

УДК 577.150.3+577.150.4+577.156+541.182.644

**СТАБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ — КЛЮЧЕВОЙ ФАКТОР
ПРИ ВНЕДРЕНИИ БИОКАТАЛИЗА В ПРАКТИКУ***Карел Мартинек, И. В. Березин*

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	737
II. Стабильность и стабилизация ферментов; определения и общие замечания	741
III. Стабилизация ферментов против термоинактивации (против разворачивания белковой глобулы)	742
IV. Стабилизация ферментов против инактивации под действием экстремальных значений pH	756
V. Ферментативные реакции в органических растворителях с малым содержа- нием (или в отсутствие) воды	758
VI. Заключение	764

Рассмотрено современное состояние проблемы внедрения биокатализа в практику. Проанализированы физико-химические подходы, позволяющие подавлять денатурацию ферментов под действием повышенной температуры, экстремальных значений pH и органических растворителей. Сформулированы общие принципы стабилизации ферментов.

Библиография — 225 ссылок.

I. ВВЕДЕНИЕ

1. Внедрение биокатализа в практику

Ферменты как биокатализаторы отличаются от обычных химических катализаторов тем, что обладают исключительно высокой каталитической активностью в мягких условиях и уникальной субстратной специфичностью^{1, 2}. Это открывает широкие перспективы для применения их в качестве каталитических и регуляторных элементов в различных областях науки и техники. Реализовать эти возможности до последнего времени мешал ряд обстоятельств: труднодоступность (и, следовательно, относительно высокая стоимость) ферментов, высокая лабильность и сложность отделения их от продуктов реакции. Однако в последние годы положение дел коренным образом изменилось. Во-первых, развитие методов получения ферментов из микроорганизмов практически полностью позволило решить первую проблему³⁻⁵, и можно с уверенностью утверждать, что с дальнейшим совершенствованием микробиологической технологии стоимость ферментов будет снижаться. Во-вторых, на стыке ряда химических и биологических дисциплин сформировалось⁶ новое на-

учное направление — получение и исследование иммобилизованных ферментов⁵⁻⁹. В результате иммобилизации (например, ковалентного присоединения ферментов к водонерастворимым частицам, включения ферментов в гели или полые волокна, адсорбции ферментов на различных носителях) появилась прежде всего возможность отделить полученный гетерогенный катализатор от растворимых продуктов и использовать его повторно. В ряде случаев было достигнуто также существенное повышение стабильности ферментов. Благодаря этому произошло резкое расширение прикладного использования ферментов. Укажем на некоторые примеры.

1). Ферменты прочно вошли в арсенал методов аналитической химии⁹⁻¹¹ и медицины^{9, 11}.

2) Особенно ощутимые успехи достигнуты в тонком органическом синтезе при получении лекарственных препаратов и важных биохимических соединений. К настоящему времени некоторые ферментативные процессы такого рода уже осуществляются в лабораторном масштабе. В качестве примеров можно указать на разделение рацематов синтетических аминокислот^{12, 13}, синтез аминокислот¹³⁻¹⁵ и антибиотиков¹⁵⁻¹⁷, трансформацию стероидов^{13, 19}, синтез N-окисей лекарственных препаратов^{20, 21}, синтез пирролпорфириногена^{9, 22}, синтез гидроксинитрилов²³, получение фармацевтически чистых меченых аминокислот²⁴, синтез важных биохимических веществ, таких как АТФ²⁵, НАД²⁶ и другие²⁷, синтез гомополинуклеотидов^{28, 29}. Не вызывает сомнений, что применение ферментов в препаративном органическом синтезе будет интенсивно развиваться и в дальнейшем^{9, 30, 31}.

3) Внедрение ферментов дало мощный стимул развитию новых крупнотоннажных технологий, таких как получение глюкозы путем гидролиза крахмала³² и изомеризации глюкозы во фруктозу³³, получение L-ДОФА и L-метионина³⁴, снижение содержания лактозы в молоке^{35, 36}. Интенсивно ведутся исследования возможностей промышленного получения глюкозы из целлюлозы с помощью целюлазы³⁷.

4). Разработаны подходы для получения ферментативных свето-³⁸ и звукочувствительных³⁹ материалов, которые могут служить в качестве химических усилителей слабых сигналов (в частности, для создания новых фото- и звукографических процессов).

5). Намечаются пути решения с помощью ферментов энергетических задач будущего^{5, 7, 40}.

Этот перечень уже решенных или только поставленных проблем не следует считать полным, его можно продолжить (см., например, ^{5-9, 41}); однако мы сосредоточим свое внимание на обсуждении причины, которая до сих пор все еще принципиально ограничивает применение ферментов как катализаторов практически нужных химических реакций, — на инактивации ферментов в технологических условиях.

2. Причины инактивации ферментов

Потеря наблюдаемой каталитической активности всей системы в целом может быть обусловлена, например, вымыванием иммобилизованного фермента из (или с) носителя или же частичным разрушением (или деформацией) самого носителя как механическим, так и микробиологическим путями^{42, 43}. Эти и подобные им технологические аспекты⁴³ представляют лишь частный интерес, поскольку наблюдаемой инактивации такого рода легко воспрепятствовать, выбрав другой носитель или изменив методику иммобилизации фермента.

Более важными представляются следующие инактивационные процессы, в которых «гибнет» сам фермент (его активный центр).

А. Фермент может «отравляться» ингибиторами, такими как катионы тяжелых металлов: чтобы избежать этого, можно добавить металл-хелатирующий агент типа ЭДТА⁴⁴ либо в свободном, либо (что представляется более перспективным) в иммобилизованном виде⁴⁵.

Б. Каталитическая активность может падать в результате окисления функциональных групп белка. В этом случае в систему следует вводить протектирующие агенты. В принципе можно было бы использовать для этой цели антиоксиданты (ингибиторы свободно-радикальных реакций), которые уже зарекомендовали себя при решении других прикладных задач в биохимии и медицине (см., например, ⁴⁶). Для защиты SH-групп используют сульфгидрильные соединения⁴⁷. Окислительную деструкцию ферментов можно исключить, применив анаэробные условия (в принципе в системе можно поддерживать весьма низкий уровень концентрации кислорода, если химически поглощать его за счет вспомогательных автокаталитических окислительных процессов или даже с помощью ферментативных окислительных процессов, сопряженных с нужной реакцией).

В. «Поедания» белкового катализатора микроорганизмами (почти всегда присутствующими в системе в виде примеси) легко избежать путем иммобилизации, если включить фермент в такой носитель (например, микропористый), который защищает его за счет стерических препятствий^{5, 42, 43}.

Г. В результате ковалентной иммобилизации становятся невозможными также и различного рода полимолекулярные инактивационные процессы типа фермент-ферментного взаимодействия, такие как агрегация⁴⁸ или автолиз в случае протеолитических ферментов^{5, 7}.

Д. При работе в проточных реакторах фермент может инактивироваться в результате удаления из системы кофактора. В последнее время, однако, эту проблему удалось в принципе решить. Имеются три наиболее перспективных (с нашей точки зрения) подхода: а) используют мембранный реактор, и кофактор присоединяют к водорастворимому полимеру⁴⁹; б) проводят совместную ковалентную иммобилизацию фермента (ферментов) и кофактора⁴⁹; в) создают усложненные ферментативные системы, в которых протекает регенерация кофактора^{25, 49, 50}.

Е. Инактивация ферментов, обусловленная денатурирующим воздействием внешней среды. Поскольку для механизмов инактивации (А) — (Д) существуют разработанные в большей или меньшей степени методы их подавления, в настоящем обзоре рассмотрен лишь механизм (Е). При этом, разумеется, нет особого смысла останавливаться на вопросах борьбы с денатурацией ферментов под действием носителя⁵¹ — проще всего взять другой носитель. Мы будем иметь в виду прежде всего следующие денатурирующие факторы: повышенная температура, неблагоприятные значения рН и добавка органических растворителей.

3. Необходимость «подавления» денатурации ферментов

Воспрепятствовать денатурации ферментов — это необходимый шаг на пути широкого их внедрения в практику. Покажем это на следующих примерах.

1. Ферменты, если извлечь их из естественного окружения (*in vivo*), становятся, как правило, лабильными, и в ряде случаев их «время жизни» исчисляется минутами^{52–54}. Так, например, стабильность иммобилизованной аспартазы оказалась неудовлетворительной для использования ее в промышленности⁵⁵.

2. Многие процессы желательно проводить при повышенной температуре. Это связано, во-первых, с тем, что скорости большинства химических реакций, в том числе и ферментативных, с повышением температуры возрастают (в силу уравнения Аррениуса). Поэтому естественно, что при повышенных температурах заданная степень конверсии субстрата в химическом реакторе будет достигаться за более короткое время или же при меньших количествах иммобилизованного фермента, а в ряде промышленных процессов стоимость фермента — это важный экономический фактор, как, например, в случае глюкоамилазы³². Во-вторых, повышение температуры позволяет обеспечить бактерицидные условия⁴³, столь важные, например, для процессов пищевой промышленности^{35, 56, 57}. Отметим, однако, что при высоких температурах денатурация биокатализаторов интенсифицируется^{52–54}.

3. Положение равновесия многих практически важных процессов таково, что нужные продукты могут быть получены только при проведении реакции в водноорганической смеси с высоким содержанием органического компонента. С другой стороны, ферменты в этих условиях, как правило, теряют каталитическую активность или специфичность^{53, 58} (см. также ссылки в³⁹).

4. В некоторых случаях рН-оптимум проведения реакции и рН-область стабильности катализирующего ее фермента не совпадают. Характерный пример — синтез пенициллиновых антибиотиков под действием пенициллинамидазы: положение равновесия реакции синтеза сдвинуто в сторону продуктов в кислой среде, где фермент довольно нестабилен⁶⁰.

5. Очевидно, что при практическом использовании ферментных препаратов их непосредственное использование по времени удалено (иногда значительно) от приготовления. Это порождает проблему стабилизации ферментов против инактивации при длительном хранении⁶¹.

4. Пути решения проблемы нежелательной инактивации

Чтобы решить проблему нежелательной инактивации ферментов, был предложен ряд подходов. Во-первых, можно использовать в качестве катализатора целые (или лишь частично деградированные) клетки, не извлекая фермент из его естественного окружения^{4–9}. Так, например, из-за низкой стабильности свободной аспартазы для непрерывного получения *L*-аспарагиновой кислоты пришлось использовать иммобилизованные клетки *Escherichia coli*⁵⁵. Частично деградированные клетки сохраняют каталитические свойства даже в органических растворителях⁶². Во-вторых, фермент можно выделять из особо устойчивых, например термофильных, штаммов^{54, 63}.

Однако оба эти подхода имеют свои недостатки. Использование целых клеток создает проблему диффузии субстратов и продуктов через клеточные стенки; кроме того, выбор методов иммобилизации в этом случае, очевидно, ограничен. Использование ферментов из термофильных микроорганизмов ограничено тем, что поиск подходящих штаммов для нужной катализируемой реакции — это в каждом случае особая (индивидуальная) и далеко не простая задача.

Поэтому в настоящем обзоре будет рассмотрено третье возможное решение — стабилизация ферментной молекулы (глобулы) против денатурирующих воздействий искусственным путем.

Стабилизации ферментов не удалось достигнуть «с налета» путем их иммобилизации: устойчивость ферментов к инактивирующим воздействиям при иммобилизации в одних случаях увеличивается, в других —

уменьшается, в третьих — остается практически неизменной⁶. Поэтому некоторые успехи в получении ферментных препаратов с повышенной стабильностью принято считать^{7, 42} скорее исключением, чем правилом. Более того, в опубликованном в 1976 г. обширном труде, посвященном иммобилизованным ферментам⁹, эта проблема вообще не была по-настоящему освещена.

II. СТАБИЛЬНОСТЬ И СТАБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ: ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ОБЩИЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Под стабильностью фермента E будем понимать его способность сохранять собственную каталитическую активность в условиях, когда отсутствуют инактивационные механизмы (А)—(Д). Количественным критерием стабильности данного фермента в данных условиях будет служить эффективная константа скорости первого порядка, характеризующая мономолекулярный процесс инактивации:

$$k_{\text{инакт}} = (d[E]/dt)/[E],$$

где $[E]$ — относительная удельная каталитическая активность.

Мерой стабилизации будем считать уменьшение $k_{\text{инакт}}$, наблюдаемое в результате того или иного воздействия на фермент (модификации, иммобилизации и т. п.).

В некоторых системах наблюдается кажущаяся стабилизация иммобилизованного фермента по сравнению с его нативным предшественником, обусловленная, например, наличием диффузионных затруднений для протекания ферментативной реакции, которые возникают под влиянием носителя⁶⁴. Мы рассмотрим лишь те работы, где такого рода осложнения исключены; при этом будем пользоваться кинетическими критериями, сформулированными в⁶⁵ (см. также⁶⁶).

Задача стабилизации ферментов против денатурирующих воздействий имеет не только практические аспекты, обсужденные выше. Эта проблема важна и для изучения механизмов их денатурации. Более того, некоторые стабилизированные ферментные системы — это модели систем, функционирующих *in vivo*. Все эти аспекты будут рассмотрены в настоящем обзоре.

Ниже проанализированы методы (механизмы) стабилизации, которые, будучи в той или иной мере общими, во-первых, не слишком понижают исходный уровень каталитической активности извлеченных из естественного окружения ферментов (как правило, не более чем в 2—3 раза), и, во-вторых, обеспечивают продолжительное функционирование фермента в неблагоприятных условиях окружающей среды. При этом мы будем отдельно рассматривать получение водонерастворимых (истинно-иммобилизованных), гетерогенных катализаторов с повышенной стабильностью и, с другой стороны, стабилизированных водорастворимых ферментных препаратов. Потребность в растворимых ферментах в последние годы все возрастает^{5, 67}, прежде всего в медицине^{5, 9, 11, 68} и в химической технологии в процессах с участием водонерастворимых субстратов⁶⁹; здесь особенно перспективным представляется целлюлазное расщепление целлюлозы до глюкозы³⁷.

Однако мы ни в коей мере не будем стремиться к тому, чтобы полностью «собрать» все работы, в которых наблюдали эффект стабилизации фермента (все возрастающее число подобного рода работ, по-видимому, и не позволит это сделать в рамках одной статьи). Наше внимание будет сконцентрировано лишь на тех исследованиях, где дана обоснованная на опыте физико-химическая трактовка наблюдаемых эффектов; та-

ких работ относительно немного. Основная цель данного обзора — сформулировать (и проиллюстрировать наиболее яркими примерами) физико-химические принципы решения задачи стабилизации ферментов. При этом будем исходить из того, что ферменты инактивируются по одинаковым механизмам (см. выше) как в технологических условиях, так и при хранении. Отметим, что обычно стабильность ферментов в том и другом случаях рассматривают отдельно; это оправдано тем, что в тех или иных условиях удельный вес каждого из инактивационных механизмов может быть существенно другим. Так например, при повышенной температуре (в технологических процессах) реализуются большей частью механизмы денатурационного разворачивания белка или его окисления, в то время как при хранении (обычно при пониженной температуре) можно ожидать главным образом деструкцию ферментов под действием микроорганизмов и протеаз (особенно во влажном состоянии). Поэтому, чтобы попытки стабилизировать фермент носили обоснованный характер, в первую очередь следует исходить из причин инактивации; еще лучше (но не обязательно) знать механизм инактивации.

III. СТАБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ПРОТИВ ТЕРМОИНАКТИВАЦИИ (ПРОТИВ РАЗВОРАЧИВАНИЯ БЕЛКОВОЙ ГЛОБУЛЫ)

В результате модификации ферментов химическими реагентами (в том числе водорастворимыми синтетическими или биополимерами) или при присоединении их к водонерастворимому носителю часто происходит изменение (как уменьшение, так и увеличение) их термостабильности. Наиболее часто это объясняют (см., например, ^{5-7, 42, 70}) следующими причинами: 1) изменением конформации молекулы фермента по сравнению с ее нативной структурой, полагая, что термостабильность белковой глобулы зависит от ее конформационного состояния; 2) изменением микроокружения ферментной молекулы, полагая, что микроокружение белковой глобулы оказывает влияние на внутримолекулярные связи (факторы), поддерживающие ее нативную структуру.

Эти взгляды, как бы они ни были справедливы, нельзя положить в основу разработки общих методов стабилизации ферментов. Дело в том, что неизвестно, каким образом связана стабильность фермента с его конформацией и микроокружением; кроме того, если эта связь вообще существует*, то она должна быть, по всей вероятности, индивидуальной для каждого фермента.

Наметить закономерные пути повышения стабильности ферментов мешает также и то обстоятельство, что общие принципиальные механизмы их инактивации так и остаются невыясненными⁵², хотя интенсивные исследования в этой области продолжаются уже многие десятилетия. Весьма возможно, что единого общего механизма денатурации белков вообще не существует⁷⁷. Однако не вызывает сомнений тот факт, что инактивация ферментов под действием, например, нагревания или денатурирующих агентов сопровождается значительными конформационными изменениями белковых молекул, т. е. их разворачиванием^{52-54, 77}. Поэтому, представляется очевидным, что увеличения термостабильности ферментов можно достичь еще одним путем, а именно, если 3) сделать более жесткой (закрепить) нативную конформацию белковой глобулы.

* Так, в недавних работах с помощью прямых физических методов показано, что присоединение белков к носителям вовсе не приводит к существенным конформационным изменениям их макромолекул⁷¹⁻⁷⁶.

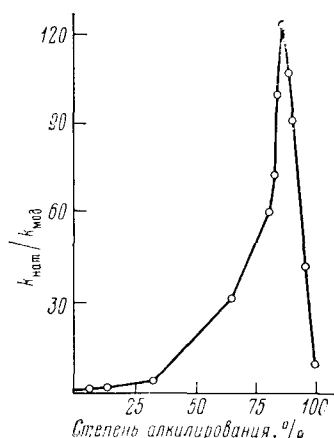
В самом деле, если признать, что необходимой стадией инактивации фермента является разворачивание его молекулы, то чем жестче, прочнее закреплена белковая глобула фермента, тем труднее ее развернуть и, следовательно, инактивировать ее активный центр. Следует отметить, что в природе широко применяется этот подход (связанный с вариацией жесткости белков) при адаптации организмов к условиям окружающей среды⁵⁴.

Закрепить ферментную глобулу, чтобы воспрепятствовать ее разворачиванию, можно несколькими путями: наложением на нее скобок (сшивок) (1); ковалентным (2) или нековалентным (3) присоединением к носителю и механическим включением (4) в тесные поры носителя. Рассмотрим каждый из этих подходов более подробно.

1. Внутримолекулярные сшивки и их влияние на термостабильность ферментов

В литературе имеются обширные сведения о методах химической модификации ферментов и о свойствах полученных препаратов. Однако вряд ли можно хоть в одном случае предвидеть, как изменится термостабильность фермента в результате его химической модификации. Это связано с исключительной сложностью молекулярной структуры биока-

Рис. 1. Зависимость константы скорости псевдопервого порядка ($k_{\text{мод}}$) для мономолекулярной термоинактивации α -химотрипсина от степени (по данным титрования) алкилирования NH_2 -групп акролеином (с восстановлением шиффовых оснований боргидридом натрия); за единицу условно принято значение $k_{\text{нат}}$, полученное для нативного (немодифицированного) фермента. Условия: 50°C , pH 8 ($5 \cdot 10^{-3}$ М $\text{трис} \cdot \text{HCl} + 0,1$ М KCl)¹⁰⁵



тализаторов (которая вдобавок пока неизвестна для многих ферментов). В качестве примера весьма сложной зависимости термостабильности фермента от степени модификации его поверхностного слоя укажем на поведение α -химотрипсина, алкилированного по NH_2 -группам¹⁰⁵. Модификацию проводили, обрабатывая фермент акролеином с последующим восстановлением шиффовых оснований боргидридом натрия (по методикам, указанным в¹⁰⁶); в результате фермент практически не терял своей каталитической активности. Из рис. 1 видно, что алкилирование тех NH_2 -групп, которые подвергаются модификации в первую очередь, почти не влияет также и на термостабильность α -химотрипсина. Решающую роль играет модификация наименее реакционноспособных (по-видимому, труднодоступных, углубленных в глобулу) NH_2 -групп: термостабильность фермента на завершающем этапе его модификации резко возрастает (на два порядка); при дальнейшем алкилировании термостабильность ферментного препарата уменьшается (в результате полной

модификации всех NH_2 -групп, титруемых тринитробензолсульфокислотой). Как видно из рис. 1, максимальное проявление наблюдаемого эффекта (резкое повышение термостабильности с последующим ее резким падением) наступает при модификации всего лишь двух-трех NH_2 -групп из общего их числа, равного 17.

Другое дело, если для модификации фермента использовать бифункциональные реагенты, способные ковалентно сшивать белковую глобулу: здесь следует ожидать увеличения ее конформационной стабильности⁷⁸. Поэтому указанный подход открывает широкие перспективы для получения водорастворимых стабилизированных ферментных препаратов, которые могут найти применение на практике (см. гл. I).

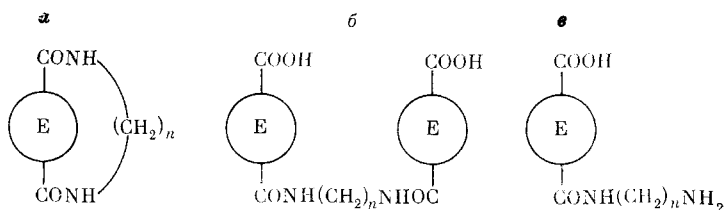
Внутримолекулярные сшивки в природе. Природа широко использует внутримолекулярные сшивки для увеличения жесткости (и, как следствие, для стабилизации) белковых молекул⁵⁴. Эти сшивки могут быть как ковалентными — дисульфидные связи⁷⁹⁻⁸¹, так и более слабыми — «солевые мостики»⁸² или, например, включенные в молекулу белка ионы Ca^{2+} ⁸³ и т. п.

Искусственное наложение сшивок (скобок) на белковые молекулы можно осуществить путем обработки их бифункциональными реагентами^{11, 84, 85}. В качестве таких реагентов обычно используют диальдегиды, диимидоэфиры, диизоцианаты, *бис*-дiazониевые соли и т. д. Анализ литературных данных^{67, 78, 86-94} показывает, что в большинстве случаев эффекты стабилизации весьма невелики, а иногда, по видимому, и вовсе обусловлены не сшивкой, а простой (одноточечной) химической модификацией фермента (см.⁶⁷), как это было недавно показано для глутарового диальдегида⁹². В других случаях эффекты стабилизации оказались более значительными^{78, 91}, причем повышение стабильности коррелирует с увеличением жесткости белковой молекулы⁷⁸.

По всей вероятности, успех или неудача при попытке повысить стабильность фермента обработкой его бифункциональным реагентом в основном зависит от того, насколько длина бифункционального реагента соответствует расстоянию между возможными центрами пришивки на белковой глобуле. Очевидно, что для каждого данного белка существует оптимальный размер внутримолекулярно сшивающего агента. Поэтому наибольший интерес представляют исследования, направленные на подбор именно оптимального размера бифункционального реагента.

Варьирование длины внутримолекулярной сшивки. Подобного рода исследования проводят редко, вероятно, потому, что непосредственно применявшиеся для наложения скобок бифункциональные реагенты являются коммерчески недоступными, а их химический синтез очень трудоемок. Поэтому представляется весьма привлекательным использование бифункциональных реагентов, которые непосредственно не применимы для внутримолекулярной сшивки ферментов, но становятся пригодными, если фермент соответствующим образом предварительно модифицировать. Для этой цели оказался полезным⁹⁵ ряд алифатических диаминов — они коммерчески доступны (с длиной углеводородной цепи от 0 до 12 метиленовых групп) и относительно дешевы; оба эти фактора особенно важны для возможного практического применения. Диамины можно использовать для сшивки карбоксильных групп ферментов (которых обычно в белках достаточно много), если их предварительно активировать карбодиимидом. В результате между аминокислотной группой модификатора (диамина) и карбоксильной группой белка образуется прочная амидная связь⁹⁶ (схема 1).

Схема 1



В условиях, когда отсутствует межмолекулярная сшивка белковых молекул (приводящая к образованию олигомеров фермента, см. схему 1, б), найдено⁹⁵, что существенно возрастает термостабильность внутримолекулярно сшитого по этому методу α -химотрипсина (по сравнению с нативным препаратом константа скорости термоинактивации уменьшилась более чем в 40 раз). Наблюдаемый эффект стабилизации не может быть объяснен простой (одноточечной) химической модификацией фермента (схема 1, в), поскольку модификация химотрипсина моноамином (если фермент предварительно активировать карбодимидом), а имен-

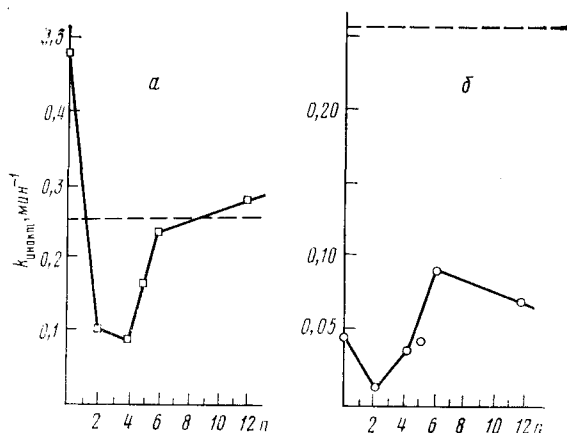


Рис. 2. Зависимости константы скорости первого порядка ($k_{\text{инакт}}$) для мономолекулярной термоинактивации α -химотрипсина (а) и сукцинированного α -химотрипсина (б), внутримолекулярно сшитых диаминами, от числа метиленовых групп в молекуле модификатора $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ ⁹⁵. Пунктиром показан уровень термостабильности нативного и сукцинированного ферментов. Условия: pH 7 (0,02 М фосфат), 50°С

но 1-аминопропанол-3, даже уменьшает его термостабильность. Эффект стабилизации зависит от числа метиленовых групп (n) в молекуле модификатора $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_n-\text{NH}_2$. Из рис. 2 а видно, что зависимость значения константы скорости реакции первого порядка (наблюдаемых для термоинактивации химотрипсина, «обшитых» различными диаминами) имеет минимум при $n=4$, хотя при $n=2, 5$ и 6 также наблюдается стабилизация фермента.

Тот факт, что обработка тетраметилендиаминном приводит к наибольшей стабилизации химотрипсина, по-видимому, обусловлен тем, что длина именно этого сшивающего агента наилучшим образом соответствует расстояниям между карбоксильными группами белковой молекулы; это

приводит к возникновению большего, чем в случае других диаминов, количества внутримолекулярных сшивок.

Прививка ферменту способности взаимодействовать с бифункциональными (полифункциональными) реагентами. Можно полагать, что чем больше скобок наложить на белковую молекулу, тем более стабильной она будет по отношению к разворачиванию и, следовательно, инаktivации. В свою очередь, возможно количество скобок определяется числом и взаимным расположением на поверхности белка функциональных групп, взаимодействующих со сшивающим агентом. Ясно, что их количество (а, следовательно, и количество возможных скобок) можно увеличить в результате соответствующей предмодификации белка.

Для этой цели Райнер с сотр.⁹⁷ предложили вводить в ферментную молекулу SH-группы (с помощью N-ацетилгомоцистеинтиолактона или других соединений)⁹⁸⁻¹⁰⁰ с последующим использованием в качестве бифункциональных реагентов бис-иодацетамидов различных алифатических диаминов. В случае описанной выше системы (рис. 2 а) оказалось полезным предварительно модифицировать фермент янтарным ангидридом, чтобы увеличить содержание в его поверхностном слое карбоксильных групп¹⁰¹. Затем сукцинилизированный химотрипсин обрабатывали (по той же методике, что и нативный фермент) диаминами различной длины. На рис. 2 б представлена полученная при этом зависимость⁹⁵. Видно, что, во-первых, максимальный эффект стабилизации фермента возрос; во-вторых, максимальное стабилизирующее влияние оказывает не тетраметилендиамин (ср. рис. 2 а), а более короткий бифункциональный реагент — этилендиамин. Последнее свидетельствует о более частой «заселенности» поверхности глобулы сукцинилхимотрипсина (по сравнению с нативным химотрипсином) карбоксильными группами.

Применение внутримолекулярных сшивок в фундаментальных исследованиях в биохимии. Исследования, направленные на подбор оптимального размера сшивающего агента, важны не только с практической точки зрения (для получения стабилизированных ферментных препаратов), но могут дать также и новую информацию о третичной структуре (конформации) белков в растворе⁸⁴ (например, для оценки расстояния между функциональными группами в поверхностном слое белковой глобулы¹⁰²); о топографии активного центра, см. ссылки к⁸⁵; о симметрии расположения субъединиц в олигомерных белках^{85, 102}; о кооперативных и аллостерических эффектах¹⁰⁴ и др.

2. Многоточечное ковалентное присоединение фермента к комплементарной поверхности носителя

Методы ковалентного присоединения ферментных молекул к различным носителям достаточно полно освещены в многочисленных обзорах, см., например,^{5-9, 11}. Такой способ иммобилизации в принципе может способствовать увеличению конформационной стабильности белковой молекулы и, следовательно, препятствовать ее разворачиванию и инаktivации. Так, при исследовании конформационной подвижности иммобилизованных белков (с использованием различных физических методов) было найдено, что в результате присоединения белка к носителю молекулярная структура первого становится более жесткой («замораживается»)^{71, 72, 74}. К этому же выводу можно прийти на основании многих косвенных данных (полученных как физическими методами, так и при измерении ферментативной активности)^{72, 74, 107-109}: после пришив-

ки к носителю конформационные переходы в таких белках сильно затруднены. Наряду с этим Гейбел в своей пионерской работе¹¹⁰ показал, что чем большим количеством связей трипсин присоединен к Сефадексу, тем более он стабилен к инактивации мочевиной (под действием которой происходит, как известно¹¹¹, разворачивание белка).

