5 \cdot K_M \cdot M$	$k_{кат}, c^{-1}$	$10^{-6} \cdot (k_{кат} / K_M), M^{-1}c^{-1}$
Водный р-р	$3,1 \pm 0,2$	527 ± 4	18,61
ЦТАБ	-	-	-
0,2 М в смеси октан-октанол (7:2)	-	-	-
АОТ 0,2 М в октане 7% полярной фазы	$9,0 \pm 2,0$	$2,6 \pm 0,2^*$	$0,03^*$
Тритон X-100 0,2 М в смеси октан-октанол (7:1) 5% полярной фазы	$1,4 \pm 0,2$	$17,9 \pm 0,9$	1,27
АОТ + Тритон X-45 0,1 М + 0,1 М в октане 12% полярной фазы	$0,7 \pm 0,1^*$	$191 \pm 14^*$	$27,29^*$

Символ * указывает использование модифицированных систем координат

распределения субстрата и кофактора в мицеллярных системах, что отмечено выше.

Сравнение каталитических констант показывает, что активность ГФДГ в мицеллах возрастает в зависимости от их состава и увеличивается в последовательности: мицеллы АОТ < мицеллы Тритона X-100 < смешанные мицеллы АОТ-Тритон X-45 < 0,1 М NaOH-глициновый буфер с рН 9,1. В смешанных мицеллах $k_{кат}$ почти вдвое ниже его значения в водном растворе.

Сравнение параметра $k_{кат} / K_M$ по субстрату (табл. 4) показы-

вает, что в смешанных мицеллах эффективность ГФДГ в ~ 11 раз выше, чем в буферном растворе. Это означает, что окружение смешанных мицелл создает более благоприятную для катализатора среду в сравнении с обычным буферным раствором. Полученные данные подчеркивают важность создания вокруг определенного фермента специфически действующего на него окружения. В конкретном случае ГФДГ такое окружение создается сочетанием анионного (АОТ) и нейтрального (Тритон X-45) ПАВ.

КИНЕТИКА УРЕАЗНОЙ РЕАКЦИИ В НЕВОДНЫХ СРЕДАХ.

Водно-органические смеси. Добавление органических растворителей в реакционную среду вызывает падение начальных скоростей уреазного гидролиза мочевины. При этом наблюдается ингибирование ферментативного процесса по неконкурентному типу, то есть уменьшается каталитическая константа $K_{кат}$ и не изменяется константа Михаэлиса K_M (см. табл. 6). Очевидно, что в случае ПХ и уреазы диэлектрическая проницаемость среды не влияет на кинетические параметры реакции.

Для всех изученных нами ферментов при больших концентрациях органических соразтворителей в реакционной среде наблюдается инактивация и денатурация белков. Следует отметить, что только уреазы обладает высокой устойчивостью к растворителям. Фермент проявляет высокую каталитическую активность при содержании органического компонента вплоть до 60%.

Бездетергентные микроэмульсии. Каталитическая активность уреазы сильно зависит от содержания воды в органической среде. Резкое возрастание ферментативной активности наблюдается выше 3% воды, то есть необходим некоторый минимум воды, расходуемой на создание гидратной оболочки вокруг белка с большой молекулярной массой (590000) и при его высокой концентрации в реакционной системе (~40 мкМ/мл). Использование больших концентраций белка в бездетергентных микроэмульсиях (выше 40 мкМ/мл) нежелательно из-за агрегации белка и потери микроэмульсиями оптической прозрачности. Другими словами, бездетергентным микроэмульсиям не хватает сольбилизационной емкости для растворения достаточно больших концентраций фермента.