Таким образом, на основании указанных фактов можно полагать, что общий принцип стабилизации ферментов состоит в многоточечном присоединении молекулы катализатора к носителю. Такая пришивка должна сделать конформацию молекулы катализатора более жесткой (впрочем, быть может, не изменив ее, при этом) и, следовательно, более устойчивой к разворачиванию и к инактивации. Однако реализовать этот принцип методически весьма трудно по стерическим причинам: и поверхность носителя, и поверхность белка имеют свои индивидуальные рельефы, вообще говоря, не подходящие друг к другу. Кроме того, очевидно, что даже в случае многоточечного взаимодействия, когда фермент присоединен к носителю лишь небольшим участком поверхности, трудно ожидать существенного увеличения жесткости всей его молекулы. Можно полагать, что именно поэтому многие попытки стабилизировать ферменты не увенчались успехом^{71, 112, 113}. Проблема сводится фактически к тому, чтобы создать поверхность носителя, строго комплементарную поверхности ферментной молекулы. Лишь тогда можно реализовать благоприятное для стабилизации многоточечное взаимодействие белка с носителем.

Создание полимерного носителя, комплементарного молекуле иммобилизованного фермента. Суть подхода, позволяющего решить эту проблему^{114–116}, состоит в следующем. Фермент модифицируют аналогом мономера, а затем полученный препарат сополимеризуют с самим мономером (и в некоторых случаях также и со сшивкой). В итоге получается фермент, химически вшитый в пространственную сетку полимерного геля, причем точками присоединения фермента к носителю являются центры предмодификации ферментной молекулы. Очевидно, что в силу самого принципа предлагаемого метода, микроповерхность геля вокруг вшитой в него белковой молекулы будет комплементарна поверхности белка.

Методику получения ферментов, иммобилизованных сополимеризацией, разработали Яворек и сотр.¹¹⁷, которые стремились предотвратить вымывание иммобилизованных ферментов из гелевых носителей. Независимо авторами данного обзора^{114–116} этот метод был развит с целью стабилизации ферментов. В качестве аналогов мономера весьма удобно использовать ацилирующие и алкилирующие агенты, содержащие способную к сополимеризации двойную связь, например акрилоилхлорид (ацилирующий NH_2 -и OH -группы белка) или акролеин¹¹⁴ (взаимодействующий с NH_2 -группами; если восстановить образовавшиеся шиффовы основания боргидридом натрия, то белок окажется алкилированным); разработан также метод винилирования карбоксильных групп белка¹¹⁸. В качестве сомономеров можно использовать часто применяемые для получения гелей акриламид, метакрилат натрия, этиленгликольметакрилат, а в качестве сшивки NN' -метилен-бис-акриламид. Все эти реагенты коммерчески доступны и дешевы.

Величина эффекта стабилизации. В качестве яркого примера на рис. 3 представлены в координатах Аррениуса данные по скорости термоинактивации α -химотрипсина, вшитого в полиметакрилатный и полиакриламидные гели (прямые *а*, *б*)¹¹⁴. Устойчивость к нагреванию иммобилизованных препаратов фермента настолько выше по сравнению с нативным ферментом (прямая *в*), что сопоставить их не-

посредственно, т. е. при одной и той же температуре, экспериментально невозможно. Поэтому приходится сравнивать значения констант скоростей термоинактивации, определенные экстраполяцией, например, при 60°С (вертикальная пунктирная линия на рис. 3). При 60°С акрилоил-химотрипсин, вшитый в полиметакрилатный (прямая *a*) и полиакриламидный (прямая *б*) гели, соответственно в 1000 и 200 раз стабильнее нативного фермента (прямая *в*). При сравнении со свободным акрилоилхимотрипсином (прямая *г*) наблюдается еще более разительное отличие.

Из рис. 3 видно, что эффективные значения энергий активации процесса термоинактивации для акрилоилхимотрипсина, вшитого как в по-

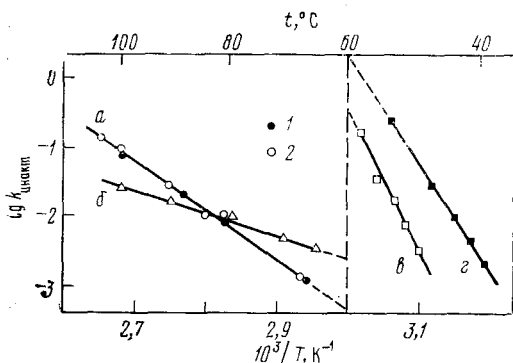


Рис. 3. Температурная зависимость константы скорости ($k_{\text{инакт}}$) псевдопервого порядка (мин^{-1}) для мономолекулярного процесса термоинактивации акрилоилхимотрипсина, вшитого в полиметакрилатный (*a*) и полиакриламидный (*б*) гели (1 — водонерастворимый, 2 — водорастворимый фермент); нативного (*в*) и модифицированного акрилоилхлоридом (*г*) α -химотрипсина. Условия: pH 8 (0,005 M трис·HCl + 3 M KCl) ¹¹⁴

лиметакрилатный, так и полиакриламидный гели, намного ниже (35 и 15 ккал/моль соответственно), чем для нативного фермента (110 ккал/моль). Из этого следует, что с повышением температуры эффект стабилизации иммобилизованного химотрипсина по сравнению с нативным будет возрастать. Так, из экстраполяции прямой *в* рис. 3 следует, что, при 102°С вшитый в гели фермент стабильнее нативного более чем в 10^3 раз.

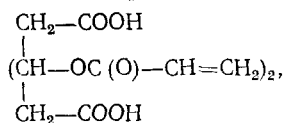
Зависимость эффекта стабилизации от числа связей между иммобилизованным ферментом и носителем. Следует отметить, что для систем, рассмотренных выше (рис. 3), эффект стабилизации не зависит ни от исходной плотности гелевого носителя (т. е. от концентрации полимера или, вернее, от концентрации мономера) в полимеризационной смеси в интервале от 10—15 до 50 масс.%, ни от степени его набухания (зависящей от количества сшивающего агента, а именно N,N'-метилена-бис-акриламида). Более того, если сополимеризацию акриловых производных фермента с сомономерами вести вообще в отсутствие сшивающего агента, то полученный гелеобразный полимер можно полностью растворить в воде и, что наиболее важно, полученный ферментный препарат обладает такой же высокой термостабильностью, что и фермент, иммобилизованный в нерастворимом геле (рис. 3, *a*) ¹¹⁴. Это явление обусловлено, по-видимому, тем, что полимерная структура геля вблизи ферментной молекулы, будучи комплементарной ее поверхности, задана в основном числом сшивок с белком.

В свою очередь, решающее влияние на термостабильность сополимеризованного фермента оказывает степень его ковалентного присоединения к носителю, а именно: по мере того, как увеличивается число связей между иммобилизованным ферментом и носителем, возрастает и термостабильность каталитической активности в системе. Так, из рис. 4 видно, что эффективная константа термоинактивации α -химотрипсина

(при 60° С) падает более чем в 1000 раз, если увеличивать степень пришивки фермента к полиметакрилатному носителю (на опыте определяли методом титрования число оставшихся свободными NH_2 -групп после акрилоилирования)¹¹⁴.

Механизм стабилизации. Полученный эффект стабилизации фермента нельзя объяснить возможным изменением его термостабильности в результате химической модификации, поскольку свободный акрилоилхимоотрипсин даже менее термостабилен, чем нативный фермент (см. рис. 3). Стабилизацию нельзя также объяснить влиянием на фермент микросреды геля, поскольку термостабильность химоотрипсина, физически включенного в полиметакрилатный гель такой же концентрации, практически та же, что и у свободного фермента^{119, 120} (см. рис. 5). Природа геля также не является решающим фактором для стабилизации фермента — аналогичные эффекты были получены как для полиэлектролитного (полиметакрилатного), так и электростатически нейтрального (полиакриламидного) гелей (рис. 3). Эффект стабилизации имеет место, если используются различные методы предмодификации фермента: алкилирование NH_2 -групп акролеином или ацилирование белка акрилоилхлоридом (рис. 3)¹¹⁴ или же винилирование карбоксильных групп¹¹⁸. И, наконец, стабилизация достигнута для различных ферментов: α -химоотрипсина, трипсина¹¹⁴ и пенициллинамидазы¹²¹. Следовательно, определяющим является не способ предмодификации или природа геля, а сам факт, что ферментная молекула вшита в пространственную сетку геля. Очевидно, механизм стабилизации заключается в том, что в закрепленном состоянии белка затруднено разворачивание глобулы при нагревании. При этом следует подчеркнуть, что нативную (каталитически активную) конформацию активного центра можно сохранить лишь в том случае, если присоединить фермент к носителю многоточечно (см. рис. 4).

Дальнейшие перспективы. Нет сомнений в том, что термостабильность сополимеризованного фермента должна зависеть (при заданном числе сшивок белка с носителем) от жесткости (гибкости) полимерных цепей, ковалентно связанных с белковой глобулой и поддерживающих ее нативную структуру: для более жестких (менее гибких) полимеров (имеется в виду молекулярный уровень) следует ожидать больших эффектов стабилизации¹¹⁵. Данный принцип необходимо в будущем проверить экспериментально. Для этой цели могут оказаться полезными, например, модификаторы белка и сомомеры, содержащиеся в молекуле по крайней мере два центра полимеризации и, следовательно, обеспечивающие образование разветвленной (сплошь сшитой) полимерной структуры геля. Чтобы обеспечить достаточную растворимость, эти соединения должны быть электролитами, как, например, соединение



которое можно синтезировать, ацилируя винную кислоту хлорангидридом акриловой кислоты. Кроме того, полиэлектролитный характер полученного полимера мог бы обеспечить дополнительное увеличение жесткости его цепей, см. ¹²².

Гели как носители имеют ряд недостатков¹²³, в частности, низкую механическую прочность и слеживаемость гелевых гранул. Однако этих недостатков можно избежать, если вести полимеризацию в порах достаточно прочных носителей, например неорганических, которые хорошо

зарекомендовали себя^{32, 124, 125}. Ковалентное присоединение фермента к эластичным носителям (в том числе гелеобразным) открывает возможность регулировать каталитическую активность механическим путем¹²⁶. В случае полиэлектролитных носителей каталитическую активность иммобилизованного фермента можно регулировать также, изменяя ионную силу раствора¹²⁷. Эти аспекты регуляции могут оказаться полезными при

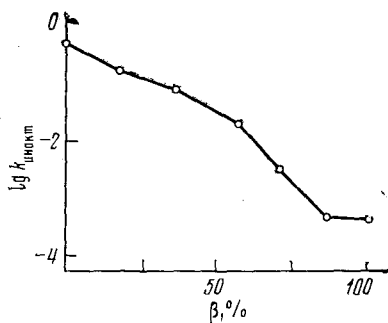


Рис. 4

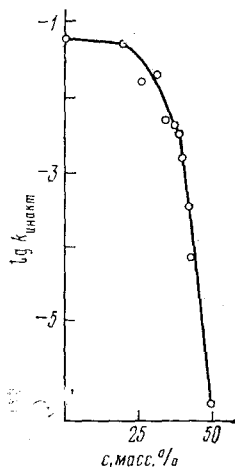


Рис. 5

Рис. 4. Зависимость константы скорости ($k_{\text{инакт}}$) псевдопервого порядка, характеризующей мономолекулярную термоинактивацию α -химотрипсина, вшитого в полиметакрилатный гель, от β (степени ковалентного связывания фермента с носителем).
Условия: pH 8 (0,005 М трис·НСl+3 М KCl), 60° С¹¹⁴

Рис. 5. Зависимость от c (концентрации полиметакрилата в геле) константы скорости ($k_{\text{инакт}}$) псевдопервого порядка (сек^{-1}), характеризующей мономолекулярную термоинактивацию α -химотрипсина, механически включенного в полиметакрилатный гель. Условия: pH 8, 60° С¹¹⁹

использовании ферментов в органическом синтезе (в химической технологии).

Использование ковалентно-иммобилизованных ферментов в фундаментальных исследованиях весьма полно освещено в⁹.

3. Многоточечное нековалентное взаимодействие фермента с носителем

Многоточечное взаимодействие фермента с носителем в принципе может обеспечить стабилизацию биокатализатора даже при физических методах иммобилизации. Физические методы иммобилизации (например, механическое включение в гели¹²³, микрокапсулирование¹²⁸, адсорбция на носителях^{129, 130} и др.) разработаны довольно подробно, см.^{5, 9, 11}. Однако лишь недавно обсуждены термодинамические причины (механизм) термостабилизации ферментов в таких системах и даны рекомендации для получения стабилизированных ферментных препаратов^{119, 120}. В качестве примера рассмотрим более подробно термостабильность α -химотрипсина, механически включенного в полиметакрилатный гель. С этой полиэлектролитной матрицей фермент в принципе

может образовывать слабые электростатические или водородные связи.

Величина эффекта стабилизации. На рис. 5 представлена зависимость логарифма эффективной константы скорости термоинактивации α -химотрипсина от концентрации полиметакрилатного геля (вплоть до предела растворимости мономера в воде). Видно, что при изменении концентрации геля от 0 до 30 масс. % скорость термоинактивации (при 60° С) фермента почти постоянна, но при дальнейшем повышении концентрации геля очень резко падает: в 50%-ном геле величина эффекта стабилизации достигает 10^5 . Более того, из экстраполяции линейной зависимости $\lg k_{\text{и п а к т}}$ от $1/T$ найдено ¹¹⁹, что время жизни фермента, иммобилизованного в полиметакрилатном (45 масс. %) геле, должно составлять при комнатной температуре сотни миллионов лет.

Механизм стабилизации обусловлен взаимодействием ферментных молекул с полимерной матрицей. В принципе белковые молекулы могут образовывать с карбоксильными группами носителя, т. е. полиметакриловой кислоты, электростатические и водородные связи. Однако эти связи являются относительно слабыми; вероятно, поэтому они практически не реализуются в растворе полимера или в разбавленных гелях, где образование подобного комплекса предполагает большие потери энтропии при «погашении» поступательного, а также вращательного движений молекул фермента.

Иначе должно обстоять дело в концентрированных гелях, где можно ожидать, что поступательное (возможно вращательное) движение белковых молекул существенно заторможено (независимо от образования комплекса) в силу стерических препятствий, вносимых частой пространственной сеткой полимера. Следовательно, в концентрированном геле образование комплекса белок—матрица должно быть термодинамически гораздо более выгодным, поскольку отсутствуют (или существенно уменьшены) затраты свободной энергии, обусловленные потерей поступательной и вращательной энтропии ферментной глобулы при ее сорбции на полимерной матрице. Не исключено, что в концентрированном геле несколько ограничена также и подвижность самих полимерных цепей и, следовательно, по сравнению с разбавленными гелями (или раствором полимера) энтропийные затраты свободной энергии, необходимые для локального «замораживания» матрицы при образовании ее комплекса с ферментом, также существенно уменьшены.

И, наконец, в условиях концентрированного геля следует ожидать, что взаимодействие фермента с матрицей по чисто стерическим причинам должно быть многоточечным, поскольку полимерные цепи будут со всех сторон подходить к ферментной глобуле. Такое многоточечное взаимодействие может привести (как уже было показано выше на примере ковалентного взаимодействия фермент—носитель) к резкому повышению термостабильности иммобилизованного фермента.

Все эти положения были доказаны ¹¹⁹ в результате исследования термостабильности и поступательной и вращательной подвижностей ферментных молекул в зависимости от концентрации геля.

Предложенный механизм ¹²⁰ имеет место и в других ранее изученных системах. При этом специфическое взаимодействие белок—носитель может быть и другим, чем в рассмотренном выше случае, где возникают электростатические и водородные связи. Рассмотрим данные ^{131, 132} по термостабильности ацетилхолинэстеразы, глюкозооксидазы и пероксидазы, механически включенных в гидрофобный кремнийорганический гель силсатик. В то время как термостабильность первого фермента при включении в такой гель резко возрастала, термостабильность остальных при иммобилизации оставалась практически неизменной. В прин-

ципе все три фермента могли бы стабилизироваться против разворачивания, а, следовательно, и термоинактивации, образовав с носителем многочисленные гидрофобные контакты. Однако взаимодействие фермент—матрица может быть термодинамически выгодным, как следует из рассмотренного механизма, лишь при условии, что молекулярная подвижность механически включенных в гель белковых молекул заторможена уже в исходном состоянии. В геле сиаластик данной концентрации торможение поступательной диффузии (а, следовательно, и стабилизация) достигается, видимо, лишь для очень больших молекул ацетилхолинэстеразы, но не для относительно малых молекул глюкозооксидазы и пероксидазы.

Дальнейшие перспективы. Вряд ли можно отдать предпочтение какому-нибудь определенному методу физической иммобилизации, не зная, для чего (с какой целью) будет использоваться полученный ферментный препарат. Если, однако, стремиться лишь повысить термостабильность фермента в результате иммобилизации, то наиболее привлекательным нам представляется именно механическое включение фермента в гель, способный специфически взаимодействовать с белком. Достигнутые здесь успехи (см. выше) можно еще увеличить, если попытаться оптимизировать структуру геля, используя более чем один мономер (не считая сшивающего агента), и тем самым вводя в носитель различные функциональные группы^{123, 133}.

С другой стороны, следует помнить, что эффект стабилизации в таких системах коренным образом зависит от концентрации (плотности) геля (см. рис. 5), а именно, стабилизирующее влияние оказывает (если оказывает) лишь концентрированный гель. Следовательно, в результате набухания гелевых частичек (гранул) в воде эффект стабилизации обратимо¹¹⁹ исчезает. Казалось бы, это ограничивает применимость таких систем для получения стабилизированных ферментных препаратов. Однако набуханию геля в воде можно воспрепятствовать (и, следовательно, сохранить эффект термостабилизации), если использовать гели, в достаточной мере сшитые (проводя сшивку либо непосредственно в ходе полимеризации, с использованием сомономеров типа N,N' -метилтен-бис-акриламида), либо дополнительно обрабатывая гелевые частички (гранулы размером в десятки микрон) бифункциональными сшивающими реагентами¹³⁴.

Термостабилизированные ферментные препараты на основе гелей найдут применение также и для катализа реакций в органических растворителях. В этом случае, однако, органический растворитель не должен смешиваться с водой, и тогда (при подходящем выборе полимера) гель практически не будет набухать; следовательно, эффект термостабилизации (типа представленного на рис. 5) должен сохраниться; более подробно о ферментативных реакциях в системах вода — органический растворитель см. ниже.

Биологические аспекты (модель биологических мембран). Предложенный в¹¹⁹ механизм стабилизации ферментов, механически включенных в концентрированные полимерные матрицы (т. е. принудительная остановка поступательного движения ферментной молекулы с последующим многоточечным взаимодействием белка с относительно малоподвижной матрицей), возможно, функционирует *in vivo* в мембранных ферментативных системах^{135, 136}, где, во-первых, наблюдается весьма низкая подвижность (заторможены поступательное и вращательное движения) белковых молекул в мембране¹³⁷, и, во-вторых, ферментные молекулы могут взаимодействовать с составляющими мембранную фазу фосфолипидами и структурными белками, образуя множество от-

носителем слабых связей—гидрофобных, электростатических, водородных и т. д.¹³⁸. Более того, такое формальное сходство позволяет понять некоторые аспекты функционирования биологических мембран. Так, известно, что при адаптации организмов к изменениям температуры окружающей среды наблюдается изменение термостабильности мембранных ферментов⁵⁴. Молекулярный механизм такой регуляции заключается, возможно, в изменении доли ненасыщенных липидов в мембранах⁵⁴, что должно оказывать влияние на вязкость мембранной фазы и тем самым на молекулярную подвижность включенных в нее ферментных молекул. В свою очередь, молекулярная подвижность и термостабильность ферментов, механически включенных в матрицу, взаимосвязаны; это было показано¹¹⁹ на модельной системе « α -химотрипсин в полиметакрилатном геле» (см. выше).

4. Механическое включение ферментов в «тесные» поры носителя

Воспрепятствовать разворачиванию белковой глобулы при денатурации можно также, если поместить нативную молекулу фермента в некоторую ячейку, не взаимодействующую с ней ни химически, ни сорбционно, но столь «тесную», чтобы развернутая конформация не могла образоваться по стерическим причинам. В этом случае нативная конформация белковой глобулы могла бы поддерживаться чисто механическим путем. Этот механизм в виде гипотезы в литературе предлагали неоднократно (часто в весьма неявном виде)^{139–142}, но экспериментальные доказательства были представлены лишь недавно^{134, 143, 144} при исследовании свойств α -химотрипсина и трипсина в полиакриламидном геле или в (на) полисахаридных носителях.

Полиакриламидный гель—весьма подходящий носитель для подобного рода исследований: во-первых, этот гель химически инертен¹⁴⁵; во-вторых, легко варьировать размер его пор изменением концентрации мономера¹⁴⁶ и, в-третьих, при достаточно высоких концентрациях геля размер его пор соизмерим с размерами ферментных глобул^{147, 148}.

Для механического включения фермента в гель были использованы два метода: полимеризацию акриламида нужной концентрации проводили непосредственно в растворе фермента (как описано в^{114, 119}), или частички геля (полученного в отсутствие фермента и тщательно отмытого от низкомолекулярных примесей) пропитывали раствором фермента и затем лиофилизировали до нужной концентрации полиакриламида^{143, 144}. Фермент в том и другом случаях обладает одинаковой термостабильностью, а именно (рис. 6): если при не слишком высокой концентрации геля (менее 45 масс.%) нет заметной стабилизации ферментов против необратимой мономолекулярной термоинактивации, то в более плотном носителе (более 50 масс.% полиакриламида) термостабильность фермента резко возрастает.

Величина эффекта стабилизации. Термостабильность фермента, механически включенного в очень концентрированный полиакриламидный гель (лиофилизированный порошок), настолько выше термостабильности фермента в растворе, что эти величины нельзя измерить при одной и той же температуре. Для этого пришлось изучить температурную зависимость скорости мономолекулярной термоинактивации: из линейной экстраполяции данных, приведенных на рис. 7, к середине температурного интервала (120° С, вертикальная пунктирная линия) следует, что эффект стабилизации в полностью высушенном геле достигает

значения в 10^{13} раз. Для менее концентрированных гелей эффект стабилизации, разумеется, меньше.

Механизм стабилизации не связан с влиянием незаполимеризованного акриламида ¹⁴³, поскольку его полностью отмывали из измельченного геля ^{143, 144}. Стабилизацию также нельзя объяснить химической пришивкой фермента к гелю, поскольку как химотрипсин, так и трипсин удалось полностью вымыть из набухшего геля ^{143, 144}. Фермент практически не взаимодействует сорбционно с матрицей, поскольку вплоть до концентрации геля 50 масс. % (где уже наблюдается заметная

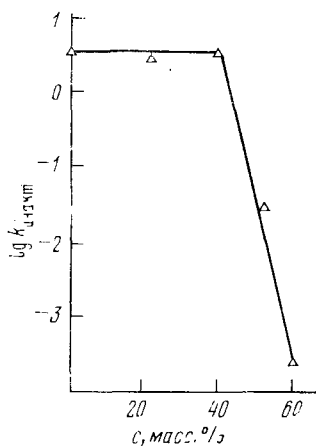


Рис. 6

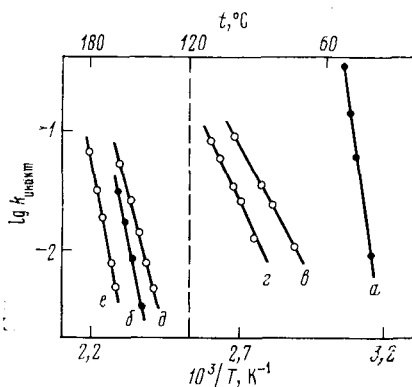


Рис. 7

Рис. 6. Зависимость от c (концентрации полиакриламида в геле) для константы скорости ($k_{\text{инакт}}$) псевдопервого порядка (мин^{-1}), характеризующей мономолекулярную термoinактивацию α -химотрипсина, механически включенного в полиакриламидный гель. Условия: pH 8, (0,02 M трис-HCl+0,1 M KCl), 60° C^{134, 143}

Рис. 7. Температурная зависимость константы скорости ($k_{\text{инакт}}$) псевдопервого порядка (мин^{-1}), характеризующей мономолекулярную термoinактивацию α -химотрипсина; а — раствор нативного фермента (pH 5—8), б — лиофилизированный фермент, в—г — фермент, механически включенный в 48, 60, 80 и 100%-ный (по массе) полиакриламидный гель соответственно (концентрации полимера указаны после лиофилизации заранее отмывших гелевых гранул размером 60 мк) ^{134, 143}

термостабилизация) белковая глобула сохраняет высокую вращательную подвижность ^{119, 143, 144}. Следовательно, можно полагать, что по мере увеличения концентрации геля размер пор уменьшается, и в конечном итоге ферментная глобула оказывается «зажатой» и не может развернуться (денатурировать) вследствие «клеточного эффекта».

Можно было бы предполагать, что механизм стабилизации другой, а именно, что обезвоживание белка может приводить к уменьшению подвижности полипептидных цепей, а следовательно, разворачивание глобулы будет затруднено. Выбор между этими альтернативными механизмами нельзя сделать при изучении термостабильности лиофилизованного препарата свободного фермента. В этом состоянии молекулы белка имеют по всей видимости весьма плотную упаковку, в которой каждая глобула может оказаться (так же, как и при иммобилизации в геле) заключенной в «тесную пору» из точно таких же глобул. Поэтому причиной найденной на опыте исключительно высокой термостабильности сухих (лиофилизированных) препаратов ферментов ^{139, 141, 142} (в част-

Константы скорости псевдопервого порядка (мин^{-1}) для необратимой мономолекулярной термoinактивации (60°C) нативного и иммобилизованного α -химотрипсина^{134, 144}

Препарат	Свободный фермент	Фермент, пришитый к поверхности целлюлозы	Фермент, вшитый в поры сефадекса
Раствор или суспензия при pH 8 ($2 \cdot 10^{-2}$ М <i>трис</i> -HCl + 0,1 М KCl)	3	0,1	0,08
Лиофилизованное состояние	*	0,05	*

* Не обнаружено термoinактивации в течение 30 мин даже при более высокой температуре (100°C).

ности, химотрипсина, см. рис. 7) может быть как «обезвоживание полипептидных цепей», так и «клеточный эффект». Разрешить этот вопрос, т. е. сделать однозначный выбор между этими двумя механизмами, удалось с использованием полисахаридных носителей.

Полисахаридные носители инертны и с белками практически не взаимодействуют. На это указывает следующий факт: хотя поступательная диффузия белковых молекул (лактоглобулины, рибонуклеаза и др.) в 40%-ном растворе декстрана практически прекращается, но их вращательная диффузия тормозится несущественно (по сравнению с водным раствором, не содержащим полисахарид)¹⁵⁰.

Для ответа на поставленный выше вопрос была изучена термостабильность химотрипсина, ковалентно присоединенного к двум полисахаридным носителям—микрoкристаллической целлюлозе и сефадексу. Хотя по химическому составу эти носители весьма похожи, в структурном отношении они принципиально различны: сефадекс в отличие от целлюлозы имеет пористое строение. Следовательно, в то время как в случае целлюлозы фермент пришит к поверхности, в сефадексе пришитая белковая молекула окажется включенной в пору носителя. Поэтому при лиофилизации в последнем (и только в последнем) случае может реализоваться «клеточный эффект». Из таблицы видно, что ковалентная иммобилизация лишь слабо влияет на термостабильность химотрипсина на том и другом полисахаридных носителях (по сравнению со свободным ферментом). Дополнительная лиофилизация фермента, пришитого к поверхности микрoкристаллической целлюлозы, также не приводит к существенному изменению термостабильности ферментного препарата. Напротив, в ферменте, пришитом к сефадексу G-150, не удалось обнаружить термoinактивацию фермента не только в сравнимых условиях (таблица), но даже при 100°C (время инкубации 30 мин).

Поскольку единственное существенное отличие между этими двумя полисахаридными носителями состоит в том, что в сефадексе после высушивания фермент оказывается в «тесной» поре, а на целлюлозе остается на поверхности частички, то можно сделать вывод: столь значительное повышение термостабильности ферментов в концентрированных пористых носителях (сефадекс и полиакриламид) обусловлено не обезвоживанием белка, а именно «клеточным эффектом».

Дальнейшие перспективы. Препараты со столь высокой термостабильностью могут найти применение на практике, если воспрепятствовать набуханию носителя в воде. Этого можно достичь, используя достаточно сшитые полимерные материалы или проводя ферментативные реакции в органических растворителях, не смешивающихся с водой (более подробно см. ниже).

Метод иммобилизации белковых глобул в тесных порах инертного носителя открывает новые возможности для стабилизации (за счет «клеточного эффекта») даже весьма лабильных ферментов, которые обычно в результате иммобилизации инактивируются при взаимодействии с носителями.

В природе подобный механизм (основанный на «клеточном эффекте»), возможно, стабилизирует против неблагоприятных условий внешней среды белки, находящиеся в спорах.