Зависимость начальной скорости уреазной реакции гидролиза



Таблица 6

Кинетические параметры уреазного гидролиза мочевины в различных неводных средах

Реакционная среда	H_2O , %	$k_{кат}$, $с^{-1}$	$10^3 \cdot K_M$, М	$10^{-3}(k_{кат}/K_M)$, $М^{-1} \cdot с^{-1}$	
0,05 М фосфатный буфер с рН 7,0	100	118 ± 2	$6,8 \pm 0,4$	$17,4 \pm 0,7$	
Водно-органические смеси (0,05 М фосфатный буфер как водный компонент):					
<u>ДФА</u> , %	15%	85	107 ± 2	$6,5 \pm 0,7$	$16,4 \pm 1,5$
	25%	75	89 ± 4	$6,9 \pm 0,8$	$12,9 \pm 0,9$
	35%	65	67 ± 2	$6,7 \pm 0,6$	$10,0 \pm 0,6$
<u>Изопропанол</u> , %	10%	90	115 ± 5	$7,2 \pm 0,6$	$16,0 \pm 0,6$
	20%	80	96 ± 3	$6,7 \pm 0,6$	$14,3 \pm 0,8$
	30%	70	81 ± 6	$6,5 \pm 0,9$	$12,5 \pm 0,8$
	40%	60	58 ± 3	$7,1 \pm 0,4$	$8,2 \pm 0,1$
Бездетергентные микроэмульсии:					
49% гексана, 45% изопропанола, 6% 0,02 М боратного буфера	6	46 ± 1	$12,2 \pm 1,2$	$3,8 \pm 0,3$	
Обращенные мицеллы ПАВ (0,04 М боратно-фосфатный буфер с рН 7,0 как водный компонент):					
<u>АОТ</u> , 0,05 М в октане, $w_o = 23$	2,1	63 ± 4	$8,4 \pm 2,0$	$7,5 \pm 1,1$	
<u>ЦТАБ</u> , 0,136 М в смеси октан-хлоро- форм-гексанол (6:4:1), $w_o = 4,9$	1,2	16 ± 1	$16,8 \pm 2,1$	$0,9 \pm 0,1$	
<u>Тритон X-100</u> 0,05 М в смеси октан-гексанол (6:1), $w_o = 17$	1,5	81 ± 7	$13,5 \pm 2,5$	$6,0 \pm 0,6$	
<u>АОТ</u> + <u>Тритон X-100</u> (по 0,025М) в октане с 5% гексанола, $w_o = 20$	1,8	59 ± 2	$3,6 \pm 0,5$	$16,4 \pm 1,7$	

мочевины подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен (данные представлены в таблице 6).

Обращенные мицеллы ПАВ. Уреаза проявляет достаточно высокую каталитическую активность при гидролизе мочевины в обращенных мицеллах ПАВ в октане (см. табл. 6). Как и в случае с ГБФДГ, смешанные обращенные мицеллы анионного и нейтрального ПАВ создают наиболее благоприятное окружение вокруг биокатализатора, что отражается на сродстве субстрата к ферменту (K_M). Эффективность уреазы ($k_{кат}/K_M$) в смешанных мицеллах АОТ и Тритона λ -100 практически совпадает со значением в водном растворе. Гексамер уреазы диссоциирует в обращенных мицеллах АОТ на каталитически активные димеры (194000). Это заключение сделано на основании сравнения размеров мицелл АОТ, при которых уреазы проявляет максимальную каталитическую активность, с размерами гексамера, тримера, димера и мономера фермента.

В бездетергентных микроэмульсиях и обращенных мицеллах АОТ в октане падение ферментативной активности происходит одинаковым образом. Фермент достаточно активен в течение 2-3 часов, после чего активность резко падает, что связано с инактивацией белка.

Данная работа показала, что при проведении ферментативных реакций в неводных средах необходимо учитывать много факторов: природу используемого фермента (мономерная или субъединичная структура, свойства белковой поверхности), полярность субстрата. Это усложняет общее решение проблемы. На примере уреазы и ПХ видно, что конформационная лабильность белковой глобулы, по-видимому, является одним из определяющих факторов стабильности ферментов в неводных средах. Если белок достаточно устойчив в водно-органических смесях, можно ожидать его довольно высокой активности в бездетергентных микроэмульсиях и обращенных мицеллах ПАВ в органических растворителях.

ВЫВОДЫ

1. Изучено влияние пяти органических растворителей (ДМФ, ДМСО, изопропанол, формамид и диоксан) на каталитическую активность пероксидазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и уреазы и определены кинетические параметры ферментативных реакций в водно-органических смесях. В случае пероксидазы и уреазы органические соразтворители неконкурентно ингибируют ферментативный процесс.

2. Доказано сильное влияние диэлектрической проницаемости среды на константы Михаэлиса по субстрату в реакции глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. K_M снижается с уменьшением диэлектрической проницаемости среды, но эффективность фермента, выраженная отношением $k_{кат}/K_M$, максимальна при одном и том же значении K_M независимо от природы органического соразтворителя.

3. Для эффективного проведения ферментативных реакций в водно-органических смесях необходимо использовать концентрации органических растворителей не выше 35-40% для пероксидазы, 20-25% для глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 60% для уреазы.

4. Впервые изучена каталитическая активность пероксидазы (окисление орто-фенилендиамина и люминола) в бездетергентных микроэмульсиях. Система "гексан-изопропанол-вода" предпочтительнее системы "гексан-трет. бутанол-вода" в реакции окисления орто-фенилендиамина.

5. Показана возможность успешного использования пероксидазы и гемина в бездетергентных микроэмульсиях в качестве катализаторов окисления люминола, обеспечивающих высокую интенсивность хемилюминесценции.

6. На примере глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной реакции в обращенных мицеллах ПАВ в октане продемонстрировано, что субстрат (или кофактор) способны принимать участие в мицеллообразовании. Показано, что глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа наиболее эффективна в смешанных мицеллах АОТ и Тритона X-45 с максимально возможным содержанием водной фазы.

7. Впервые проведена уреазная реакция в бездетергентных микроэмульсиях "гексан-изопропанол-вода" и обращенных мицеллах ПАВ разного состава в октане и определены кинетические параметры процесса. Показано, что максимальная эффективность уреазы достигается в смешанных мицеллах АОТ и Тритона X-100.

8. Даны практические рекомендации по использованию пероксидазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и уреазы в неводных средах.

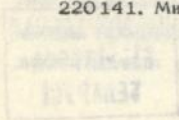
Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

1. Puchkaev A.V., Metelitz D.I. Catalytic activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in water-organic media //Abstracts to 8th Conference of Young Scientists on Organic and Bioorganic Chemistry (Latvia, Riga) - November 2-9, 1990. - P.282.
2. Puchkaev A.V., Metelitz D.I., Catalytic activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in water-organic media //Biochem. Biotechnol. Electronic Express. (BBEE) -1991. -V.1. N 4. -P.251-260
3. Пучкаев А.В., Метелица Д.И. Каталитическая активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в водно-органических средах // Прикл. биохим. микробиол. -1992. -Т.28. N 1. -С.27-32.
4. Пучкаев А.В., Метелица Д.И. Каталитическая активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в обращенных мицеллах поверхностно-активных веществ разного состава //Биохимия. -1992. -Т.57. N 3. -С.410-417.
5. Puchkaev A.V., Metelitz D.I. Catalytic activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in reversed micelles of various composition //Abstracts to 9th International Symposium on Surfactants in Solution (Bulgaria, Varna) - June 10-15, 1992. - P.163.
6. Пучкаев А.В., Метелица Д.И. Каталитическая активность пероксидазы в водно-органических средах //Изв. АН БССР, сер. хим. наук. -1992. -N 1. -С.78-83.
7. Puchkaev A.V., Metelitz D.I. Catalytic activity of horseradish peroxidase in detergentless microemulsions //Abstract Books of 6th European Congress on Biotechnology (Italy, Firenze) -June 13-17, 1993. -V.2. -P.304.
8. Пучкаев А.В., Метелица Д.И. Окисление люминола в бездетергентных микроэмульсиях (гексан-изопропанол-вода), катализированное пероксидазой или гемом //Биохимия. -1993. -Т.58. N 10. -С.1538-1547.



Подписано в печать 5.10.93. Формат 60x84/16. Зак.69. Тираж 100 экз.

Отпечатано на ротаприте Института геологии, геохимии и геофизики АН Беларуси.
220141. Минск, ул. Жоданская, 7.



AB 36.434

1903 1. 16