5. Подходы, основанные на рН-зависимости скорости термоинактивации

Скорость термоинактивации иногда существенно зависит от рН (см., например, ^{6, 101}). В этом случае денатурацию фермента можно подавить, используя приемы, основанные на физико-химических принципах, изложенных ниже в разделах IV.2, IV.3.

IV. СТАБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ПРОТИВ ИНАКТИВАЦИИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ЗНАЧЕНИЙ рН

Многие ферменты быстро и необратимо теряют свою каталитическую активность под действием экстремальных для них значений рН (т. е. при значениях рН среды, далеких от естественного рН-диапазона их действия) ⁵². В качестве хорошо изученных примеров можно указать на «щелочную» инактивацию свиного пепсина (начинающуюся уже при рН 5) и на «кислую» инактивацию лактатдегидрогеназы цыпленка (эффективно протекающую при рН 4).

В принципе при иммобилизации фермента его рН-стабильность может измениться (так же, как и его термостабильность — см. предыдущий раздел). И действительно, такое явление наблюдается экспериментально ^{5, 6, 42, 151} для многих ферментов. Для объяснения этого феномена обычно (см. например, ⁶) указывают на изменение микроокружения фермента при его иммобилизации; другим возможным действующим фактором может быть изменение конформации фермента при иммобилизации (вызванное, например, его химической модификацией или взаимодействием с носителем).

Однако, как и при рассмотрении термостабильности ферментов, мы вынуждены констатировать, что, несмотря на вероятную справедливость этих причин, их нельзя использовать при выработке общих принципов повышения рН-стабильности ферментов, так как неизвестно, как стабильность связана с микроокружением ферментов и их конформацией. В то же время уже сейчас можно сформулировать несколько общих причин (не связанных с рассмотренным выше), обуславливающих повышение рН-стабильности ферментов в результате их иммобилизации.

1. Предотвращение разворачивания молекул ферментов

По-видимому, рН-инактивация ферментов, так же, как и термо-, в качестве существенной стадии включает в себя разворачивание белковых молекул ⁵³, обусловленное изменением баланса электростатических и водородных связей при изменении ионизованного состояния ионогенных групп белка, вызываемом изменением рН. В таком случае здесь применимы все те рекомендации, которые были даны при обсуждении стабилизации ферментов против термоинактивации (см. выше).

2. Иммобилизация фермента на носителе с буферными свойствами

Пусть фермент иммобилизован на носителе, несущем ионогенные группы, обладающие буферными свойствами со значительной емкостью. В таком случае очевидно, что при изменении рН раствора изменение «микро-рН» в носителе (т. е. значения рН вокруг фермента) всегда будет значительно меньше. Это приведет к повышению наблюдаемой рН-

Рис. 8. рН-Стабильность нативной (а) и ковалентно присоединенной к пористому стеклу (б) лактатдегидрогеназы (25°, рН 3,2) ¹⁵²

Рис. 9. рН-Зависимости максимальной скорости V (усл. ед.) гидролиза бензилпенициллина, катализируемого пенициллинамидазой (А), и константы скорости (мин^{-1}) инактивации (при 50°) пенициллинамидазы (Б); а — нативный фермент, б — комплекс фермента с поликатионом, в — комплекс фермента с полианионом ¹⁵⁵

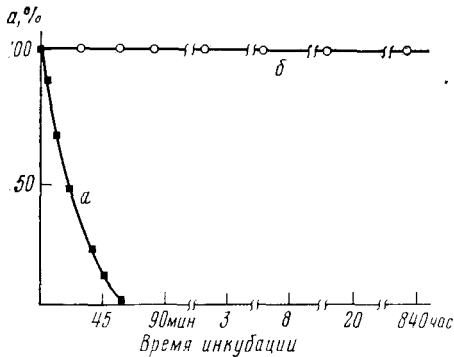


Рис. 8

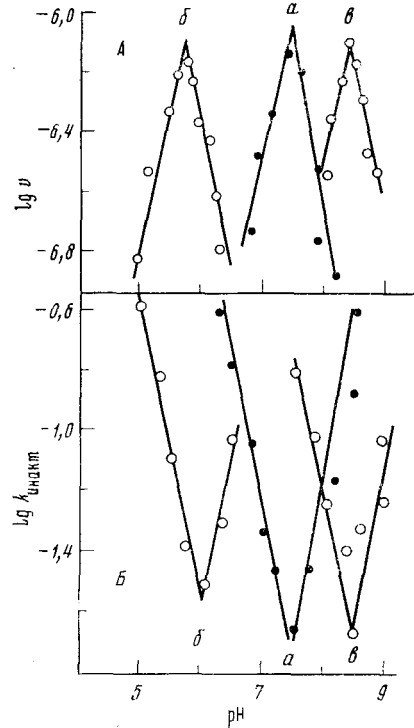


Рис. 9

стабильности иммобилизованного фермента по сравнению с его нативным состоянием.

Блестящей иллюстрацией этого положения является, по-видимому, работа Каплана с сотр.¹⁵², в которой исследована кислотная инактивация нативной и ковалентно присоединенной к стеклу лактатдегидрогеназы. В то время как нативный фермент при рН 3,2 (25° С) почти полностью инактивируется за 1 час, иммобилизованный фермент в этих условиях сохраняет практически 100%-ную активность даже после 35-дневной инкубации (рис. 8). Буферные свойства поверхности носителя в этом случае подтверждаются тем, что в отличие от нативной лактатдегидрогеназы каталитическая активность пришитого к стеклу фермента практически не зависит от рН среды ¹⁵².

3. Сдвиг рН-профиля процесса рН-инактивации фермента

После ставших классическими работ Качальского с сотр.^{153, 154} совершенно естественным кажется сдвиг рН-профиля каталитической активности ферментов при их присоединении к полиэлектролитам⁶⁵. При иммобилизации ферментов на полианионах рН-профиль активности

сдвигается в щелочную область (вследствие большей концентрации протонов в фазе носителя по сравнению с раствором), а при иммобилизации на поликатионах — в кислую (вследствие меньшей концентрации протонов в фазе носителя по сравнению с раствором); см., например, рис. 9, А. Сдвиг рН-профиля каталитической активности ферментов при иммобилизации должен наблюдаться также, вообще говоря, и в случае неэлектролитного носителя вследствие определенного распределения протонов между ним и средой⁶⁵.

Очевидно, что аналогичные эффекты должны иметь место и при рН-инактивации ферментов — различие в значениях рН раствора и фазы носителя должно приводить к сдвигу наблюдаемого рН-профиля процесса рН-инактивации. И, действительно, в серии работ Качальского с сотр. (см. ссылки в⁶) показано, что, как и следовало ожидать, пришивка ферментов к полианионному носителю повышает их стабильность в щелочных рН, а пришивка к поликатионному носителю делает их более устойчивыми в кислых растворах. Указанное явление иллюстрируют данные работы¹⁵⁵ (рис. 9), в которой изучали активность и стабильность иммобилизованной на различных носителях пенициллинамидазы. Видно (рис. 9, Б), что рН-профили константы скорости рН-инактивации фермента смещаются в зависимости от природы носителя в полном согласии с теорией.

В. ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ РЕАКЦИИ В ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЯХ С МАЛЫМ СОДЕРЖАНИЕМ (ИЛИ В ОТСУТСТВИИ) ВОДЫ

Многие ферменты приспособлены природой для эффективного функционирования прежде всего в водных растворах. Это обстоятельство принципиально ограничивает применение ферментов как катализаторов используемых на практике реакций. Дело в том, что многие химические реакции термодинамически выгодны лишь в определенных органических растворителях. Это связано со специфическими сольватационными эффектами, с растворимостью отдельных компонентов реакции и, с тем, что наряду с нужным продуктом иногда образуется вода, и, следовательно, при проведении реакции в водных растворах равновесие сильно смещено в сторону исходных веществ. Последняя причина тормозит внедрение биокатализа в такие важные процессы, как синтез сложных эфиров или амидов, полимеризация аминокислот или сахаров, реакции дегидратации и др.

Очевидно, что выход из такого затруднения может состоять в переходе от воды, как среды реакции, к неводному растворителю. Появилось довольно большое количество работ, посвященных попыткам провести ферментативные реакции в органических растворителях или в водноорганических смесях с высокой концентрацией неводного компонента^{58, 156—181}. Однако во всех корректных работах такого рода констатируется, что при переходе от воды к органическому растворителю каталитическая активность ферментов резко падает, и исчезает их субстратная специфичность.

Частичное решение проблемы можно найти, подбирая органический компонент, в наименьшей степени денатурирующий фермент¹⁸¹. Более перспективными, однако, представляются два других подхода: использование двухфазных водноорганических систем (смесей воды с несмешивающимися с ней органическими растворителями)^{59, 182} или включение ферментов в «обращенные» мицеллы поверхностноактивных веществ¹⁸³. Остановимся более подробно на физико-химических принципах этих трех подходов.

1. Критерий для выбора оптимального органического растворителя

Для проведения ферментативных процессов в неводных или водно-органических средах с высоким содержанием неводной компоненты, как правило, используют такие органические растворители, как диметилсульфоксид^{158–165}, формамид^{163, 166}, диметилформамид^{163, 167–169}, диоксан^{170–174}; этиленгликоль^{172, 175}, глицерин^{173, 176}, одноатомные спирты^{163, 172, 177–180}, ацетон^{165, 174}. Выбор того или иного растворителя является в большинстве случаев случайным, научно не обоснованным.

Критерий для подбора оптимального растворителя (с точки зрения его влияния на фермент) можно обосновать исходя из общих представлений об относительной роли сил, поддерживающих нативную структуру белковых молекул в водных растворах: доминирующую роль играют гидрофобные взаимодействия⁷⁹. Следовательно, «хороший» для белка неводный растворитель не должен разрушать такие взаимодействия.

Для ответа на вопрос, какие растворители обладают этим свойством, обратимся к данным, полученным для модельного процесса мицеллообразования поверхностноактивных веществ в различных растворителях. Рэй¹⁸⁴ пришел к выводу, что гидрофобные взаимодействия — это лишь частный случай сольвофобных взаимодействий. По способности к реализации сольвофобных взаимодействий все растворители можно разделить на три класса: к первому классу относятся вода, глицерин, этиленгликоль, аминоктанол, формамид и некоторые другие; ко второму — метил- и диметилформамид, а к третьему — метанол, этанол, толуол. В наибольшей степени сольвофобные взаимодействия реализуются в растворителях, относящихся к первому классу (так, в¹⁸⁴ найдено, что мицеллы детергента образуются только в них); в значительно меньшей степени они могут осуществляться в растворителях второго класса и практически отсутствуют в растворителях третьего класса.

Такое различие обусловлено, по мнению Рэя¹⁸⁴, тем, что растворители первого класса содержат в молекуле по крайней мере два или три фрагмента, способных к образованию водородных связей. В результате межмолекулярных взаимодействий водородные связи образуют жесткие (термодинамически невыгодные) каркасные структуры растворителя вокруг сольвофобных растворенных молекул. Это и приводит к сольвофобным (или, в частном случае, гидрофобным) взаимодействиям. В ряду растворителей первого класса наиболее эффективно сольвофобные взаимодействия реализуются в воде и глицерине (оценено по величинам критических концентраций мицеллообразования); у остальных растворителей эта способность существенно ниже.

Приведенные данные позволили сформулировать¹⁸¹ критерий для выбора оптимального растворителя. Этот критерий весьма универсален, поскольку эффективность сольвофобных (так же, как и гидрофобных¹⁸⁵) взаимодействий определяется не природой взаимодействующих молекул, а прежде всего природой растворителя. Следовательно, если полагать, что основная роль в поддержании структуры белковых молекул принадлежит гидрофобным взаимодействиям⁷⁹, то следует признать, что наилучшими растворителями для проведения ферментативных реакций должны быть растворители первого класса, а среди них — вода (которую использует Природа) и глицерин.

Следует отметить, что авторы большинства работ использовали растворители, относящиеся ко второй или даже третьей группам (см. выше), т. е. самые «неудачные». Однако в некоторых работах все же было экспе-

риментально найдено^{172, 180, 186, 187}, что растворители, относящиеся к первому классу (особенно глицерин и, в меньшей степени, этиленгликоль), гораздо слабее денатурируют белки, чем прочие. В свете работ^{181, 184} эти эмпирические факты находят свое физико-химическое объяснение.

2. Ферментативные реакции в двухфазных системах вода — несмешивающийся с водой органический растворитель

С развитием исследований в области иммобилизованных ферментов начали появляться работы, авторы которых пытаются заставить ферменты функционировать в органических растворителях или в водноорганических смесях с высокой концентрацией органического компонента, повысив их стабильность к денатурирующему действию неводной среды за счет присоединения к носителю (см., например,^{165, 168, 169, 173, 174, 176, 179, 180, 189-191}). Однако даже в самых удачных системах, при концентрациях органического компонента выше 90%, иммобилизованный фермент все же инактивируется. Таким образом, с точки зрения препаративного ферментативного синтеза поставленная проблема остается нерешенной. Весьма возможно, что в таком виде она принципиально неразрешима, поскольку при переходе от воды к неводной среде с необходимостью происходит существенное изменение конформации ферментов^{58, 192} и, как следствие, резкое нарушение их каталитической функции.

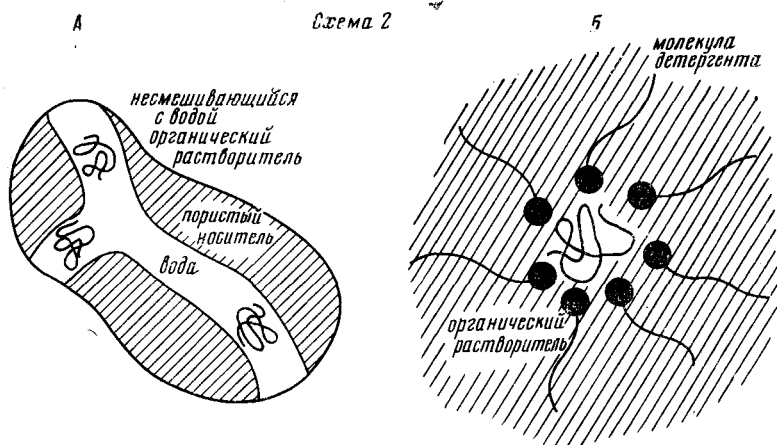
Принципиально иное решение было найдено нами^{59, 182}. Во всех известных нам работах, где исследовали поведение ферментов в водноорганических или органических средах, в качестве неводного компонента использовали такие растворители, как ацетон, ацетонитрил, диоксан, диметилсульфоксид, диметилформамид, метанол, этанол и другие (см. выше). Общей чертой этих растворителей является то, что они неограниченно смешиваются с водой. Именно вследствие этого приходится решать проблему стабилизации ферментов против инактивации органическим компонентом.

Основная идея нашего подхода^{59, 182} состоит в том, что органический растворитель, добавляемый к содержащей фермент водной фазе, должен быть практически несмешиваемым с водой (например, хлороформ, эфир, жирные алифатические спирты, углеводороды и т. д.). В таком случае полученная система будет состоять из двух фаз — водной и органической. Фермент будет находиться лишь в водной фазе, поскольку, во-первых, его можно там иммобилизовать; во-вторых, если даже иммобилизация невозможна, то обычно белки, обладая удовлетворительной растворимостью в воде, практически нерастворимы в гидрофобных растворителях⁵⁸. В свою очередь субстраты, будучи растворенными в органической фазе, могут свободно^{193, 194} диффундировать из нее в воду и там под действием фермента претерпевать химическое превращение: образующиеся продукты будут диффундировать из воды обратно в органическую фазу. Таким образом, термодинамическое равновесие в проводимой химической реакции будет устанавливаться по всей водноорганической системе через воду (с помощью находящегося в воде катализатора-фермента).

Такая двухфазная система обладает рядом принципиально важных свойств: 1) поскольку фермент не контактирует с неводным компонентом реакционной среды, то отпадает необходимость решать проблему стабилизации фермента^{59, 182}; 2) объемная доля органической фазы может быть в принципе сколь угодно близка к единице, следовательно, условия равновесия в такой двухфазной системе могут быть сколь угодно близки к равновесию в чистой органической среде (см. ниже теоре-

тические аспекты^{59, 182}); 3) высокое содержание неводного компонента среды может обеспечить также достаточную для препаративного синтеза растворимость гидрофобных реагентов, например стероидов^{195, 196}.

Методические аспекты. Ферментативная система «вода — несмешивающийся с ней органический растворитель» может быть приготовлена как эмульсия водного раствора фермента в органической среде или, что гораздо более удобно методически и технологически, как суспензия в органической среде пористых частиц (например, пористого стекла или керамики, гидрофильного геля и т. д.), пропитанных водным раствором фермента^{59, 182} (см. схему 2, А). Водный раствор фермента



может также быть заключен в микрокапсулы или полые волокна (см.^{9, 11}) или же в микротрещины полимерного носителя путем его механической деформации¹⁹⁷. Фермент может быть использован как в свободном, так и иммобилизованном состоянии.

Казалось бы, препаративный ферментативный синтез в двухфазной системе не применим к реакциям, в которых реагенты (и прежде всего продукты) — ионы, поскольку ионы не будут переходить из воды в органическую фазу. Однако эту трудность можно преодолеть¹⁸², подбирая для ионных реагентов гидрофобные противоионы (как это предложено в химии нуклеотидов¹⁹⁸ и широко распространено в катализе фазовым переносом, см., например,¹⁹⁹).

Примеры. (а) Идея проводить ферментативный органический синтез в двухфазной водноорганической среде с высоким содержанием неводного компонента была апробирована^{59, 182} на примере катализируемого химотрипсином синтеза этилового эфира N-ацетил-L-триптофана из этанола и N-ацетил-L-триптофана. Поскольку при синтезе наряду со сложным эфиром образуется вода, при проведении реакции в воде равновесие сильно смещено в сторону исходных реагентов (см. ссылки в^{200, 201}). Более того, при нейтральных значениях pH (при которых действует используемый фермент) имеет место дополнительный сдвиг равновесия, неблагоприятный для синтеза сложного эфира и обусловленный термодинамически выгодной ионизацией одного из исходных компонентов — кислоты. В итоге выход сложного эфира ничтожно мал и составляет даже при относительно высокой концентрации этанола (~10 М) менее 0,01%. В двухфазной системе «хлороформ+1 об.% воды» равновесие удалось полностью сместить в сторону сложного эфира^{59, 182}; выход составил в этом случае практически 100%.

Ферментативный синтез вели следующим образом. Пористое стекло просто вымачивали в водном буферном (1 М KH_2PO_4 , pH 7) растворе химотрипсина ($5 \cdot 10^{-4}$ М). Затем 0,3 г полученного препарата перенесли в 30 мл хлороформа, содержащего субстраты, т. е. 10^{-2} М N-ацетил-L-триптофана и 1 М этанола; систему перемешивали в течение ночи. В результате анализа полученной смеси найдено, что весь N-ацетил-L-триптофан превратился в соответствующий этиловый эфир. Идентичность полученного продукта коммерческому этиловому эфиру N-ацетил-L-триптофана доказана с помощью газожидкостной хроматографии — времена удерживания совпадали. Для выделения продукта достаточно отделить водную фазу и упарить хлороформ на ротаторном испарителе.

(б) Аналогичным образом удалось сдвинуть равновесие катализируемой щелочной фосфатазой реакции синтеза глицерофосфата из глицерина и неорганического фосфата¹⁸². Чтобы обеспечить растворимость ионных фосфатных реагентов в двухфазной системе «хлороформ + 1 об. % воды» в качестве противоиона использовали тетрабутиламмоний. В то время как в воде¹⁸⁸ выход сложного эфира ничтожно мал (менее 0,1%), в двухфазной системе он составил 30%.

Теоретические аспекты и перспективы. Наблюдаемый сдвиг равновесия имеет общий характер для химических реакций. Чтобы показать это, рассмотрим реакцию:



где K — константа равновесия. Пусть целью синтеза является, например, получение продукта C. Его выход, очевидно, определяется выражением:

$$[C] = K \cdot [A][B]/[D]. \quad (2)$$

Видно, что существуют два источника сдвига равновесия (увеличения выхода продукта C) при переходе от воды, как среды реакции, к описанной двухфазной водноорганической системе. Во-первых, если вторым продуктом (D) в реакции является вода, то уменьшение ее концентрации в системе, согласно уравнению (2), приведет к повышению выхода продуктов. Так, в описанных выше синтезах перешли от 100% воды к ~1%-ной водной системе; это дало ~100-кратное повышение выхода сложного эфира.

Во-вторых, сдвиг равновесия в реакции (1) возможен за счет изменения значения эффективной константы равновесия при переходе от воды к двухфазной системе. Пусть для реакции (1) константа равновесия в воде равна K_w . Тогда эффективная константа равновесия в двухфазной системе (K) определяется (по аналогии с²⁰²) выражением:

$$K = K_w \frac{(1 + \alpha P_C)(1 + \alpha P_D)}{(1 + \alpha P_A)(1 + \alpha P_B)}, \quad (3)$$

где α — отношение объемов неводной и водной фаз; P_A , P_B , P_C и P_D — коэффициенты распределения реагентов между неводной и водной фазами. Допустим, что исходные реагенты A и B плохо растворяются в органической фазе, но хорошо растворимы в воде, т. е. имеют низкие коэффициенты распределения — например, $P_A \approx P_B \approx 10^{-2}$. В таком случае, если хотя бы один из продуктов плохо растворим в воде, но хорошо растворим в органической фазе (т. е. имеет высокий коэффициент распределения, например, $P_C \approx 100$), то при $\alpha = 100$ из уравнения (3) следует, что $K > 2500 K_w$.

Видно, что эффективное значение константы равновесия в двухфазной системе в принципе может превышать константу равновесия в воде на много порядков. Это служит дополнительным (в некоторых случаях может оказаться и главным) источником сдвига равновесия (1).

В принципе варьируя природу неводной фазы (и тем самым меняя значения коэффициентов распределения реагентов), можно по своему усмотрению изменять значение K и, следовательно, выход продукта. В случае ионных реагентов можно менять их коэффициенты распределения (и тем самым сдвигать равновесие реакции в нужную сторону), подбирая гидрофобные противоионы (см. выше методические аспекты).

3. Катализ водорастворимыми ферментами, включенными в «обращенные» мицеллы поверхностноактивного вещества в органических растворителях

Молекулы многих поверхностноактивных веществ (ПАВ) образуют в органических растворителях ассоциаты типа «обращенных» мицелл, в которых полярные (ионные) группы, входящие в молекулу ПАВ, создают ядро ассоциата, а углеводородные фрагменты — внешний слой^{203–205}. Известно, что такие мицеллы способны сольбилизовать ионы, полярные органические вещества, а также значительные количества воды (несколько десятков молекул H_2O на одну молекулу ПАВ). Недавно показано¹⁸³, что с помощью мицеллообразующего ПАВ можно в органических растворителях сольбилизовать также относительно высокие концентрации биополимеров-ферментов, вплоть до 1 мг/мл, что соответствует $\geq 10^{-5}$ М активных центров (при молекулярной массе фермента не более 100 000) и значительно превышает необходимый уровень «каталитических концентраций» большинства ферментов^{1,2}. Фермент практически полностью сохраняет при этом каталитическую активность и субстратную специфичность.

По-видимому, молекула фермента, будучи включенной в обращенную мицеллу (см. схему 2, Б), защищена против денатурации (разворачивания ее структуры) тем, что поверхность раздела «фаз» между белковой глобулой (или, соответственно, ее поверхностным слоем воды) и фазой органического растворителя стабилизирована молекулами ПАВ. В итоге биокатализатор непосредственно может и не контактировать с неблагоприятной для него органической средой, находясь в своеобразном микроакторе, содержащем всего лишь несколько сотен молекул H_2O на молекулу фермента (это соответствует общему содержанию воды в системе органический растворитель — ПАВ менее 1 об. %). Так, относительная каталитическая активность α -химотрипсина, сольбилизованного в октане, сохраняется при комнатной температуре месяцами¹⁸³.

Изученные системы. Все эти положения были продемонстрированы¹⁸³ на примере протеолитического фермента химотрипсина (в реакции гидролиза *n*-нитроанилида N-глутарил-L-фенилаланина), а также пероксидазы (при окислении ферроцианид-ионов и пирогаллола). Реакции этих ферментов с их специфическими субстратами исследованы в весьма гидрофобных (углеводородных) растворителях, а именно октане и бензоле с использованием в качестве ПАВ продукта крупнотоннажного производства — ди-(2-этилгексил)ового эфира натриевой соли сульфоянтарной кислоты (Аэрозоль ОТ), любезно предоставленного нам проф. Менджером (США). Обзор данных по образованию и свойствам мицелл этого ПАВ в органических растворителях дан в²⁰⁶. Типичный эксперимент был следующим. К 2 мл 0,1 М раствора ПАВ в углеводо-

роде добавляли $\leq 0,01$ мл концентрированного (10^{-3} М или менее) раствора фермента в водном буфере, вносили $\leq 0,01$ мл раствора субстрата в воде или в ацетонитриле и в полученной гомогенной (оптически прозрачной) системе спектрофотометрически измеряли скорость ферментативной реакции.

В качестве примера на рис. 10 представлены данные¹⁸³ по пероксидазному окислению пирогаллола. Видно, что при перенесении реакции из воды в среду обращенных мицелл в октано происходит изменение кинети-

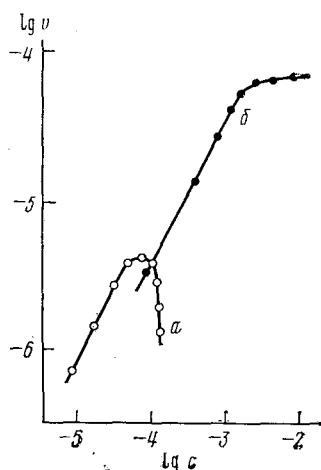


Рис. 10. Зависимости начальной скорости пероксидазного окисления пирогаллола в воде (а) и октано (б) от концентрации пирогаллола (моль/л). Условия: рН 7, 26° С, $2,5 \cdot 10^{-3}$ М H_2O_2 , $3 \cdot 10^{-9}$ М пероксидазы, в октано содержание воды 2 об. % и 0,1 М Аэрозоль ОТ¹⁸³

тического механизма катализа. Это связано с тем, что в последнем случае отсутствует эффект ингибирования субстратом, характерный для реакции в воде.

Использование в фундаментальных исследованиях биохимии. Ферменты, солюбилизованные по предложенному в¹⁸³ методу в органических растворителях (с добавкой ПАВ, образующих обращенные мицеллы), без сомнения найдут применение как модели ферментов, функционирующих *in vivo* в биологических мембранах, а также при изучении роли воды в структуре белков и механизма ферментативного катализа (особенно тех процессов, где вода — химический реагент). Дело в том, что количество воды, солюбилизированной в системе и, следовательно, окружающей фермент в обращенной мицелле ПАВ, можно строго дозировать.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Стабилизация ферментов под действием растворимых в воде добавок

Мы стремились как можно более полно осветить проблему стабилизации ферментов, однако умышленно оставили вне поля зрения широко распространенное и часто обсуждаемое в литературе явление стабилизации ферментов под действием таких эффекторов, как ионы двухвалентных металлов (в первую очередь Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} ^{207–210}), сульфат аммония²¹¹, различные анионы и прежде всего фосфат и сульфат^{212–215}, сывороточный альбумин^{216, 217}, полиолы (прежде всего глицерин, а также этиленгликоль, сахароза и др.)^{218–220}, детергенты²²¹, добавки органических растворителей^{222, 223}.

В настоящем обзоре мы не рассматривали такого рода стабилизацию ферментов по следующим причинам. Во-первых, указанные эффек-

ты не носят общего характера: один и тот же эффектор, стабилизируя один фермент, может в то же время уменьшать стабильность другого фермента^{211, 224}; наряду с этим данный фермент может стабилизироваться одними из указанных эффекторов и лабилизироваться другими²²⁵. Во-вторых, в большинстве случаев физико-химический механизм стабилизации ферментов эффекторами остается неясным, а в других случаях является тривиальным, как, например, иногда в случае стабилизирующих добавок сывороточного альбумина. Этот белок либо эффективно адсорбируется на поверхности раздела фаз, например, вода/воздух, и тем самым препятствует поверхностной инактивации самого фермента, либо сорбирует катионы тяжелых металлов и другие «отравляющие» фермент примеси. Вместе с тем необходимо подчеркнуть практическую и теоретическую важность работ в данной области и особенно тех из них, в которых исследование носит корректный количественный характер.

2. Два общих принципа стабилизации ферментов

В настоящем обзоре в достаточной мере рассмотрены лишь общие физико-химические подходы, имеющие вдобавок технологическое значение и позволяющие защитить фермент от денатурирующих факторов среды (повышенная температура, экстремальные значения pH и добавки органических растворителей). Все многообразие обсужденных подходов (см. гл. III—V) можно разделить всего лишь на две группы, соответствующие следующим двум общим принципам.

1). Увеличение жесткости белковой глобулы, препятствующее ее денатурационному разворачиванию и тем самым инактивации; этого можно достичь как наложением на белок «скобок» (с образованием водорастворимого препарата), так и в результате многоточечного взаимодействия белка (как ковалентного, так и физического) с комплементарной ему поверхностью носителя (для получения нерастворимого, гетерогенного катализатора).

2). Пространственное разделение фермента и тех факторов среды, которые не благоприятствуют сохранению каталитической активности и специфичности. Реализация этого принципа зависит от природы инактивирующего воздействия. Так, чтобы воспрепятствовать pH-инактивации, можно использовать для иммобилизации фермента носитель либо с буферными свойствами, либо обеспечивающий в своем поверхностном слое локальный сдвиг pH. Влияния органического растворителя также можно избежать двояко: либо проводя ферментативную реакцию в двухфазной системе «вода — несмешивающийся с водой органический растворитель», либо включив фермент в «обращенные» мицеллы поверхностно-активного вещества.

3. Стабилизация ферментов как задача с оптимальным решением

Разработанные к настоящему времени методы стабилизации ферментов (прогив их инактивации в результате разворачивания белковых глобул) могут привести в ряде случаев к побочным отрицательным эффектам, несколько затрудняющим использование биокатализа на практике.

Так, во-первых, при попытках стабилизации фермента увеличение жесткости белковой глобулы не должно быть чрезмерным: в противном

случае может произойти потеря каталитической активности. Дело в том, что функционирование активного центра предполагает, как правило, согласованность действия нескольких функциональных групп белка и, следовательно, требует определенной подвижности полипептидных цепей (см. ссылку^{1, 2}). Кстати говоря, взаимосвязь стабильности и каталитической активности ферментов играет, по-видимому, важную роль при адаптации организма к изменениям условий внешней среды (температура, содержание солей в морской воде)⁵⁴.

Во-вторых, при включении фермента в носитель (в частности, в гель) могут возрастать стерические препятствия для взаимодействия фермента с макромолекулярными субстратами (см. ссылки в^{5, 65}).

И, наконец, в-третьих, в слишком плотных носителях, обеспечивающих высокую термостабильность иммобилизованного фермента, могут в свою очередь возникать существенные диффузионные затруднения для обмена реагентами между катализатором и средой (см. ссылки в^{5, 64-66}).

Следовательно, в ряде случаев при стабилизации фермента имеем задачу с оптимальным решением, т. е. приходится оптимизировать процесс иммобилизации фермента так, чтобы, потеряв немного в каталитической активности, выиграть в термостабильности.

Разумеется, этих недостатков большей частью или полностью лишены подходы, действующие по принципу пространственного разделения фермента и тех факторов среды, которые не благоприятствуют его функционированию.

ЛИТЕРАТУРА

1. K. J. Laidler, P. S. Bunting, *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, Clarendon Press, Oxford, 1973.
2. И. В. Березин, К. Мартинек, *Основы физической химии ферментативного катализа*, «Высшая школа», М., 1977.
3. L. B. Wingard, In *Advances in Biochemical Engineering*, ed. T. K. Chose, A. Fiechter, N. Blakebrough, v. 2, Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg — N. Y., 1972, p. 1.
4. D. L. Cooney, A. L. Demain, P. Dunnill, A. E. Humphrey, M. D. Lilly, D. I. C. Wang, *Fermentation and Enzyme Technology*, Wiley, N. Y., 1977.
5. Сб. *Иммобилизованные ферменты*, ред. И. В. Березин, В. К. Антонов, К. Мартинек, Изд. МГУ, М., 1976.
6. R. Goldman, L. Goldstein, E. Katchalski, in *Biochemical Aspects of Reactions on Solid Supports*, ed. G. R. Stark, Acad. Press, N. Y., 1971, p. 1.
7. O. R. Zaborsky, *Immobilized Enzymes*, CRC Press, Cleveland, 1973.
8. *Immobilized Enzyme Technology*, ed. H. H. Weetall, S. Suzuki, Plenum Press, N. Y.—London, 1975.
9. *Methods in Enzymology*, v. 44, ed. K. Mosbach, Acad. Press, N. Y., 1976.
10. И. В. Березин, А. А. Клесов, *Успехи химии*, 45, 180 (1976).
11. *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins*, ed. T. Chang, Plenum Press, N. Y., 1977.
12. I. Chibata, T. Tesa, T. Sate, T. Mori, *Methods in Enzymology*, 44, 746 (1976).
13. H. H. Weetall, G. Baum, *Biotechnol. Bioeng.*, 12, 399 (1970).
14. J. R. Wykes, P. Dunnill, M. D. Lilly, *Nature New Biol.*, 230, 187 (1971).
15. W. Marconi, S. Gulinelli, F. Morisi, *Chim. e ind.*, 56, 417 (1974).
16. D. A. Self, G. Kay, M. D. Lilly, *Biotechnol. Bioeng.*, 11, 337 (1969).
17. B. K. Hamilton, J. P. Montgomery, D. I. Wang, in *Enzyme Engineering* ed. E. K. Pye, L. B. Wingard, 2, Plenum Press, N. Y.—London, 1974, p. 153.
18. K. Mosbach, P.-O. Larson, *Biotechnol. Bioeng.*, 12, 19 (1970).
19. M. J. Grove, G. W. Strandberg, K. L. Smiley, *Там же*, 13, 709 (1971).
20. S. S. Sofer, D. M. Ziegler, R. P. Popovich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 57, 183 (1974).
21. I. Parikh, D. W. McGlashan, C. Fenselau, *J. Med. Chem.*, 19, 296 (1976).
22. D. Gurne, D. Shemin, *Science*, 180, 1188 (1973).
23. W. Becker, E. Pfeil, *J. Am. Chem. Soc.*, 88, 4299 (1966).
24. M. B. Cohen, L. Spolter, C. C. Chang, N. S. MacDonald, J. Takahashi, D. D. Bobinet, *J. Nucl. Med.*, 15, 1192 (1974).
25. D. L. Marshall, *Biotechnol. Bioeng.*, 15, 447 (1973).

26. A. Traub, E. Kaufmann, Y. Teitz, Anal. Biochem., 28, 469 (1969).
27. H. D. Brown, A. B. Patel, S. K. Chattopadhyay, J. Chromatogr, 35, 103 (1968).
28. C. H. Hoffman, E. Harris, S. Choadroff, S. Michelson, J. W. Rothrock, E. Peterson, W. Reuter, Biochem. Biophys. Res. Commun., 41, 710 (1970).
29. M. N. Tchang, M. Graffe, M. Grunberg-Mahage, Там же, 31, 1, (1968).
30. V. H. Edwards, in Enzyme Engineering, ed. L. B. Wingard, Wiley, N. Y. 1972, p. 343.
31. Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry ed. J. B. Jones, C. J. Sik, D. Perlman, Wiley, N. Y., 1976.
32. H. H. Weetall, W. P. Vann, W. H. Pitcher, D. D. Lee, Y. Y. Lee, G. T. Tsao, Methods in Enzymology, 44, 776 (1976).
33. W. R. Vieth, K. Venkatasubramanian, Там же, 44, 768 (1976).
34. I. Chibata, T. Tosa, T. Sato, T. Mori, Y. Matsuo, in Fermentation Technology Today, ed. G. Terul, Society of Fermentation, Technology, Japan, 1972, p. 383.
35. M. Pastore, F. Morisi, D. Zaccardelli, Methods in Enzymology, 44, 822 (1976).
36. W. H. Pitcher, J. R. Ford, H. H. Weetall, Methods in Enzymology, 44, 792 (1976).
37. R. K. Andren, M. Mandels, J. E. Modeiros, Process. Biochem., 11, 2, (1976).
38. И. В. Березин, К. Мартинек, Успехи химии, 48, 1921 (1979).
39. I. V. Berezin, A. M. Klibanov, G. P. Samokhin, V. S. Goldmacher, K. Martinek, in Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins, ed. T. Chang, Plenum Press, N. Y., 1977, p. 237.
40. J. R. Benemann, J. A. Berenson, N. O. Kaplan, M. D. Kamen, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 2317 (1973).
41. K. Mosbach, FEBS Letters, 62, E80 (1976).
42. W. R. Vieth, K. Venkatasubramanian, Chem. Technol., 4, 309 (1974).
43. M. D. Lilly, P. Dunnill, Methods in Enzymology, 44, 717 (1976).
44. A. K. Sharp, G. Kay, M. D. Lilly, Biotechnol. Bioeng., 11, 363 (1969).
45. C. F. Meares, D. A. Goddwin, C. S.-H. Leung, A. Y. Girgis, D. J. Silvester, A. D. Nunn, P. J. Levander, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 3803 (1976).
46. Н. М. Эмануэль, Кинетика экспериментальных опухолевых процессов, «Наука», М., 1977.
47. Ю. М. Торчинский, Сера в белках, «Наука», М., 1977.
48. K. Tanizawa, M. L. Bender, J. Biol. Chem., 249, 2130 (1974).
49. K. Mosbach, P.-O. Larsson, Ch. Lowe, Methods in Enzymology, 44, 859 (1976).
50. G. M. Whitesides, A. Lamotte, O. Adalsteinsson, C. K. Colton, Там же, 44, 887 (1976).
51. И. В. Березин, Б. М. Кершенгольц, Н. Н. Угарова, ДАН СССР, 223, 1256 (1975).
52. В. П. Кушнер, Конформационная устойчивость и денатурация биополимеров, «Наука», Л., 1977.
53. C. Tanford, Adv. Protein Chem., 23, 121 (1968).
54. В. Я. Александров, Клетки, макромолекулы и температура, «Наука», Л., 1975.
55. I. Chibata, T. Tosa, T. Sato, Methods in Enzymology, 44, 739 (1976).
56. Н. Н. Weetall, Советско-американский семинар по иммобилизованным ферментам, МГУ, М., 1975.
57. J. Woodward, A. Wiseman, J. Appl. Chem. Biotechnol., 26, 580 (1976).
58. S. J. Singer, Adv. Protein Chem., 17, 1 (1962).
59. A. M. Klibanov, G. P. Samokhin, K. Martinek, I. V. Berezin, Biotechnol. Bioeng., 19, 1351 (1977).
60. И. В. Березин, А. А. Клесов, А. Л. Марголин, П. С. Ныс, Е. М. Савицкая, В. Ю.-К. Шведас, Антибиотики, 21, 519 (1976).
61. Н. Н. Weetall, Biochim. Biophys. Acta, 212, 1 (1970).
62. G. Bell, J. A. Blain, J. D. E. Patterson, R. Todd, J. Appl. Chem. Biotechnol., 26, 582 (1976).
63. Т. И. Вилай, Термостабильные ферменты грибов, «Наукова думка», Киев, 1979.
64. D. F. Ollis, Biotechnol. Bioeng., 14, 871 (1972).
65. И. В. Березин, А. М. Клибанов, К. Мартинек, Успехи химии, 44, 17 (1975).
66. L. Goldstein, Methods in Enzymology, 44, 397 (1976).
67. O. R. Zaborsky, in Enzyme Engineering, ed. L. B. Wingard, v. 1, Wiley, New York, 1972, p. 21.
68. V. P. Torchilin, E. G. Tischenko, V. N. Smirnov, E. I. Chazov, J. Biomed. Mater. Res., 11, 223 (1977).
69. A. D. McLaren, L. Packer, Adv. Enzymol., 33, 245 (1970).
70. G. J. H. Mettrose, Rev. Pure Appl. Chem., 21, 83 (1971).
71. D. Gabel, I. Z. Steinberg, E. Katchalski, Biochemistry, 10, 4661 (1971).
72. G. M. Giacometti, A. Colosimo, S. Stefanini, M. Brunori, E. Antonini, Biochim. Biophys. Acta, 285, 320 (1972).
73. L. J. Berliner, S. T. Miller, R. Uy, G. P. Royer, Там же, 315, 195 (1973).
74. T. A. Moore, C. Greenwood, Biochem. J., 149, 169 (1975).

75. J. Lasch, *Acta Biol. Med. Germ*, **34**, 549 (1975).
76. A. O. Barel, J.-P. Prieels, *Europ. J. Biochem.*, **50**, 463 (1975).
77. Л. А. Блюменфельд. Проблемы биофизики, «Наука», М., 1974, гл. 5.
78. O. R. Zaborsky, in *Enzyme Engineering*, ed. E. K. Pye, L. B. Wingard, v. 2, Plenum Press, N. Y.—London, 1974, p. 115.
79. W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.*, **14**, 1 (1959).
80. W. F. Harrington, M. Sela, *Biochim. Biophys. Acta*, **31**, 427 (1959).
81. C. Tanford, K. Kawahara, S. Lapenja, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 729 (1967).
82. G. P. Hess, in *The Enzymes*, ed. P. O. Boyer, v. 3, Acad. Press, N. Y., 1971, p. 213.
83. A. Hasegawa, K. Imahori, *J. Biochem.*, **79**, 469 (1976).
84. F. Wold, *Methods in Enzymology*, **25**, 623 (1972).
85. J. H. Kennedy, L. J. Kricka, P. Wilding, *Clinica Chim. Acta*, **70**, 1 (1976).
86. L. J. Sidel, S. Leitzes, W. H. Elfring, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **15**, 409 (1964).
87. D. J. Herzig, A. W. Rees, R. A. Day, *Biopolymers*, **2**, 349 (1964).
88. J. H. Wang, J. Tu, *Biochemistry*, **8**, 4403 (1964).
89. R. Josephs, H. Eizenberg, E. Reisler, Там же, **12**, 4060 (1973).
90. G. H. Beaven, W. B. Gratzer, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **5**, 215 (1973).
91. P. D. Snyder, J. F. Wold, R. W. Bernlehr, C. Dullum, R. J. Desnich, W. Krivit, R. M. Condie, *Biochem. Biophys. Acta*, **350**, 432, (1974).
92. А. В. Максименко, В. П. Торчилин, А. М. Клибанов, К. Мартинек, Вестник МГУ, Химия, **19**, 590 (1978).
93. R. Reiner, H.-U. Siebeneick, I. Christensen, H. Döring, *J. Mol. Catal.*, **2**, 119 (1977).
94. J. Woodward, A. Wiseman, *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, **26**, 580 (1976).
95. V. P. Torchilin, A. V. Maksimenko, V. N. Smirnov, I. V. Berezin, A. M. Klibanov, K. Martinek, *Biochim. Biophys. Acta*, **522**, 277 (1978).
96. H. G. Khorana, *Chem. Rev.*, **53**, 145 (1953).
97. R. Reiner, H.-V. Siebeneick, I. Christensen, H. Lukas, *J. Mol. Catal.*, **1**, 3 (1975).
98. N. R. Perham, J. O. Thomas, *J. Mol. Biol.*, **62**, 415 (1971).
99. J. Carlsson, R. Axen, T. Unge, *Europ. J. Biochem.*, **59**, 567 (1975).
100. F. H. White, A. Sandoval, *Biochemistry*, **1**, 938 (1962).
101. L. Goldstein, Там же, **11**, 40 (1972).
102. H. Fasold, J. Klappenberger, C. Mayer, H. Remold, *Angew. Chem.*, **83**, 875 (1971).
103. B. A. Baird, G. G. Hammes, *J. Biol. Chem.*, **252**, 4743 (1977).
104. M. Kapoor, M. D. O'Brien, *Canad. J. Biochem.*, **55**, 43 (1977).
105. V. P. Torchilin, A. V. Maksimenko, V. N. Smirnov, I. V. Berezin, A. M. Klibanov, K. Martinek, *Biochim. Biophys. Acta*, **56**, 71 (1979).
106. R. E. Feeney, G. Blankenborn, H. B. F. Dixon, *Adv. Protein Chem.*, **29**, 135 (1975).
107. C. K. Glassmeyer, J. Ogle, *Biochemistry*, **10**, 786 (1971).
108. G. P. Royer, R. Uy, *J. Biol. Chem.*, **248**, 2627 (1973).
109. A. M. Klibanov, G. P. Samokhin, K. Martinek, I. V. Berezin, *Biochim. Biophys. Acta*, **438**, 1 (1976).
110. D. Gabel, *Europ. J. Biochem.*, **33**, 348 (1973).
111. M. Delaage, M. Lazdunski, Там же, **4**, 378 (1968).
112. D. Gabel, V. Kasche, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **48**, 1011 (1972).
113. K. Mosbach, S. Gestrelus, *FEBS Letters*, **42**, 200 (1974).
114. K. Martinek, A. M. Klibanov, V. S. Goldmacher, I. V. Berezin, *Biochim. Biophys. Acta*, **485**, 1 (1977).
115. К. Мартинек, А. М. Клибанов, И. В. Березин, Советско-американский семинар по иммобилизованным ферментам, М., 1975, стр. 100.
116. К. Мартинек, В. С. Гольдмахер, А. М. Клибанов, В. П. Торчилин, В. Н. Смирнов, И. В. Березин, ДАН СССР, **228**, 1468 (1976).
117. D. Jaworek, H. Botsch, J. Maier, *Methods in Enzymology*, **44**, 195 (1976).
118. В. С. Гольдмахер, А. М. Клибанов, К. Мартинек, Вестник МГУ, Химия, **19**, 429 (1978).
119. К. Martinek, A. M. Klibanov, A. V. Tchernysheva, V. Mozhaev, I. V. Berezin, B. O. Glotov, *Biochim. Biophys. Acta*, **485**, 13 (1977).
120. К. Мартинек, А. В. Чернышева, А. М. Клибанов, И. В. Березин, ДАН СССР, **223**, 233 (1975).
121. А. А. Клесов, В. Ю.-К. Шведас, в кн. Иммобилизованные ферменты и биоорганический катализ (серия Итоги науки и техники), ред. В. Л. Кретович, И. В. Березин, т. 12, ВИНТИ, М., 1978.
122. H. Morawetz, *Macromolecules in Solution*, Intersci., N. Y., 1965.
123. K. F. O'Driscoll, *Adv. Biochem. Eng.*, **4**, 155 (1976).
124. R. A. Messing, *Process Biochem.*, **9**, 26 (1974).
125. A. M. Filbert, W. P. Pitcher, Там же, **11**, 3 (1976).
126. I. V. Berezin, A. M. Klibanov, G. P. Samokhin, V. S. Goldmacher, K. Martinek, *Methods in Enzymology*, **44**, 558 (1976).

127. В. П. Торчилин, В. С. Гольдмахер, А. М. Клибанов, К. Мартинек, И. В. Березин, Советско-американский симпозиум по химии и физике белков, Сборник докладов, Рига, 1976, стр. 116.
128. T. M. S. Chang, *Artificial Cells*, Thomas Publ., Springfield-Illinois, 1972.
129. R. A. Messing, *Methods in Enzymology*, 44, 148 (1976).
130. О. М. Полторак, Е. С. Чухрай, Физико-химические основы ферментативного катализа, «Высшая школа», М., 1974, гл. 14.
131. S. N. Pennington, H. D. Brown, A. B. Patel, C. O. Knowles, *Biochim. Biophys. Acta*, 167, 479 (1968).
132. S. N. Pennington, H. D. Brown, A. B. Patel, S. K. Chattopadhyay, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2, 443 (1968).
133. K. F. O'Driscoll, *Methods in Enzymology*, 44, 169 (1976).
134. В. С. Гольдмахер, Канд. дисс., МГУ, 1977.
135. *Biological Structure and Function*, ed. T. W. Goodwin, O. Cinberg, v. 2. Acad. Press, London — N. Y., 1961.
136. A. L. Lehninger, *Biochemistry*, Worth Publishers, N. Y., 1972, chapt. 18.
137. M. Edidin, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 3, 179 (1974).
138. D. Wallach, *J. Gen. Physiol.*, 54, 3 (1969).
139. E. W. Chapelle, E. Rich, N. H. MacLeod, *Science*, 155, 1287 (1967).
140. T. Morigome, H. Kasai, T. Okuyama, *J. Biochem.*, 75, 299 (1974).
141. Z. Schneider, A. Stroinski, J. Pawelkiewicz, *Bull. Acad. Polon. Sci., Ser. Sci. Biol.*, 16, 203 (1968).
142. D. R. Norris, J. Pawelkiewicz, *Phytochemistry*, 14, 1701 (1975).
143. В. С. Гольдмахер, А. М. Клибанов, А. А. Мишин, В. В. Можаяев, К. Мартинек, Вестник МГУ, Химия, 19, 358 (1978).
144. К. Мартинек, В. С. Гольдмахер, А. А. Мишин, В. П. Торчилин, В. Н. Смирнов, И. В. Березин, ДАН СССР, 239, 277 (1978).
145. *Electrophoresis and Isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel*, ed. R. C. Allen, H. R. Maurer, DeGruyter, Berlin — N. Y., 1974.
146. M. L. White, *J. Phys. Chem.*, 64, 1563 (1960).
147. J. Gressel, A. W. Robards, *J. Chromatogr.*, 144, 455 (1975).
148. I. V. Berezin, A. M. Klibanov, V. S. Goldmacher, K. Martinek, *Methods in Enzymology*, 44, 571 (1976).
149. K. Martinek, V. S. Goldmacher, A. M. Klibanov, I. V. Berezin, *FEBS Letters*, 51, 152 (1975).
150. B. Obrink, T. C. Laurent, *J. Biochem.*, 41, 83 (1974).
151. J. Gryszkiewicz, *Folia Biol*, 19, 119 (1971).
152. J. E. Dixon, F. E. Stolzenbach, J. A. Berenson, N. O. Kaplan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 52, 905 (1973).
153. Y. Levin, M. Pecht, L. Goldstein, E. Katchalski, *Biochemistry*, 3, 1905 (1964).
154. L. Goldstein, Y. Levin, E. Katchalski, Там же, 3, 1913 (1964).
155. А. Стрельцова, В. Ю.-К. Швядас, А. В. Максименко, А. А. Клесов, Е. Е. Браудо, В. Б. Толстогозов, И. В. Березин, Биоорг. химия, 1, 1464 (1975).
156. M. L. Barnard, K. J. Laidler, *Arch. Biochem. Biophys.*, 44, 338 (1953).
157. Ю. И. Хургин, В. Я. Росляков, Ю. М. Азизов, Е. Д. Каверзнева, Изв. АН СССР, сер. хим., 1968, 2840.
158. F. A. Bettelheim, A. Lukton, *Nature*, 198, 357 (1963).
159. F. A. Bettelheim, P. Senatore, *J. chim. phys. et phys.-chim. biol.*, 61, 105 (1964).
160. D. H. Rammner, in *Dimethyl Sulfoxide*, ed. S. W. Jacob, E. E. Rosenbaum, D. C. Wood, v. 1, Marcel Dekker, N. Y., 1971, p. 189.
161. Ю. М. Азизов, И. В. Зверинская, А. Н. Никитина, В. Я. Росляков, Ю. И. Хургин, Изв. АН СССР, сер. хим., 1968, 2843.
162. A. A. Klyosov, N. V. Viet, I. V. Berezin, *Europ. J. Biochem.*, 59, 3 (1960).
163. J. P. Hutton, J. G. Wetmur, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 66, 942 (1975).
164. L. B. Lachman, R. E. Handschumacher, Там же, 73, 1094, (1974).
165. H. H. Weetall, W. P. Vann, *Biotechnol. Bioeng.*, 18, 105 (1976).
166. S. I. Case, R. F. Baker, *Anal. Biochem.*, 64, 477 (1975).
167. P. Elödi, *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, 20, 311 (1961).
168. T. Barth, K. Jošt, I. Rychlik, *Cell. Czech. Chem. Commun.*, 38, 2011 (1973).
169. C. Horvath, *Biochim. Biophys. Acta*, 358, 164 (1974).
170. T. Inagami, J. M. Stratevant, Там же, 38, 64 (1960).
171. В. В. Мосолов, П. В. Афанасьев, М. С. Долгих, Е. В. Лушникова, Биохимия, 33, 1030 (1968).
172. K. H. Tan, R. Lovrien, *J. Biol. Chem.*, 247, 3278 (1972).
173. K. Tanizawa, M. L. Bender, Там же, 249, 2130 (1974).
174. H. Wan, C. Horvath, *Biochim. Biophys. Acta*, 410, 135 (1975).
175. J. S. Myers, W. B. Jakoby, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 51, 631 (1973).
176. G. Z. Hussain, T. F. Newcomb, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 115, 301 (1963).

177. *M. Castaneda-Agullo, L. M. DelCastillo, J. Gen. Physiol.*, **42**, 617 (1959).
178. *B. H. J. Bielski, S. Freed, Biochim. Biophys. Acta*, **89**, 314 (1964).
179. *T. Tosa, T. Mori, I. Chibata, Enzymologia*, **40**, 49 (1971).
180. *R. G. Ingalls, R. G. Squires, L. G. Butler, Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 1627 (1975).
181. *А. М. Клибанов, А. Н. Семенов, Г. П. Самохин, К. Мартинек, Биорг. химия*, **4**, 82 (1978).
182. *К. Мартинек, А. М. Клибанов, Г. П. Самохин, А. Н. Семенов, И. В. Березин, Там же*, **3**, 696 (1977).
183. *К. Мартинек, А. В. Левашов, Н. Л. Клячко, И. В. Березин, ДАН СССР*, **236**, 920 (1977).
184. *A. Ray, Nature*, **231**, 313 (1971).
185. *C. Tanford, The Hydrophobic Effect, Wiley, N. Y.*, 1973.
186. *C. Tanford, C. E. Buckley, P. K. De, E. P. Lively, J. Biol. Chem.*, **237**, 1168 (1962).
187. *T. T. Herskovits, B. Gadegbeku, H. Jaillet, Там же*, **245**, 2588 (1970).
188. *Л. М. Гинодман, Биохимия*, **19**, 666 (1954).
189. *L. Butler, R. Squires, Enzyme Technol. Digest*, **4**, 108 (1975).
190. *C. Schwabe, Biochemistry*, **8**, 795 (1969).
191. *S. J. Kelly, L. G. Butler, R. G. Squires, Enzyme Technol. Digest*, **5**, 107 (1976).
192. *J. F. Brandts, in Structure and Stability of Biological Macromolecules, eds. S. H. Timasheff, G. D. Fasman, p. 213, M. Dekker, New York, 1969.*
193. *J. T. Davies, E. K. Rideal, Interfacial Phenomena, Acad. Press, N. Y.*, 1961.
194. *J. R. Scholtens, B. H. Bijsterbosch, FEBS Letters*, **62**, 233 (1976).
195. *F. Cremonesi, G. Carrea, L. Ferrara, E. Antonini, Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 1101 (1975).
196. *B. C. Buckland, P. Dunnill, M. D. Lilly, Там же*, **17**, 815 (1975).
197. *А. М. Клибанов, Г. П. Самохин, К. Мартинек, И. В. Березин, Там же*, **19**, 211 (1977).
198. *V. Z. Raj Bhandary, R. J. Young, H. G. Khorana, J. Biol. Chem.*, **239**, 3875 (1964).
199. *E. V. Dehmlow, Angew. Chem., Int. Ed.*, **13**, 170 (1974).
200. *K. Martinek, A. A. Klyosov, I. V. Berezin, Int. J. Chem. Kin.*, **6**, 801 (1974).
201. *F. H. Carpenter, J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 1111 (1960).
202. *K. Martinek, A. K. Yatsimirski, A. P. Osipov, I. V. Berezin, Tetrahedron*, **29**, 963 (1973); *Там же*, **31**, 709 (1975).
203. *K. Shinoda, T. Nakagawa, B. I. Tamamushi, T. Isemura, Colloidal Surfactants, Acad. Press, N. Y.—London*, 1963.
204. *J. H. Fendler, E. J. Fendler, Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems, Acad. Press, N. Y.*, 1975.
205. *Micellization, Solubilization and Microemulsions, ed. K. Mittal, Plenum Press, N. Y.*, 1977.
206. *А. В. Левашов, В. Пантин, К. Мартинек, Коллоидн. журн.*, **41**, 453 (1979).
207. *M. R. Pollock, The Bacteria*, **4**, 158 (1962).
208. *S. M. Snaith, G. A. Levy, A. J. Hay, Biochem. J.*, **117**, 129 (1970).
209. *K. Shimada, Y. Sugino, Biochim. Biophys. Acta*, **185**, 367 (1969).
210. *J. C. Luday, J. N. Aronson, Там же*, **191**, 397 (1969).
211. *H. Neurath, I. P. Greenstein, F. W. Putnam, J. O. Frickson, Chem. Rev.*, **34**, 157 (1944).
212. *M. Yeshine, J. Biochem.*, **68**, 321 (1970).
213. *M. Shimizu, T. Suzuki, K. Kamed, Y. Abiko, Biochim. Biophys. Acta*, **191**, 550 (1969).
214. *J. H. Fox, W. N. Kelley, J. Biol. Chem.*, **246**, 5739 (1971).
215. *M. R. Deutscher, Там же*, **247**, 450 (1972).
216. *M. B. Lee, C. D. Bolger, C. M. Bridges, Biochim. Biophys. Acta*, **242**, 226 (1971).
217. *K. Ogasahara, A. Imanishi, T. Isemura, J. Biochem.*, **67**, 83 (1970).
218. *S. Y. Gerlisma, Там же*, **14**, 150 (1970).
219. *J. Kyte, J. Biol. Chem.*, **246**, 4157 (1971).
220. *A. Fernandez-Sorensen, D. M. Carlson, Там же*, **246**, 3485 (1971).
221. *Y. Takeda, S. Hizukuri, Biochim. Biophys. Acta*, **268**, 175 (1972).
222. *H. George, J. McMahan, J. Bowler, M. Elliott, Там же*, **191**, 719 (1969).
223. *K. Ono, M. Nozaki, O. Hayashi, Там же*, **220**, 224 (1970).
224. *H. Dutler, M. J. Coon, A. Kull, H. Vogel, G. Waldvogel, V. Prelog, Europ. J. Biochem.*, **22**, 203 (1971).
225. *P. H. Von Hippel, K.-Y. Wong, Science*, **145**, 577 (1964).

Химический факультет

Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова: