

## УСПЕХИ ХИМИИ

ВЫПУСК 4

АПРЕЛЬ — 1984

ТОМ LIII

МОСКВА

ЖУРНАЛ ОСНОВАН В 1932 ГОДУ  
ВЫХОДИТ 12 РАЗ В ГОД

УДК 661.185.1 + 547.96 + 541.128.135 + 542.98

**МИКРОГЕТЕРОГЕННАЯ СРЕДА ДЛЯ ХИМИЧЕСКИХ  
(ФЕРМЕНТАТИВНЫХ) РЕАКЦИЙ НА ОСНОВЕ  
КОЛЛОИДНОГО РАСТВОРА ВОДЫ В ОРГАНИЧЕСКОМ  
РАСТВОРИТЕЛЕ**

*Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Л.,  
Мартинек К.*

Рассмотрены строение и свойства обращенных мицелл поверхностно-активных веществ в неполярных растворителях. Охарактеризованы методы солюбилизации белков (ферментов) в таких системах и молекулярные механизмы солюбилизации. Обсуждены кинетические закономерности протекания химических и ферментативных реакций в системах обращенных мицелл. Проанализированы факторы, влияющие на катализическую активность и субстратную специфичность солюбилизованных ферментов. Рассмотрены закономерности сдвига химического равновесия в системах обращенных мицелл. Обсуждены перспективы использования систем обращенных мицелл для фундаментальных исследований (в частности для моделирования структуры и функции биологических мембран) и для решения прикладных задач в химии.

Библиография — 132 ссылки.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	545
II. Физико-химические свойства обращенных мицелл	547
III. Методика включения белка (ферментов) в обращенные мицеллы	549
IV. Кинетическая теория химических реакций в системах обращенных мицелл	551
V. Катализическая активность солюбилизованных ферментов	554
VI. Субстратная специфичность солюбилизованных ферментов	557
VII. Регулирование химического равновесия в системах обращенных мицелл	558
VIII. Моделирование структуры и функции биологических мембран	559
IX. Прикладные аспекты мицеллярной энзимологии	561

## I. ВВЕДЕНИЕ

Важнейшими элементами при проведении химического процесса является выбор реакционной среды и катализатора. Лучшими на сегодняшний день катализаторами химических реакций являются ферменты. Их исключительно высокая катализическая активность в **мягких условиях** и непревзойденная селективность действия [1] открывают широкие перспективы для использования биокатализа в технологических процессах [2]. Особенно перспективным представляется применение ферментов как катализаторов в тонком органическом синтезе, при получении лекарственных препаратов и ценных биологически активных соединений. Однако широкому использованию ферментов на практике мешает то обстоятельство, что они сохраняют свои уникальные катализитические свойства обычно лишь в водном растворе. В то же время из-

вестно, что многие химические реакции термодинамически направлены в сторону желаемого продукта лишь в определенных органических растворителях. Это связано как со специфическими сольватационными эффектами, так и с растворимостью отдельных компонентов реакции или, в других случаях, с тем, что наряду с нужным продуктом образуется вода, и следовательно, при проведении реакции в водных растворах равновесие сдвинуто в сторону исходных веществ. К сожалению, переход от воды как среды реакции к органическому растворителю сопровождается, как правило, либо полной денатурацией фермента, либо резким падением его катализитической активности и исчезновением субстратной специфичности [3].

Один из возможных выходов в такой ситуации — это создание органиорасторимых модельных катализитических систем, позволяющих в той или иной мере приблизиться к эффективности катализа ферментами в водных растворах. В качестве таких модельных систем могут быть использованы, в частности, системы обращенных мицелл поверхностноактивных веществ (ПАВ) в органических растворителях. Обращенные мицеллы представляют собой замкнутые ассоциаты молекул ПАВ, внешний слой которых образован углеводородными фрагментами этих молекул, а ядро — их полярными (ионными) группами. Такие ассоциаты способны солюбилизовать в органических растворителях значительные количества полярных соединений, которые локализуются во внутренней полости (ядре) мицеллы.

Уникальные свойства микросреды внутренней полости обращенных мицелл — пониженная полярность, высокая микровязкость, большая концентрация функциональных групп — дают основание рассматривать внутреннюю полость обращенных мицелл как весьма реалистичную модель микросреды активного центра ферментов [4, 5]. Действительно, многие реакции значительно ускоряются при проведении их в системах обращенных мицелл, причем эффекты ускорения по порядку величины иногда приближаются к наблюдаемым в ферментативном катализе [6]. Ускорение реакций в системах обращенных мицелл обусловлено, помимо тривиальных эффектов концентрирования реагентов за счет связывания с мицеллами и эффектов микросреды внутренней полости, жесткой фиксацией молекул реагентов во внутренней полости мицелл [6, 7], как это имеет место при катализе ферментами [1]. При катализе обращенными мицеллами могут наблюдаться также характерные для ферментативного катализа эффекты специфичности по отношению к размерам [8] и конфигурации [9] молекул реагентов.

Следует отметить, что эффекты ускорения и специфичности, сравнимые по величине с наблюдаемыми при катализе ферментами, в системах обращенных мицелл проявляются лишь в отдельных случаях и не носят общего характера. Поэтому более перспективен путь, который позволил бы непосредственно соединить преимущества фермента как катализатора с преимуществами органического растворителя как реакционной среды. Суть такого подхода состоит в том, чтобы «заставить» ферменты работать в среде органического растворителя с низким содержанием воды. Очевидно, что для реализации этого подхода необходимо решить задачу стабилизации фермента по отношению к денатурирующему воздействию органического растворителя [3].

Данная задача в принципе может быть решена при использовании в качестве реакционной среды системы «вода—несмешивающийся с водой органический растворитель» или органического растворителя, обеспечивающего сохранность нативной структуры ферментной глобулы и, тем самым, ее катализитической активности [10]. Недавно было найдено иное решение проблемы. А именно, нами было показано [11], а затем нашло подтверждение в работах других исследователей (которые обсуждаются ниже), что водорастворимые ферменты можно солюбилизовать в органических растворителях с помощью ПАВ и сохранить при этом их катализитическую активность. В результате солюбилизации фермент включается во внутреннюю полость обращенной мицеллы ПАВ,

как это показано на рис. 1, и таким образом оказывается защищенным от денатурирующего воздействия органического растворителя.

Рассмотрим основные аспекты и достижения этого нового направления — мицеллярной энзимологии, позволяющей использовать биокатализаторы для ускорения химических реакций в среде органического растворителя.

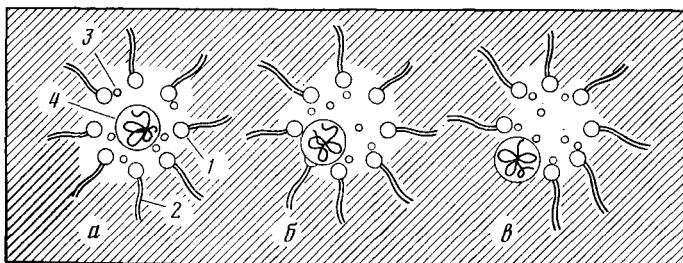


Рис. 1. Схематическое изображение обращенной мицеллы, содержащей гидрофильный (а), поверхностно-активный (б) и гидрофобный (в) белок; 1 — ионная (полярная), 2 — углеводородная группа в молекуле ПАВ, 3 — противоионы и/или солюбилизованные молекулы воды, 4 — молекула фермента; заштрихован органический растворитель

## II. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛ

*Структура обращенных мицелл.* Обращенные мицеллы в неполярных органических растворителях представляют собой ассоциаты молекул ПАВ, внутренняя часть которых образована полярными «головами», а внешний слой — углеводородными «хвостами» этих молекул. Процесс мицеллообразования в неполярной среде может быть описан [12] в одних случаях в рамках модели действия масс, предполагающей существование равновесия между мономерными молекулами ПАВ и мицеллами по типу «все или ничего», в других случаях — ступенчатой моделью, согласно которой в растворе присутствует набор ассоциатов с различным числом агрегации, находящихся в равновесии друг с другом.

Размер и форма обращенных мицелл тесно связаны с механизмом мицеллообразования: в случае механизма действия масс мицеллы имеют форму, близкую к сферической, в то время как в случае ступенчатого механизма преобладают вытянутые стержнеобразные и ламеллярные структуры [13]. Линейные размеры мицелл не превышают обычно нескольких десятков ангстрем. Мицеллы, которые образуются по механизму действия масс, характеризуются обычно узким распределением по размерам и форме, не зависящим от концентрации ПАВ [14–16]; эта закономерность распространяется главным образом на системы с анионными ПАВ. В случае ПАВ, ассоциирующих по ступенчатому механизму (как правило, это катионные ПАВ), мицеллы являются полидисперсными, причем распределение сдвигается в сторону более крупных ассоциатов с увеличением концентрации ПАВ [13, 17, 18].

При солюбилизации воды в растворах ПАВ в неполярных растворителях образуются гидратированные мицеллы, которые по размерам и форме существенно отличаются от мицелл, существующих в безводных системах. Гидратация мицелл приводит к уменьшению степени их асимметричности, так что они приобретают почти сферическую форму [19, 20], и к резкому увеличению их размера и молекулярной массы за счет образования внутри обращенной мицеллы заполненной водой микрополости [16, 19–23]. Так например, в системе обращенных мицелл, образованных натриевой солью динзооктилового эфира сульфоянтарной кислоты (аэрозоль ОТ или АОТ), в изооктане увеличение степени гидратации, т. е. молярного соотношения  $[H_2O]/[AOt]$  от 0 до 50 приводит к возрастанию гидродинамического радиуса мицелл от 17 до 120 Å [22].

*Микросреда внутренней полости обращенных мицелл.* Вода, заполняющая внутреннюю полость гидратированных обращенных мицелл, отличается по своим физико-химическим свойствам от обычной (объемной) воды. Масштаб различий определяется степенью гидратации обращенных мицелл, которая обычно выражается в виде отношения молярных концентраций  $[H_2O]/[PAB] = w_0$ . При малых значениях  $w_0$  (порядка нескольких единиц) свойства мицеллярной и объемной воды сильно различаются, однако по мере увеличения  $w_0$  эти различия постепенно сглаживаются. Причина состоит в том, что первые порции добавляемой в систему воды прочно связываются молекулами ПАВ за счет гидратации полярных частей этих молекул. Количество прочно связанной воды составляет 4–10 молекул на молекулу ПАВ в зависимости от природы последнего. Так называемая «свободная» вода, образующая самостоятельную микрофазу и приближающаяся по своим свойствам к объемной воде, появляется внутри обращенных мицелл только после завершения гидратации ПАВ [20, 24, 25]. Например, при малых значениях  $w_0$  вязкость воды, солюбилизованной обращенными мицеллами АОТ в алифатическом углеводороде, превышает вязкость объемной воды более чем в 200 раз, а ее полярность соответствует полярности хлороформа; при увеличении  $w_0$  эти различия в свойствах мицеллярной и объемной воды монотонно уменьшаются и исчезают [25, 26].

Водная полость гидратированных обращенных мицелл неоднородна по своим физико-химическим свойствам и характеризуется в различных точках разными значениями локальной полярности, вязкости и т. д. [20, 26, 27]. Например, локальные значения вязкости и полярности воды в полости гидратированных обращенных мицелл АОТ в изооктане соответственно уменьшаются и возрастают при движении от границы водной полости к ее центру [26]. Существование неоднородности объясняется наличием внутри мицеллы слоев гидратационной воды различной степени «связанности» [20, 26, 27].

*Значения pH внутренней полости обращенных мицелл.* Внутренняя полость гидратированных обращенных мицелл характеризуется высокой концентрацией электрических зарядов, возникающих при ионизации полярных групп в молекулах ПАВ. Вследствие этого локальное значение pH водной полости может существенно отличаться от величины pH солюбилизируемого водного раствора [28–32]. Вопрос о величине pH приобретает особое значение при изучении химических (и тем более ферментативных) реакций, протекающих во внутренней полости обращенных мицелл.

Для оценки кислотно-основных свойств микросреды внутренней полости обращенных мицелл наиболее широко используется метод, основанный на сравнении наблюдаемых значений  $pK_a$  различных индикаторов, растворенных в чистой воде и солюбилизованных обращенными мицеллами [29–32]. Анализ данных, полученных с помощью индикаторного метода, позволяет сделать вывод, что микросреда внутренней полости обращенных мицелл является в общем более кислой по сравнению с исходным водным раствором в случае анионного ПАВ [29, 30], и более щелочной – в случае катионного [32]. Сдвиг pH составляет ~1–2 единицы. При использовании ионного ПАВ кислотность внутренней полости мицелл практически не отличается от кислотности исходного водного раствора [31].

Недавно был предложен новый подход к определению pH внутренней полости обращенных мицелл, в котором используется зависимость химического сдвига сигнала ЯМР ядра  $^{31}P$ , входящего в состав фосфат-аниона, от pH окружающей среды [28, 33]. С помощью этого метода была получена связь между значениями pH водной полости обращенных мицелл АОТ в изооктане и исходного водного раствора («шкала кислотности») [28]. Определенные таким образом величины сдвига pH согласуются с полученными индикаторным методом [29, 30].

Оба описанных подхода имеют, однако, существенные недостатки. В частности, величина  $pK_a$  солюбилизованной «репортерной» молекулы (индикатора или фосфат-аниона) не может быть определена независимо, что приводит к необходимости принятия соответствующих допущений, и следовательно, к неопределенности получаемого значения  $pH$ .

*Реакционная способность воды, солюбилизованной обращенными мицеллами.* Скорость химических реакций с участием воды, как правило, резко возрастает при переходе от водного раствора к системе гидратированных обращенных мицелл, причем эффект ускорения может достигать  $10^6$  и более раз [5, 34, 35]. Эффект ускорения в значительной мере обусловлен высокой реакционной способностью воды, солюбилизованной во внутренней полости обращенных мицелл, где протекает реакция. Например, нуклеофильная активность воды, солюбилизованной обращенными мицеллами АОТ, по крайней мере в  $10^3$  раз выше, чем воды объемной [5, 35]. Наибольшей реакционной способностью обладает вода, либо участвующая в гидратации полярных групп в молекуле ПАВ [5, 36], либо появляющаяся непосредственно после завершения гидратации [35]. Дальнейшее добавление воды приводит к образованию водородных связей между самими молекулами воды, в результате чего их реакционная способность снижается [36]. Высокая реакционная способность молекул воды, участвующих в первоначальной гидратации ПАВ, может быть обусловлена их высокой подвижностью и/или изменением их кислотно-основных характеристик [5].

### III. МЕТОДИКА ВКЛЮЧЕНИЯ БЕЛКА (ФЕРМЕНТОВ) В ОБРАЩЕННЫЕ МИЦЕЛЛЫ

Гомогенные (оптически прозрачные) растворы белков (ферментов) в органических растворителях можно получить, используя один из трех следующих способов.

Первый способ был предложен нами [11] и в настоящее время наиболее широко используется [37–44]. В раствор ПАВ в органическом растворителе вносится небольшое количество (порядка нескольких объемных процентов) водного раствора белка (конкретное значение соотношения объемов водного и органического растворов определяется задачей эксперимента, величиной требуемой степени гидратации ПАВ и т. п.). Полученную смесь энергично встряхивают (десятки секунд) до образования оптически прозрачного раствора. Вместо механического встряхивания используется также обработка смеси ультразвуком [45, 46]. Следует подчеркнуть, что выбор метода перемешивания имеет важное значение при исследовании ферментов и особенно ферментативной кинетики в системах обращенных мицелл, поскольку от его эффективности зависит время достижения равновесия в коллоидной системе. Дело в том, что в некоторых случаях время достижения равновесия в системах обращенных мицелл (в отсутствие солюбилизованного белка) может измеряться часами и десятками часов (см., например, [47, 48]).

Время установления равновесия в растворах ПАВ, по-видимому, и немалой степени зависит от природы ПАВ и/или растворителя. Для растворов одного из наиболее широко используемых ПАВ – аэрозоля ОТ (АОТ) – в алифатических углеводородах показано [22, 49], что равновесие ( достижение постоянных размеров мицелл) устанавливается быстро и нет необходимости использовать ультразвуковую обработку. К аналогичному выводу пришли и мы при использовании этого ПАВ для солюбилизации ферментов [50]. Вопрос о необходимости ультразвуковой обработки может, однако, возникнуть при использовании других ПАВ. При этом следует иметь в виду, что действие ультразвука может приводить к инактивации ферментов [51]. При солюбилизации водных растворов ферментов без применения ультразвука инактивации фермента практически не происходит [11, 41, 52, 53].

Второй способ, предложенный в лаборатории Менджера [54], состоит в том, что в раствор ПАВ в органическом растворителе сначала

вносят требуемое количество воды (для достижения желаемой степени гидратации ПАВ), а затем в полученном прозрачном растворе при энергичном встряхивании растворяют сухой (лиофилизованный) белок. Время, которое требуется для растворения сухого белка, обычно больше, чем при использовании водных растворов, но оно уменьшается при увеличении степени гидратации ПАВ [50]. Полное растворение навески сухого белка происходит лишь при умеренных концентрациях белка, сравнимых с получаемыми по первому способу [50].

Для получения высококонцентрированных растворов белка в раствор ПАВ в органическом растворителе вносят избыток сухого белка и нерастворившуюся (через несколько часов) его часть отделяют центрифугированием [50]. Повторная процедура растворения белка в полученном супернатанте приводит к повышению содержания белка в мицеллярном растворе. При использовании этого способа получения концентрированных растворов белка необходим контроль за содержанием ПАВ и воды в супернатанте после отделения нерастворимой части, поскольку в нее могут захватываться как ПАВ, так и вода.

*Третий способ* солюбилизации, предложенный Луизи с сотр. [55, 56], — самопроизвольный перенос белка в двухфазной системе, состоящей из примерно равных объемов водного раствора белка и органического растворителя, содержащего ПАВ. После завершения солюбилизации, проводимой при слабом перемешивании или вовсе без перемешивания, органическую фазу, содержащую растворенный белок, отделяют. Недостатком этого метода является большая длительность процесса солюбилизации. Кроме того, возникает проблема определения количества воды, солюбилизованной мицеллами (степени гидратации ПАВ).

Обратим внимание на то обстоятельство, что при очень малых значениях  $w_0 < 1 \div 2$  белки практически нерастворимы в системах обращенных мицелл. Солюбилизация белка начинается лишь при некотором значении  $w_0$ , после которого с увеличением степени гидратации ПАВ растворимость белка почти линейно возрастает вплоть до концентраций, сопоставимых по величине с достижимыми в водном растворе [50]. Конкретные значения пределов солюбилизации зависят от температуры, величины рН водного раствора, природы ПАВ, концентрации воды и ПАВ в системе, а также от природы белка [41, 50].

*Молекулярные механизмы включения белка в обращенные мицеллы.* Обращенные мицеллы в органических растворителях предоставляют уникальную в методологическом отношении возможность растворять белки различной природы в таких стандартных условиях, при которых молекула растворяемого белка может сама «выбрать» соответствующее ее природе (оптимальное с точки зрения термодинамики) микроокружение. В самом деле, как видно из схематического рис. 1, *a*, молекула гидрофильного белка может избежать прямого контакта как с органическим растворителем, так и с поверхностью внутренней полости обращенной мицеллы, образованной полярными «головами» молекул ПАВ, локализуясь в водном ядре гидратированной обращенной мицеллы. Поверхностно-активные ферменты, например, липазы, имеют возможность взаимодействовать с поверхностным слоем обращенной мицеллы или даже частично в него погружаться (рис. 1, *b*). Наконец, типичные мембранные ферменты, если это термодинамически выгодно, в принципе могут вступать в контакт и с органическим растворителем (рис. 1, *c*).

В литературе описаны примеры солюбилизации обращенными мицеллами ферментов различной природы, соответствующих типам *a* [11, 37–45, 52–59], *b* [60, 61] и *c* [46, 62] (рис. 1). Во всех случаях в результате солюбилизации образуется оптически прозрачный раствор, а солюбилизованные ферменты сохраняют каталитическую активность. В количественном отношении изучен [38, 63, 64] лишь молекулярный механизм солюбилизации белков (ферментов) типа *a* (рис. 1), т. е. водорастворимых. В частности, методом седиментационного анализа показано [63, 64], что молекулы типичных водорастворимых белков (ли-

зоцим, трипсин,  $\alpha$ -химотрипсин, овальбумин, алкогольдегидрогеназа,  $\gamma$ -глобулин) в широком диапазоне экспериментальных условий способны встраиваться в обращенные мицеллы АОТ в октане без существенного изменения первоначальных размеров мицеллы. Этот результат согласуется со схемой рис. 1, а и свидетельствует об отсутствии специфических взаимодействий белка с ПАВ.

#### IV. КИНЕТИЧЕСКАЯ ТЕОРИЯ ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ В СИСТЕМАХ ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛ

Скорость многих химических реакций резко возрастает при перенесении их из водной среды или среды органического растворителя в системы органический растворитель — ПАВ или органический растворитель — ПАВ — вода (см. обзоры [6, 24, 65]). При обсуждении эффектов ускорения реакций термин «мицеллярный катализ» (ставший общепринятым для водных систем) следует, однако, использовать с осторожностью, поскольку увеличение скорости реакций в присутствии ПАВ в органических растворителях далеко не всегда обусловлено мицеллярными эффектами [66]. В некоторых случаях обращенные мицеллы вообще не образуются и ускорение может достигаться за счет гомогенно-каталитического действия мономерных молекул ПАВ [66].

Анализ имеющихся к настоящему времени многочисленных экспериментальных данных позволяет сделать вывод, что в тех случаях, когда ускорение имеет действительно мицеллярную природу, оно может быть вызвано действием факторов, аналогичных тем, которые обеспечивают [67, 68] увеличение скорости реакций в водных мицеллярных системах. А именно, ускорение может быть обусловлено эффектами концентрирования реагентов за счет связывания с мицеллами, каталитическим действием полярных групп молекул ПАВ, жесткой фиксацией и/или ориентацией молекул реагентов во внутренней полости мицелл, а также особенностями микросреды внутренней полости обращенных мицелл, где протекает реакция (пониженная диэлектрическая проницаемость, повышенная реакционная способность воды, сдвиг  $pK_a$  ионных групп взаимодействующих молекул).

При кинетическом анализе химических реакций в системе обращенных мицелл в первую очередь необходим учет распределения реагентов в этой микрогетерогенной среде. Аналогичная задача для мицеллярного катализа в водных растворах уже нашла [67, 68] адекватное решение в рамках псевдофазной модели. Псевдофазный подход может быть также использован при изучении кинетических закономерностей химических реакций в системах обращенных мицелл.

Согласно псевдофазной модели [69], раствор ПАВ состоит из объемной фазы органического растворителя и мицеллярной «фазы», причем имеет место равновесное распределение реагентов между этими фазами, например,



где  $P_A$  — коэффициент распределения реагента A:

$$P_A = [A]_{\text{миц}} / [A]_{\text{об}} \quad (2)$$

Здесь и далее индексы «миц» и «об» относятся соответственно к мицеллярной и объемной фазам. Представление о совокупности мицелл как о самостоятельной «сплошной» фазе согласуется с экспериментальными данными, указывающими на свободный характер межмицеллярного обмена солюбилизованными молекулами [45, 70–74]. Применимость псевдофазной модели ограничивается допущением, согласно которому равновесное распределение реагентов между фазами (1) не смещается вследствие протекания химической реакции, т. е. обмен веществом между фазами осуществляется достаточно быстро (с диффузионными скоростями). Это допущение, справедливое для случая нормальных ми-

целл ПАВ в водных растворах [68], остается в силе и при переходе к системам обращенных мицелл [75–78]. Рассмотрим приложение псевдофазного подхода для анализа химических реакций различных типов, протекающих в системах обращенных мицелл.

*Реакции первого порядка.* В рамках псевдофазной модели реакции первого порядка описываются схемой:



где  $k_{\text{об}}$  и  $k_{\text{миц}}$  – истинные константы скорости превращения А в объемной и мицеллярной фазах соответственно, а коэффициент распределения  $P_A$  дается уравнением (2). В условиях, когда  $[\text{ПАВ}] \gg [\text{A}]$ , выражение для эффективной константы скорости имеет вид [67, 68]:

$$k_{\text{набл}} = (k_{\text{об}} + k_{\text{миц}} P_A c V) / (1 + P_A c) \quad (4)$$

где  $c$  – концентрация, за вычетом критической концентрации мицеллообразования (ККМ),  $V$  – мольный объем ПАВ, и объемная доля мицеллярной фазы  $cV \ll 1$ . Из уравнения (4) следует, что зависимость  $k_{\text{набл}}$  от  $c$  имеет вид кривой с насыщением, что действительно наблюдается на опыте [4, 5, 79–81]. Предельное значение  $k_{\text{набл}}$  равно  $k_{\text{миц}}$  и характеризует истинную реакционную способность реагента А в мицеллярной среде.

*Реакции второго порядка.* Кинетический анализ реакции второго порядка  $\text{A} + \text{B} \xrightarrow{k_{\text{набл}}} \text{продукты}$ , протекающей в мицеллярной системе в условиях прочного связывания реагентов с мицеллами, приводит к следующему выражению для зависимости наблюдаемой константы скорости реакции от концентрации ПАВ [67, 68]:

$$k_{\text{набл}} = \frac{(k_{\text{миц}}/V) K_A K_B c + k_{\text{об}}}{(1 + K_A c)(1 + K_B c)} \quad (5)$$

где  $K_A = (P_A - 1)$ ,  $K_B = (P_B - 1)$ , а  $P_A \gg 1$  и  $P_B \gg 1$  – коэффициенты распределения реагентов А и В между фазами, определяемые в соответствии с уравнением (2). Согласно уравнению (5), зависимость  $k_{\text{набл}}$  от  $c$  должна иметь вид кривой с максимумом, что находится в соответствии с экспериментальными данными [82, 83]. Предложенные методы линеаризации экспериментальных кривых  $k_{\text{набл}} - c$  [67, 68] позволяют найти как истинную константу скорости ( $k_{\text{миц}}$ ) в мицеллярной среде, так и константы связывания.

В качестве общего замечания к уравнениям (4) и (5) необходимо подчеркнуть, что при изучении зависимости  $k_{\text{набл}}$  от  $c$  в рамках обсуждаемой модели варьирование концентрации ПАВ должно осуществляться таким образом, чтобы поддерживать постоянным соотношение  $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{ПАВ}]$ . Иными словами, изменение концентрации ПАВ должно всегда сопровождаться соответствующим изменением концентрации воды, и наоборот. В противном случае изменение  $c$  будет приводить к изменению свойств микросреды внутренней полости обращенных мицелл, где протекает реакция (см. гл. II), а следовательно, к изменению величины  $k_{\text{миц}}$  и искажению предсказываемого уравнениями (4) и (5) вида зависимости  $k_{\text{набл}}$  от  $c$ .

*Ферментативные реакции в системах обращенных мицелл.* Рассмотрим кинетику реакции между ферментом Е и субстратом S, протекающую по схеме Михаэлиса



в системе органический растворитель–вода–ПАВ. Будем считать, что установилось равновесное распределение субстрата между фазами:



где  $P_s$  – коэффициент распределения субстрата:

$$P_s = [S]_{\text{мид}} / [S]_0 \quad (8)$$

Распределение фермента учитывать не следует, поскольку белки практически не растворимы в гидрофобных растворителях [84]; кроме того, в неводных средах ферменты, как правило, денатурируют (см. обзор [85]). Поэтому будем полагать, что каталитическая активность сосредоточена лишь в мицеллярной фазе.

Скорость реакции (6), протекающей в мицеллах, отнесенную к объему всей системы, можно выразить (в начальный момент времени, когда концентрация продуктов мала по сравнению с начальной концентрацией субстрата, при избытке субстрата по отношению к ферменту и в стационарных условиях) в виде уравнения Михаэлиса–Ментен:

$$v = \frac{k_{\text{кат,мид}} [E]_0, \text{мид} [S]_0, \text{мид}}{K_{M, \text{мид}} + [S]_0, \text{мид}} \cdot \theta \quad (9)$$

где  $\theta$  – объемная доля мицеллярной фазы, а индекс 0 отражает начальные концентрации.

Допустим, что обмен молекулами субстрата между фазами осуществляется достаточно быстро, т. е. протекание ферментативной реакции (6) не нарушает равновесия (7). Тогда концентрации реагентов можно найти из уравнения (8) и уравнений материального баланса:

$$\begin{aligned} [S]_{0, \text{общ}} &= [S]_{0, \text{мид}} \theta + [S]_{0, 0.06} (1 - \theta) \\ [E]_{0, \text{общ}} &= [E]_{0, \text{мид}} \theta \end{aligned} \quad (10)$$

Следует, однако, помнить, что уравнение (8) справедливо лишь для достаточно разбавленных растворов, и следовательно, концентрации реагентов должны быть значительно ниже концентрации ПАВ.

После подстановки уравнений (8) и (10) в уравнение (9) имеем

$$v = \frac{k_{\text{кат,каж}} [E]_{0, \text{общ}} [S]_{0, \text{общ}}}{K_{M, \text{каж}} + [S]_{0, \text{общ}}} \quad (11)$$

где

$$k_{\text{кат,каж}} = k_{\text{кат,мид}} \quad (12)$$

$$K_{M, \text{каж}} = K_{M, \text{мид}} [1 + \theta (P_s - 1)] / P_s \quad (13)$$

В случае реакции с участием заряженного субстрата уравнение (13) можно упростить, предположив, что молекулы субстрата находятся только в водно-мицеллярной фазе, и следовательно, не только  $P_s \gg 1$ , но и  $P_s \theta \gg 1$ . Тогда

$$K_{M, \text{каж}} = K_{M, \text{мид}} \theta \quad (14)$$

Здесь рассмотрена лишь простейшая псевдофазная модель [52, 86, 87], которая предполагает равномерное распределение реагентов по всему объему гидратированных мицелл. В общем случае, конечно, модель должна быть более сложной и учитывать микрогетерогенность внутренней полости обращенных мицелл; в частности, можно было бы принять во внимание распределение субстрата между внутренним поверхностью слоем и водным ядром обращенной мицеллы. Тем не менее, даже простейшая модель и полученные в ее рамках уравнения позволяют успешно проводить кинетический анализ ферментативных реакций, протекающих в системах обращенных мицелл.

Для определения «истинных» параметров уравнения Михаэлиса, характеризующих ферментативную реакцию в водно-мицеллярной фазе, необходимо изучить зависимость наблюдаемой скорости ферментативной реакции от соотношения объемной (органический растворитель) и водно-мицеллярной фаз. При этом варьирование объемной доли водно-мицеллярной фазы ( $\theta$ ) должно осуществляться таким образом, чтобы

поддерживать постоянным соотношение  $\omega_0$ , т. е. чтобы не менять свойства самой водно-мицеллярной фазы (см. гл. II).

Справедливость уравнений (11)–(14) была подтверждена [52, 86, 87] на примере катализируемой трипсином реакции гидролиза *n*-нитроанилида N-бензоил-D, L-аргинина, протекающей в системе обращенных мицелл бромистого цетилtrimетиламмония в смеси хлороформ — октан (1 : 1). Зависимость наблюдаемых кинетических параметров этой реакции ( $K_{M, \text{каж}}$  и  $k_{\text{кат,каж}}$ ) от объемной доли воды в системе показана на рис. 2. Видно, что действительно можно реализовать условия (при малых  $\theta$ ), когда согласно уравнению (14) наблюдаемая величина  $K_{M, \text{каж}}$  лучше (меньше) величины  $K_M$  в водном растворе (показана на рис. 2

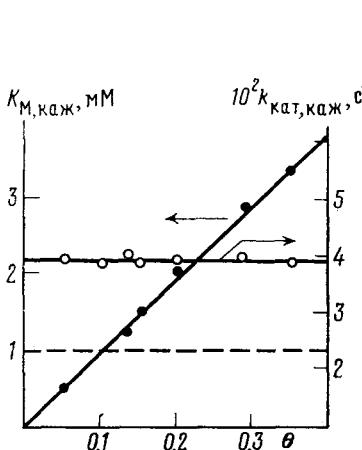


Рис. 2

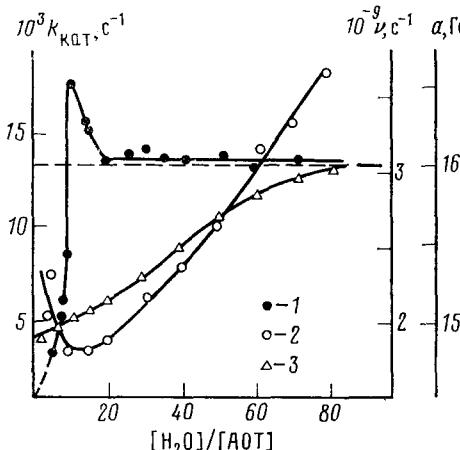


Рис. 3

Рис. 3. Гидролиз *n*-нитроанилида N-бензоил-D,L-аргинина, катализируемый трипсином, солюбилизованным в системе бромистый цетилtrimетиламмоний — водный буфер (0,02 М фосфат — борат — ацетат, pH 8,0) — смесь хлороформа с октаном (1 : 1) [86]. Михаэлисовские параметры  $K_{M, \text{каж}}$  и  $k_{\text{кат,каж}}$  представлены в зависимости от объемной доли воды ( $\theta$ ) в системе  $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{ПАВ}] = 25$ ,  $[\text{ПАВ}] = 0,1 \div 0,8 \text{ M}$ . Условия эксперимента:  $26^\circ \text{C}$ ,  $[\text{E}]_0, \text{общ} = 5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ . Пунктиром показано значение  $K_{M, \text{каж}}$  для реакции в воде

Рис. 3. Зависимость константы скорости первого порядка ( $k_{\text{кат}}$ ) деацилирования N-транс-циннамил- $\alpha$ -химотрипсина (1), частоты вращения  $\nu$  (2) и константы сверхтонкого расщепления  $\alpha$  (3) спин-меченого  $\alpha$ -химотрипсина от отношения  $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{АОТ}]$  в системе АОТ (0,1 М) — октан — вода (0,05 М трис-буфер, pH 8,0) при  $25^\circ \text{C}$  [89]. В качестве спиновой метки использовали 2,2,5,5-тетраметил-4-иодаacetамидипирролидин-1-оксил. Пунктирной линией показаны значения  $k_{\text{кат}}$  и  $\alpha$  в водном растворе

пунктиром). В принципе благодаря этому можно достигать больших наблюдаемых скоростей реакции в системе обращенных мицелл, чем в водном растворе.

Данное явление, давно известное для органических (неферментативных) реакций в мицеллярных растворах [67, 68], связано с концентрированием реагентов в мицелле. В принципе концентрационный эффект влияет на все кинетические параметры, в размерность которых входит концентрация. С другой стороны, как видно из рис. 2, величина  $k_{\text{кат}}$ , имеющая размерность [ $\text{время}^{-1}$ ], не зависит от  $\theta$ , и следовательно, наблюдаемое значение  $k_{\text{кат}}$  равно истинной величине этой константы для реакции в водно-мицеллярной фазе (см. уравнение (12)). Именно поэтому на основании наблюдаемой величины  $k_{\text{кат,каж}}$  можно судить об истинной реакционной способности фермента, и следовательно, о его состоянии в мицелле.

## V. КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СОЛЮБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

**Влияние степени гидратации обращенных мицелл.** Один из наиболее ярких эффектов, наблюдавшихся при изучении ферментов в системах обращенных мицелл, — это зависимость каталитической активности со-

любилизованных ферментов от степени гидратации обращенных мицелл  $w_0$ , т. е. от параметра, определяющего размеры и свойства микросреды внутренней полости мицелл. Зависимость каталитической активности от  $w_0$  была обнаружена для таких ферментов как  $\alpha$ -химотрипсин [40, 52, 58, 87], трипсин [88], лизоцим [41], фосфолипаза A<sub>2</sub> [60], алкогольдегидрогеназа [52], пирофосфатаза [52, 57, 87], панкреатическая липаза [61]. Как правило, эта зависимость имеет колоколообразный вид, т. е. существует некоторое оптимальное значение  $w_0$ , при котором каталитическая активность солюбилизованного фермента максимальна. Оптимальные значения  $w_0$  отличаются для различных ферментов.

В качестве примера рассмотрим представленную на рис. 3 зависимость от степени гидратации константы скорости ( $k_{\text{кат}}$ ) деацетилирования N-транс-циннамоил- $\alpha$ -химотрипсина, солюбилизованного обращенными мицеллами АОТ в октане. Возможные причины возникновения максимума на зависимости  $k_{\text{кат}}$  от  $w_0$  подробно проанализированы в работе [58]. Здесь же обратим внимание на тот факт, что в условиях максимума значение  $k_{\text{кат}}$  превышает величину, наблюдаемую в водном растворе (показана на рис. 3 пунктиром). Это явление «суперактивности»  $\alpha$ -химотрипсина, солюбилизованного обращенными мицеллами АОТ, наблюдали также и другие авторы [40, 54]. Явление суперактивности отчасти обусловлено, по-видимому, эффектами микроокружения молекулы фермента в обращенной мицелле.

Действительно, как видно из рис. 3, фермент проявляет максимальную активность при умеренных степенях гидратации ПАВ, т. е. в условиях, когда микроокружение молекулы фермента внутри мицеллы существенно отличается от существующего в водном растворе. В частности, из рис. 3 следует, что величина константы сверхтонкого расщепления  $a$  сигнала ЭПР спиновой метки, введенной в активный центр  $\alpha$ -химотрипсина, в условиях оптимума каталитической активности меньше, чем в водном растворе [89]. Это означает, что полярность среды, в которой находится активный центр солюбилизованного фермента, существенно ниже полярности водного раствора [90].

С другой стороны, возникновение «суперактивности» может быть обусловлено также конформационными изменениями в молекуле фермента при ее включении в обращенную мицеллу. Так, в условиях оптимума каталитической активности наблюдается минимум на кривой зависимости от  $w_0$  частоты вращения  $\nu$  спиновой метки в активном центре  $\alpha$ -химотрипсина (рис. 3), т. е. минимум конформационной подвижности метки. Из спектров кругового дихроизма следует вывод [40] об увеличении жесткости (степени спиральности) молекулы  $\alpha$ -химотрипсина, солюбилизованной обращенными мицеллами АОТ в изооктане (в области  $w_0 \approx 10$ ). Повышенная конформационная жесткость молекулы фермента при  $w_0 \approx 10$  объясняется, по-видимому, тем, что в этих условиях диаметр внутренней полости пустой обращенной мицеллы АОТ [21] близок к размерам молекулы  $\alpha$ -химотрипсина ( $40 \times 40 \times 50 \text{ \AA}$  [91]).

Другой пример — каталитическая активность пероксидазы из хрена, солюбилизованной обращенными мицеллами АОТ в октане. Как видно из рис. 4, оптимальная величина  $k_{\text{кат}}$  значительно превосходит активность, проявляемую этим ферментом в водном растворе (пунктир). Более того, как видно из рис. 4, оптимальное значение  $k_{\text{кат}}$  возрастает с уменьшением концентрации ПАВ (с уменьшением поверхности раздела фаз) и в пределе достигает значений, в сотни раз превышающих каталитическую активность пероксидазы в водном растворе [59].

«Суперактивность» ферментов, солюбилизованных обращенными мицеллами, — явление пока достаточно редкое. В большинстве случаев каталитическая активность ферментов в оптимальных условиях близка к наблюдаемой в водном растворе (например, в случае алкогольдегидрогеназы из печени лошади [39, 53], трипсина [45] и пирофосфатазы [57, 87]). Этот факт находится в соответствии с данными спектральных исследований [37, 39, 44–46, 54–56, 88], согласно которым конформа-

ция молекул белков, солюбилизованных обращенными мицеллами, в основном обычно совпадает с наблюдавшейся в водном растворе.

Следует, однако, подчеркнуть, что взаимосвязь конформационных (по данным спектроскопии) и катализических характеристик ферментов не всегда однозначна. Например, каталитическая активность лизоцима, солюбилизованного обращенными мицеллами АОТ в изооктане, в оптимальных условиях приближается к наблюдавшейся в водном растворе, хотя конформация этого фермента по данным кругового диахромизма претерпевает существенные изменения при включении в обращенную мицеллу [41]. Спектральные характеристики другого фермента —

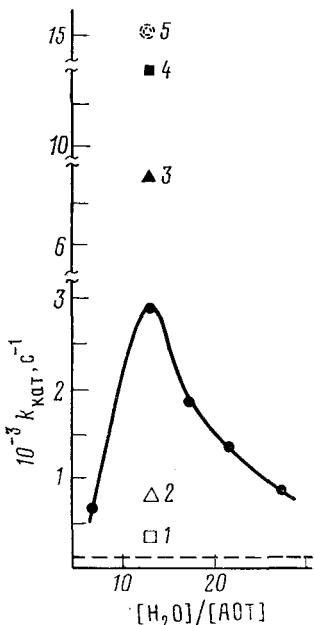


Рис. 4. Зависимость константы скорости первого порядка  $k_{cat}$  реакции окисления пирогаллола перекисью водорода, катализируемой пероксидазой, от степени гидратации ПАВ в системе АОТ ( $0,1 \text{ M}$ ) — октан — вода ( $0,025 \text{ M}$  фосфатный буфер,  $\text{pH } 7,0$ ) при  $26^\circ\text{C}$  [59]. При фиксированной степени гидратации ( $[H_2O]/[AOT] = 13$ ) приведены величины  $k_{cat}$ , измеренные при  $0,5$  (1);  $0,3$  (2) и  $0,03 \text{ M}$  АОТ (3);  $4 - 0,03 \text{ M}$  АОТ +  $+ 0,1 \text{ M}$  имидазол; 5 — значение  $k_{cat}$ , найденное экстраполяцией концентрации ПАВ к нулю. Пунктир — значение  $k_{cat}$  в водном растворе

пероксидазы из хрена — при солюбилизации обращенными мицеллами АОТ, напротив, практически не изменяются [46, 59], в то время как оптимальная каталитическая активность солюбилизованной пероксидазы значительно превосходит активность, проявляемую этим ферментом в водном растворе (рис. 4). Поэтому к интерпретации данных спектрального изучения солюбилизованных ферментов следует относиться с осторожностью.

**Влияние pH.** Скорости ферментативных реакций и описывающие их кинетические параметры в большинстве случаев зависят от pH (см., например, [1]). При перенесении ферментативной реакции из водного раствора в систему обращенных мицелл ПАВ были найдены [37, 40, 41, 45, 52, 54, 87] существенные сдвиги pH-профилей. Это явление обусловлено разными причинами. Во-первых, использование ионогенных ПАВ, образующих вокруг молекулы фермента заряженный (двойной электрический) слой, может приводить к локальному сдвигу pH (в зависимости от знака заряда ионных групп и степени гидратации молекулы ПАВ). Величина кажущегося сдвига pH (и соответственно эффективного значения  $pK$ ) в таком случае составляет обычно 1–2 единицы (см. выше раздел о микросреде внутренней полости обращенных мицелл). Во-вторых, кислотно-основные свойства ионогенных групп фермента, солюбилизованного в обращенных мицеллах, могут изменяться в зависимости от их микроокружения (например, при частичной дегидратации). Хорошо известно, что дегидратация ионных групп, происходящая при замене водного раствора на водно-органический или чисто органический, приводит к изменениям  $pK$  ионных соединений на величину до нескольких единиц [92]. Наконец, необходимо учесть возможность конформационного изменения фермента при солюбилизации, что

также может вызвать изменение наблюдаемых значений  $pK$  его ионогенных групп, в том числе функциональных групп, участвующих в ферментативной реакции.

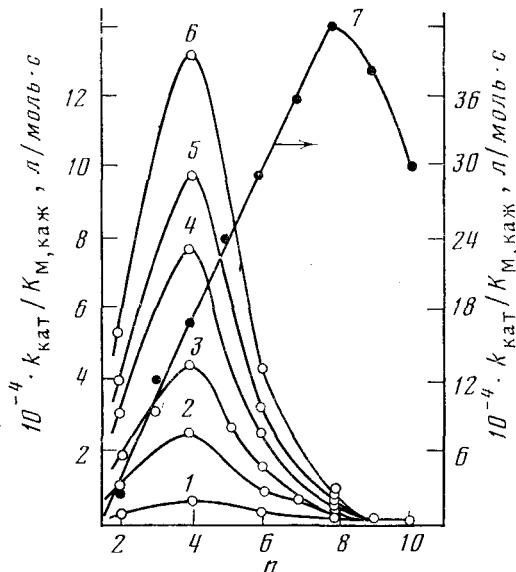
## VI. СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ СОЛЮБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

Изменение специфичности фермента в результате его солюбилизации может быть как истинным, т. е. связанным с изменением катализитических свойств самого фермента, так и кажущимся, т. е. обусловленным изменением наблюдаемой величины константы Михаэлиса, которая зависит, как это видно из уравнения (13), от распределения субстрата в системе обращенных мицелл (т. е. от локальной концентрации субстрата вокруг молекулы солюбилизованного фермента)..

Изменение истинной субстратной специфичности было установлено в случае панкреатической липазы, катализирующей реакцию гидролиза эфиров глицерина и жирных кислот [61]. А именно, если в водном растворе значение  $k_{\text{кат}}$  для гидролиза трибутирина в ~2 раза больше, чем для триолеина [93], то в системе обращенных мицелл АОТ в октане, наоборот, величина  $k_{\text{кат}}$  для триолеина превышает  $k_{\text{кат}}$  для трибутирина более чем в 15 раз [61]. Это означает, что переход от водного раствора к системе обращенных мицелл сопровождается существенным сдвигом истинной субстратной специфичности липазы в пользу высокомолекулярных субстратов.

Яркий пример изменения субстратной специфичности фермента, обусловленного эффектами распределения субстрата, дает реакция окисления алифатических спиртов, катализируемая алкогольдегидрогеназой из печени лошади в системе обращенных мицелл АОТ в октане [53]. Из рис. 5 видно, что переход от водного раствора к системе обращен-

Рис. 5. Зависимость константы скорости второго порядка ( $k_{\text{кат}}/K_M, \text{каж}$ ) реакции окисления алифатических спиртов, катализируемой алкогольдегидрогеназой из печени лошади, от длины углеводородной цепи  $n$  в молекуле спиртового субстрата [53]. Кривые 1—6 — система обращенных мицелл АОТ (0,1 M) — октан — вода (0,02 M фосфатный буфер, pH 8,8). Значения  $[H_2O]/[AOT]$ : 1 — 12,2; 2 — 23,0; 3 — 29,0; 4 — 37,7; 5 — 42,3; 6 — 48,9, 7 — водный раствор (0,02 M фосфатный буфер, pH 8,8); температура 25°C



ных мицелл сопровождается сдвигом максимума на кривой зависимости константы скорости второго порядка этой реакции  $k_{\text{кат}}/K_M, \text{каж}$  от длины углеводородной цепи в молекуле спиртового субстрата ( $n$ ); а именно, в воде оптимальный субстрат — октанол ( $n=8$ ), в то время как в коллоидном растворе воды в октане — бутанол ( $n=4$ ). Иными словами, субстратная специфичность алкогольдегидрогеназы, мерой которой как раз является величина  $k_{\text{кат}}/K_M, \text{каж}$  [94], резко изменяется при переходе от водного раствора к мицеллярному.

В то же время конформация активного центра алкогольдегидрогеназы при таком переходе практически не изменяется, на что указывают спектральные данные [39] и тот факт, что характер зависимости величины  $k_{\text{кат}}$  от  $n$  один и тот же в водном растворе и в системе обращен-

ных мицелл [53]. Наблюдаемое изменение субстратной специфичности обусловлено [53] изменением характера зависимости  $K_{M,\text{наж}}$  от  $n$ , связанным с эффектами распределения спиртового субстрата между мицеллярной и органической фазами.

## VII. РЕГУЛИРОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО РАВНОВЕСИЯ В СИСТЕМАХ ОБРАЩЕННЫХ МИЦЕЛЛ

Система гидратированных обращенных мицелл ПАВ в органическом растворителе при не слишком малом содержании воды представляет собой по сути двухфазную систему вода — органический растворитель, в которой, однако, водная фаза (благодаря присутствию ПАВ) «равномерно» распределена в объеме органического растворителя. Закономерности сдвига равновесия химических реакций (в том числе ферментативных), протекающих в двухфазных водно-органических системах в отсутствие ПАВ (т. е. в системах, в которых имеется макроскопическая поверхность раздела между фазами), изучены достаточно подробно [95—102]. При анализе подобных систем плодотворным оказался подход [95—100], учитывающий распределение реагентов между органической и водной фазами. В частности, для простейшей реакции  $A \rightleftharpoons B$ , протекающей в двухфазной системе, кинетическая схема имеет вид:



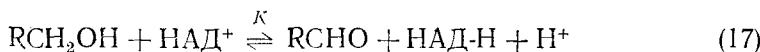
где  $K_B$  и  $K_{\text{опр}}$  — константы равновесия реакции (15) в воде и в органическом растворителе соответственно,  $P_A = [A]_{\text{опр}}/[A]_B$  и  $P_B = [B]_{\text{опр}}/[B]_B$  — коэффициенты распределения реагентов между фазами, а индексы « $B$ » и « $\text{опр}$ » относятся соответственно к водной и органической фазам. Выражение для эффективной константы равновесия реакции (15), разной отношению концентраций реагентов  $A$  и  $B$  в расчете на общий объем системы, т. е.  $K_{\text{эфф}} = [B]_{\text{общ}}/[A]_{\text{общ}}$ , можно записать [95—98] в следующем виде:

$$K_{\text{эфф}} = K_B (1 + \alpha P_B) / (1 + \alpha P_A) \quad (16)$$

где  $\alpha = V_{\text{опр}}/V_B$  — отношение объемов органической и водной фаз. В соответствии с уравнением (16), величина  $K_{\text{эфф}}$  с ростом  $\alpha$  монотонно изменяется от  $K_{\text{эфф}} = K_B$  при  $\alpha = 0$  до  $K_{\text{эфф}} = K_B P_B / P_A = K_{\text{опр}}$  при  $\alpha \rightarrow \infty$  (см., например, кривую 1 на рис. 6).

В более сложном случае бимолекулярной реакции  $A + B \rightleftharpoons C + D$ , протекающей в двухфазной системе, зависимость  $K_{\text{эфф}}$  от  $\alpha$  может иметь нетривиальный вид кривой с экстремумом [96—98]. Иными словами, в системе двух несмешивающихся растворителей эффективная константа равновесия может быть больше (или, соответственно, меньше) предельных значений, характеризующих равновесие в каждой из фаз.

При переходе от истинно двухфазной водно-органической системы к псевдодвухфазной системе гидратированных обращенных мицелл ПАВ в органическом растворителе можно в принципе ожидать появления эффектов, связанных со специфическим влиянием ПАВ на положение равновесия. Такого рода эффекты были обнаружены [103] на примере реакции окисления изобутанола до изобутиральдегида, катализируемой алкогольдегидрогеназой из печени лошади и протекающей в системе обращенных мицелл АОТ в октане:



Для реакции (17) была изучена pH-зависимая константа равновесия

$$K = \frac{[\text{RCHO}]_{\text{равн}} [\text{НАД-Н}]_{\text{равн}}}{[\text{RCH}_2\text{OH}]_{\text{равн}} [\text{НАД}^+]_{\text{равн}}} \quad (18)$$

Результаты представлены на рис. 6 в виде зависимостей величины  $\lg(K/K_b)$ , где  $K_b = 2,2 \cdot 10^{-3}$ , от отношения объемов органической и водной фаз  $V_{\text{орг}}/V_b$ .

В истинно двухфазной системе вода — октан (в отсутствие ПАВ) положение равновесия реакции (17) должно описываться уравнением, аналогичным (16), поскольку коферменты НАД<sup>+</sup> и НАД-Н в октане нерастворимы (коэффициенты распределения для них равны нулю) [96, 97]. Действительно, в этом случае зависимость  $\lg(K/K_b)$  от отношения объемов фаз  $V_{\text{орг}}/V_b$  в соответствии с уравнением (16) имеет вид кривой с насыщением (кривая 1 на рис. 6). Иными словами, по мере

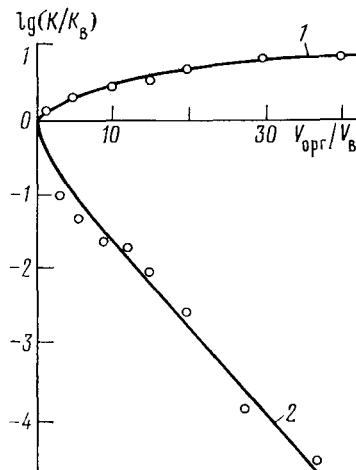


Рис. 6. Зависимость константы равновесия реакции (17) от отношения объемов органической и водной фаз [103]: 1 — двухфазная система вода ( $0,02 \text{ M}$  фосфатный буфер, pH 8,8) — октан, 2 — система обращенных мицелл АОТ — октан — вода ( $0,02 \text{ M}$  фосфатный буфер, pH 8,8) при исходной концентрации АОТ в октане  $0,7 \text{ M}$ ; температура  $20^\circ \text{C}$

уменьшения содержания воды в системе константа равновесия реакции (17) возрастает, т. е. происходит сдвиг равновесия вправо (в сторону альдегида). При переходе от двухфазной системы вода — октан к гомогенному (мицеллярному) раствору воды, солюбилизованной в октане с помощью АОТ, характер зависимости константы равновесия от  $V_{\text{орг}}/V_b$  резко изменяется (ср. кривые 1 и 2 на рис. 6 соответственно). А именно, увеличение содержания органического компонента (октана) в системе приводит в присутствии ПАВ к гораздо более существенному сдвигу равновесия, чем в отсутствие ПАВ, и вдобавок в обратную сторону (в сторону образования спирта).

Специфическое влияние АОТ на равновесие (17) обусловлено различиями в способности исходных веществ и продуктов реакции связываться на внутренней поверхности обращенных мицелл, образованной ионными группами молекул АОТ [103].

Важно подчеркнуть, что глубину превращения спирт — альдегид в мицеллярной системе можно регулировать обратимо, варьируя состав реакционной среды, например содержание воды [103]. При этом даже незначительное изменение содержания воды в системе (несколько десятых долей об. %) может приводить к существенному (на порядок и более) сдвигу константы равновесия (см. кривую 2 на рис. 6).

### VIII. МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Представление о том, что обращенные мицеллы — это весьма реалистичная модель биомембранных структур, неоднократно высказывалось в литературе [5, 104—106]. Недавно это предположение получило экспериментальное подтверждение в работах голландских [107—117] и английских [118, 119] исследователей. Было обнаружено, что бислойные мембранны часто содержат небислойные структуры, так называемые липидные частицы, отчетливо различимые на электронно-микроскопических снимках. Исследования показали, что эти частицы представляют собой ассоциаты липидных молекул, построенные по типу обращен-

ных мицелл и заключенные между монослоями бислойной мембраны (рис. 7, а).

Внутримембранные липидные частицы наряду с внутримембранными частицами другой природы (например, белковой) играют, по-видимому, важную роль в функционировании биологических мембран. Этот вывод основан на том факте, что мембранны, характеризующиеся высокой метаболической активностью (например, мембранны митохондрий, хлоропластов) содержат большое количество внутримембранных частиц, в то время как относительно инертные мембранны их совсем не

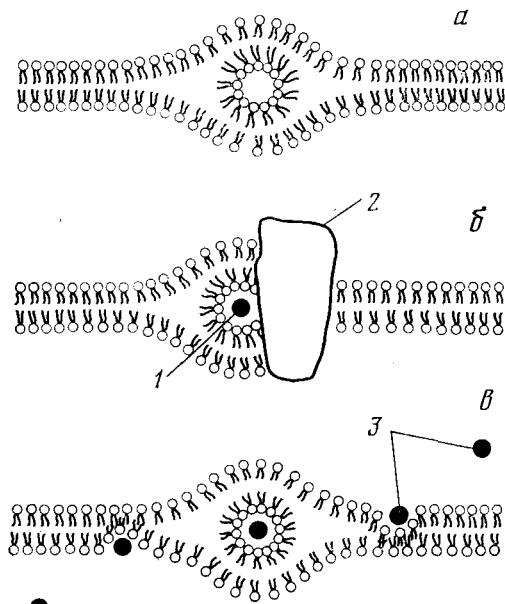


Рис. 7. Некоторые из возможных функций внутримембранных липидных частиц (а) в биологической мембране [107—122]: б — взаимодействие цитохрома с (1) с цитохромоксидазой (2), в — трансмембранный перенос молекулы белка (3)

содержат [117]. С участием липидных частиц и родственных им структур могут осуществляться такие важнейшие клеточные процессы, как слияние и компартментализация мембран [110—112, 120, 121], экзоцитоз [111], перенос липидов через мембранны по механизму «флип-флоп» [113, 114], трансмембранный перенос ионов [107, 111], осуществляющийся по механизму, сходному с показанным на рис. 7, в для белковых молекул.

Принципиально важное значение имеют данные [115, 116, 122], указывающие, что некоторые белки, например цитохром *c*, способны индуцировать образование обращенных мицелл в бислойной мембране, встраиваясь при этом во внутреннюю полость такой мицеллы. Возможно, что этот механизм играет существенную роль в процессе взаимодействия цитохрома *c* с мембранным ферментом цитохромоксидазой [116] (рис. 7, б) и при трансмембранных переносах белков [115, 116, 122] (рис. 7, в).

Перечисленные выше функции липидных частиц и родственных им структур легли в основу предложенной недавно новой метаморфной мозаичной модели биологических мембран [111].

Исследования, направленные на выяснение роли небислойных липидных частиц в мембранных процессах, только начались. Тем не менее уже первые их результаты показывают, насколько плодотворным может быть использование обращенных мицелл в качестве модели биомембранных структур. Мы полагаем [123], что мицеллярная энзимология вполне способна отразить реальную картину функционирования ферментов *in vivo* (особенно если для создания обращенных мицелл в органическом растворителе использовать природные липиды).

Так, ферментативная «суперактивность» [58, 59] в обращенных мицеллах по сравнению с активностью ферментов в водном растворе (см.

рис. 3, 4) указывает на то, что катализитический потенциал ферментов не всегда удается полностью раскрыть в классических экспериментах *in vitro*. По-видимому, наиболее существенные различия в катализитических активностях будут найдены для мембранных ферментов.

Результаты, полученные при исследовании субстратной специфичности панкреатической липазы и алкогольдегидрогеназы в системе обращенных мицелл АОТ в октане (см. рис. 5) дают основания ожидать существенных различий между субстратной специфичностью, которую фермент обнаруживает в живой клетке, и соответственно в водном растворе при опытах *in vitro*. Кроме того, возможно, что регуляторные эффекты, обнаруженные при изучении закономерностей равновесия ферментативной реакции в мицеллярной системе (рис. 6), имеют место в живой клетке, где содержание метаболитов могло бы регулироваться (при участии ферментов) путем изменения степени гидратации биологических мембран.

## IX. ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ МИЦЕЛЛЯРНОЙ ЭНЗИМОЛОГИИ

Наука о химических реакциях и их катализе ферментами в обращенных мицеллах в настоящее время находится в стадии становления, и широкий круг проблем в этой области еще ждет своего решения. Однако, уже накопленный экспериментальный материал свидетельствует об исключительной плодотворности этого направления, расширяющего и углубляющего фундаментальные знания о ферментах и биологических мембранах.

Мицеллярная энзимология открывает новые перспективы для использования биокатализа в химической практике. Так, мицеллярные системы должны найти широкое применение в **органическом синтезе**, в первую очередь для ферментативного превращения водонерастворимых соединений, таких как жиры, стероиды, нефтепродукты и т. п. Возможность ферментативного гидролиза жиров была показана на примере действия панкреатической липазы на триглицериды в системе «АОТ — вода — октан» [61], причем была отмечена более высокая катализическая активность солюбилизованного фермента по отношению к длинноцепочечному, менее растворимому в воде, субстрату. Яркий пример использования ферментов в обращенных мицеллах для целей органического синтеза дает работа голландских исследователей [124], в которой предложена относительно простая и эффективная система стереоспецифического восстановления стероидов. Эта работа, по-видимому, должна вызвать особый интерес у химиков-синтетиков, поскольку (благодаря системе регенерации кофакторов) в качестве восстанавливающего агента в ней использован обычный молекулярный водород.

В последние годы начали развиваться исследования по созданию систем конверсии энергии [2, гл. XII]. Предложен [125] процесс фотокимического получения водорода при участии фермента — гидрогеназы, солюбилизованной обращенными мицеллами в органическом растворителе.

Ферменты уже вошли в арсенал **аналитической химии** [2]. Здесь системы обращенных мицелл открывают новые возможности для использования ферментов с целью детекции водонерастворимых соединений. Это особенно важно для контроля загрязнения окружающей среды, которое часто вызывается гидрофобными по своей природе веществами, такими как пестициды и другие ядохимикаты, продукты неполного горения топлив, отходы химических производств и т. п. Использование ферментов в качестве аналитических реагентов может составить решение и более общей задачи — создания надежных тест-систем для испытания биологической активности различных соединений, как водорастворимых, так и водонерастворимых. Примеры таких аналитических систем для исследования водонерастворимых производных витамина В<sub>2</sub> удалось успешно реализовать на базе мицеллярных растворов оксидазы D-аминокислот и липоксигеназы [126].

Системы обращенных мицелл ПАВ в органических растворителях дополняют и расширяют методологию **химии белков** (ферментов). Они успешно применены для целей определения молекулярной массы и эффективного размера белковых глобул [127, 128], а также для тонкослойной хроматографии аминокислот [129]. Системы обращенных мицелл смогут служить универсальной средой для реакций **химической модификации белков** (ферментов). Оболочка из молекул ПАВ защищает белок от разворачивания (денатурации), а наличие водной и органической фаз позволяет вводить в реакцию как водорастворимые, так и водонерастворимые реагенты. Для придания водорастворимым белкам мембраноактивных свойств требуется ввести в их молекулу одну—две гидрофобные (якорные) группы: подобная процедура была успешно реализована обработкой водонерастворимым стеароилхлоридом  $\alpha$ -химотрипсина, солюбилизованного обращенными мицеллами АОТ в октане [130]. Аналогичным образом можно будет, по-видимому, решать и обратную задачу — путем химической модификации гидрофилизовать водонерастворимые мембранные ферменты.

Хотя мы намеренно подчеркиваем преимущества использования мицеллярных систем для проведения реакций с участием водонерастворимых реагентов, эти системы могут оказаться полезными и во многих других случаях, независимо от природы (растворимости) реагентов. С точки зрения **органического синтеза** важным свойством систем обращенных мицелл следует считать возможность регуляции положения равновесия катализируемой реакции, что должно позволить проводить такие реакции, равновесие которых в водном растворе сдвинуто в сторону исходных веществ, см. обзоры [2, 100–102]. Концентрационные эффекты и эффекты увеличения каталитической активности ферментов в обращенных мицеллах могут существенно повысить чувствительность **аналитических систем**. Действительно, было показано [131], что при переходе от традиционного водного раствора к системе Бридж 96-вода-октан чувствительность биолюминесцентного анализа АТФ увеличивается более чем на порядок. Кроме того, в мицеллярной системе наблюдается стабилизация уровня детектируемого сигнала, что позволяет существенно упростить всю процедуру анализа [131].

Современное состояние и перспективы практического использования биокатализа тесно связаны с развитием и совершенствованием методов стабилизации и иммобилизации ферментов [2]. Полимеризацией мицеллярной матрицы и/или компонентов внутренней полости обращенной мицеллы, построенной из реагентов с двойной связью, была осуществлена [132] «молекулярная иммобилизация». В результате были получены препараты белков с оболочкой заданной толщины вокруг каждой белковой молекулы.

Как видно, достижения и перспективы мицеллярной энзимологии свидетельствуют, что данное научное направление заслуживает новых усилий и исследований. И есть все основания полагать, что в ходе этих исследований будут вскрыты и развиты новые возможности применения мицеллярной энзимологии и в других направлениях, не отраженных в рассмотренном материале.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Березин И. В., Мартинек К. Основы физической химии ферментативного катализа. М.: Высшая школа, 1977.
2. Введение в прикладную энзимологию/Под ред. Березина И. В., Мартинека К. М.: Изд-во МГУ, 1982.
3. Мартинек К. В кн.: Успехи биоорганического катализа/Под ред. Березина, И. В., Мартинека К. М.: Изд-во МГУ, 1979, с. 105.
4. Fendler E. J., Chang S. A., Fendler J. H., Medary R. T., El-Seoud O. A., Woods V. A. In: Reaction Kinetics in Micelles/Ed. by E. M. Cordes. New York: Plenum Press, 1973, p. 127.
5. Мартинек К., Левашов А. В., Пантин В. И., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1978, т. 238, с. 626.
6. Fendler J. H., Fendler E. J. Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems. New York: Acad. Press, 1975.

7. Kondo H., Yoshinaga M., Sunamoto J. Chem. Letters, 1980, № 8, p. 973.
8. Seno M., Araki K., Shiraishi S. Bull. Chem. Soc. Japan, 1976, v. 49, p. 1901.
9. Конно К., Тосака М., Китахара А. J. Colloid Interface Sci., 1982, v. 86, p. 288.
10. Мартинек К., Семенов А. Н. Успехи химии, 1981, т. 50, с. 1376.
11. Мартинек К., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1977, т. 236, с. 920.
12. Eicke H. F. Top. Curr. Chem., 1980, v. 87, p. 85.
13. Hermann U., Schelly Z. A. J. Amer. Chem. Soc., 1979, v. 101, p. 2665.
14. Konno K., Kitahara A. J. Colloid Interface Sci., 1971, v. 35, p. 636.
15. Ford T. F., Kaufman S., Nichols O. D. J. Phys. Chem., 1966, v. 70, p. 3726.
16. Day A. A., Robinson B. H., Clarke J. H. R. J. Chem. Soc., Faraday Trans. I, 1979, p. 132.
17. Muller N. J. Phys. Chem., 1975, v. 79, p. 287.
18. Tsujii K., Sunamoto J., Nome F., Fendler J. H. Ibid., 1978, v. 82, p. 423.
19. Ekwall P., Mandell L., Fontell K. J. Colloid Interface Sci., 1970, v. 33, p. 215.
20. Correll G. D., Cheser R. N., Nome F., Fendler J. H. J. Amer. Chem. Soc., 1978, v. 100, p. 1254.
21. Eicke H. F., Rehak J. Helv. Chim. Acta, 1976, v. 59, p. 2883.
22. Zulauf M., Eicke H. F. J. Phys. Chem., 1979, v. 83, p. 480.
23. Ekwall P., Mandell L., Solyom P. J. Colloid Interface Sci., 1971, v. 35, p. 266.
24. Fendler J. H. Acc. Chem. Res., 1976, v. 9, p. 153.
25. Wong M., Thomas J. K., Grätzel M. J. Amer. Chem. Soc., 1976, v. 98, p. 2391.
26. Zinsli P. E. J. Phys. Chem., 1979, v. 83, p. 3223.
27. Lim Y. Y., Fendler J. H. J. Amer. Chem. Soc., 1978, v. 100, p. 7490.
28. Smith R. E., Luisi P. L. Helv. Chim. Acta, 1980, v. 63, p. 2302.
29. Левашов А. В., Пантин В. И., Мартинек К. Коллоидн. журн., 1979, т. 41, с. 453.
30. Menger F. M., Saito G. J. Amer. Chem. Soc., 1978, v. 100, p. 4376.
31. Kumar C., Balasubramanian D. J. Colloid Interface Sci., 1980, v. 74, p. 64.
32. Nome F., Chang S. A., Fendler J. H. J. Chem. Soc., Faraday Trans. I, 1976, p. 296.
33. Fuji H., Kawai T., Nishikawa H. Bull. Chem. Soc. Japan, 1979, v. 52, p. 2051.
34. O'Connor C. J., Fendler E. J., Fendler J. H. J. Amer. Chem. Soc., 1973, v. 95, p. 600.
35. Sunamoto J., Kondo H., Akimaru K. Chem. Letters, 1978, p. 821.
36. Kondo H., Fujiki K., Sunamoto J. J. Org. Chem., 1978, v. 43, p. 3584.
37. Wolf R., Luisi P. L. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1979, v. 89, p. 209.
38. Bonner E. J., Wolf R., Luisi P. L. J. Solid-Phase Biochem., 1980, v. 5, p. 255.
39. Meier P., Luisi P. L. Ibid., 1980, v. 5, p. 269.
40. Barbaric S., Luisi P. L. J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, p. 4239.
41. Grandi C., Smith R. E., Luisi P. L. J. Biol. Chem., 1981, v. 256, p. 837.
42. Pileni M. P. Chem. Phys. Letters, 1981, v. 81, p. 603.
43. Balasubramanian D. J. Indian Chem. Soc., 1981, v. 58, p. 633.
44. Visser A. J. W. G., Fendler J. H. J. Phys. Chem., 1982, v. 86, p. 947.
45. Douzou P., Keh E., Balny C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, v. 76, p. 68.
46. Balny C., Douzou P. Biochimie, 1979, v. 61, p. 445.
47. Becher P., Clifton N. K. J. Colloid Sci., 1959, v. 14, p. 519.
48. Corkill J. M., Goodman J. F., Walker T. Trans. Faraday Soc., 1965, v. 61, p. 589.
49. Keh E., Valeur B. J. Colloid Interface Sci., 1981, v. 79, p. 465.
50. Клячко Н. Л. Кинетические закономерности действия ферментов, солюбилизованных обращенными мицеллами поверхностью-активных веществ в органических растворителях: Дисс. ... канд. хим. наук. М.: МГУ им. М. В. Ломоносова, 1983, 198 с.
51. Жоли М. Физическая химия денатурации белков. М.: Мир, 1968.
52. Левашов А. В., Клячко Н. Л., Пантин В. И., Хмельницкий Ю. Л., Мартинек К. Биоорган. химия, 1980, т. 6, с. 929.
53. Мартинек К., Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1982, т. 263, с. 737.
54. Menger F. M., Yamada K. J. Amer. Chem. Soc., 1979, v. 101, p. 6731.
55. Luisi P. L., Henninger F., Yoppich M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1977, v. 74, p. 1384.
56. Luisi P. L., Bonner F. J., Pellegrini A., Wiget A., Wolf R. Helv. Chim. Acta, 1979, v. 62, p. 740.
57. Клячко Н. Л., Байков А. А., Левашов А. В., Мартинек К., Аваева С. М. Биоорган. химия, 1980, т. 6, с. 1707.
58. Левашов А. В., Клячко Н. Л., Мартинек К. Там же, 1981, т. 7, с. 670.
59. Мартинек К., Клячко Н. Л., Левашов А. В., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1983, т. 269, с. 491.
60. Misiorowski R. L., Wells M. A. Biochemistry, 1974, v. 13, p. 4921.
61. Малахова Э. А., Курганов Б. И., Левашов А. В., Березин И. В., Мартинек К. Докл. АН СССР, 1983, т. 270, с. 474.
62. Еремин А. Н., Метелица Д. И. Докл. АН СССР, 1982, т. 267, с. 221.
63. Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Черняк В. Я., Мартинек К. Биохимия, 1982, т. 47, с. 86.
64. Levashev A. V., Khmel'niitsky Yu. L., Klyachko N. L., Chernyak V. Ya., Martinek K. J. Colloid Interface Sci., 1982, v. 88, p. 444.
65. Kitahara A. Adv. Colloid Interface Sci., 1980, v. 12, p. 109.
66. Eicke H. F. Croat. Chem. Acta, 1979, v. 52, p. 105.
67. Мартинек К., Яцимирский А. К., Левашов А. В. В кн.: Мицеллообразование, солюбилизация и микрореумульсии/Под ред. Миттела К. М.: Мир, 1980, с. 224.

68. Березин И. В., Мартинек К., Яцимирский А. К. Успехи химии, 1973, т. 42, с. 1729.
69. Shinoda K. Proc. IV Int. Congress on Surface Active Substances. New York: Gordon and Breach, 1967, v. 2, p. 527.
70. Menger F. M., Donohue J. A., Williams R. F. J. Amer. Chem. Soc., 1973, v. 95, p. 286.
71. Robinson B. H., Steytler D. C., Tack R. D. J. Chem. Soc., Faraday Trans. I, 1979, p. 481.
72. Yamagishi A., Watanabe F. Chem. Letters, 1976, p. 143.
73. Atik S. S., Thomas J. K. J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, p. 3543.
74. Eicke H. F., Shepherd J. C., Steinemann A. J. Colloid Interface Sci., 1976, v. 56, p. 168.
75. El-Seoud O. A., Fendler E. J., Fendler J. H. J. Chem. Soc., Faraday Trans. I, 1970, p. 459.
76. Tamura K., Schelly Z. A. J. Amer. Chem. Soc., 1981, v. 103, p. 1018.
77. Yamagishi A., Masui T., Watanabe F. J. Phys. Chem., 1981, v. 85, p. 281.
78. Wong M., Thomas J. K. In: Micellization, Solubilization, Microemulsions/Ed. by K. Mittal. New York: Plenum Press, 1977, v. 2, p. 647.
79. O'Connor C. J., Fendler E. J., Fendler J. H. J. Chem. Soc., Dalton Trans., 1974, p. 625.
80. O'Connor C. J., Fendler E. J., Fendler J. H. J. Amer. Chem. Soc., 1974, v. 96, p. 370.
81. Fowkes F. M., Becher D. Z., Marmo M., Silebi C., Chao C. C. In: Micellization, Solubilization, Microemulsions/Ed. by K. Mittal. New York: Plenum Press, 1977, v. 2, p. 665.
82. Fendler E. J., Chang S. A., Fendler J. H. J. Chem. Soc., Perkin Trans. II, 1975, p. 482.
83. Пантин В. И., Левашов А. В., Мартинек К., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1979, т. 247, с. 1194.
84. Singer S. J. Adv. Protein Chem., 1962, v. 17, p. 1.
85. Martinek K., Berezin I. V. J. Solid-Phase Biochem., 1978, v. 2, p. 343.
86. Левашов А. В., Пантин В. И., Мартинек К., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1980, т. 252, с. 133.
87. Martinek K., Levashov A. V., Klyachko N. L., Pantin V. I., Berezin I. V. Biochim. Biophys. Acta, 1981, v. 657, p. 277.
88. Balny C., Hui Bon Hoa G., Douzou P. Jerusalem Symp. Quantum Chem. Biochem., 1979, v. 12, p. 37.
89. Лихтенштейн Г. И., Белоногова О. В., Левашов А. В., Хмельницкий Ю. Л., Клячко Н. Л., Мартинек К. Биохимия, 1983, т. 48, с. 379.
90. Лихтенштейн Г. И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. М.: Наука, 1974.
91. Blow D. M. In: The Enzymes. V. 3./Ed. by P. D. Boyer. New York: Acad. Press, 1971, p. 185.
92. Раухардт К. Растворители в органической химии. М.: Химия, 1973.
93. Брокерхоф Х., Джесенсен Р. Липополитические ферменты. М.: Мир, 1978, с. 70.
94. Фершт Э. Структура и механизм действия ферментов. М.: Мир, 1980, гл. 11.
95. Мартинек К., Семенов А. Н. Успехи химии, 1981, т. 50, с. 1376.
96. Семенов А. Н., Мартинек К., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1980, т. 252, с. 394.
97. Семенов А. Н., Мартинек К., Березин И. В. Биоорганическая химия, 1980, т. 6, с. 600.
98. Martinek K., Semenov A. N., Berezin I. V. Biochem. Biophys. Acta, 1981, v. 658, p. 76.
99. Martinek K., Semenov A. N. Ibid., 1981, v. 658, p. 89.
100. Martinek K., Semenov A. N. J. Appl. Biochem., 1981, v. 3, p. 93.
101. Antonini E., Carrea G., Cremonesi P. Enzyme Microb. Technol., 1981, v. 3, p. 291.
102. Lilly M. D. J. Chem. Tech. Biotechnol., 1982, v. 32, p. 162.
103. Мартинек К., Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Клячко Н. Л., Семенов А. Н., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1981, т. 256, с. 1423.
104. Elworthy P. H., Florence A. T., Macfarlane C. B. Solubilization by Surface Active Agents. London: Chapman and Hall, 1968.
105. Sunamoto J., Hamada T., Seto T., Yamamoto S. Bull. Chem. Soc. Japan, 1980, v. 53, p. 583.
106. Fendler J. H. J. Phys. Chem., 1980, v. 84, p. 1485.
107. Cullis P. R., de Kruijff B. Biochim. Biophys. Acta, 1978, v. 507, p. 207.
108. Verkleij A. J., Mombers C., Leunissen-Bijvelt J., Ververgaert P. H. J. Th. Nature, 1979, v. 279, p. 162.
109. De Kruijff B., Verkleij A. J., van Echteld C. J. A., Gerritsen W. J., Mombers C., Noordam P. C., de Gier J. Biochim. Biophys. Acta, 1979, v. 555, p. 200.
110. Verkleij A. J., Mombers C., Gerritsen W. J., Leunissen-Bijvelt J., Cullis P. R. Ibid., 1979, v. 555, p. 358.
111. Cullis P. R., de Kruijff B., Hope M. J., Nayar R., Schmid S. L. Canad. J. Biochem., 1980, v. 58, p. 1091.
112. Verkleij A. J., van Echteld C. J. A., Gerritsen W. J., Cullis P. R., de Kruijff B. Biochim. Biophys. Acta, 1980, v. 600, p. 620.
113. Gerritsen V. J., de Kruijff B., Verkleij A. J., de Gier J., van Deenen L. L. M. Biochim. Biophys. Acta, 1980, v. 598, p. 554.
114. Noordam P. C., van Echteld C. J. A., de Kruijff B., de Gier J. Ibid., 1981, v. 646, p. 483.
115. De Kruijff B., Cullis P. R. Ibid., 1980, v. 602, p. 477.
116. De Kruijff B., Verkleij A. J., van Echteld C. J. A. In: International Cell Biology

- 1980—1981/Ed. by H. G. Schweiger. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1981, p. 559.
117. Verkleij A. J., Ververgaert P. H. J. Th. Biochim. Biophys. Acta, 1978, v. 515, p. 303.
  118. Sen A., Williams W. P., Brain A. P. R., Dickens M. J., Quinn P. J. Nature, 1981, v. 293, p. 488.
  119. Sen A., Brain A. P. R., Quinn P. J., Williams W. P. Biochim. Biophys. Acta, 1982, v. 686, p. 215.
  120. Lau A. L. V., Chan S. I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1975, v. 76, p. 2170.
  121. Pinto da Silva P., Nogueira M. L. J. Cell Biol., 1977, v. 73, p. 161.
  122. Чупин В. В., Ушакова И. П., Бондаренко С. В., Василенко И. А., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П., Розенберг Г. Я., Кольцова Г. Н. Биоорган. химия, 1982, т. 8, с. 1275.
  123. Martinek K., Levashov A. V., Khmel'nitski Yu. L., Klyachko N. L., Berezin I. V. Science, 1982, v. 218, p. 889.
  124. Hiltorst R., Laane C., Veeger C. FEBS Letters, 1983, v. 159, p. 22.
  125. Hiltorst R., Laane C., Veeger C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, v. 79, p. 3927.
  126. Курганов Б. И., Березовский В. М., Малахова Э. А., Цетлин Л. Г., Сугробова Н. П., Глебова Г. Д., Ланкин В. З., Тихадзе А. К., Левашов А. В., Мартинек К. Тез. докл. симп. «Биохимия, фармакология и медицинское применение производных витаминов и других предшественников коферментов». Иркутск: Изд-во ИГМИ, 1983, с. 72.
  127. Левашов А. В., Хмельницкий Ю. Л., Клячко Н. Л., Черняк В. Я., Березин И. В., Мартинек К. Докл. АН СССР, 1981, т. 259, с. 485.
  128. Levashov A. V., Khmel'nitski Yu. L., Klyachko N. L., Cheryiaak V. Y., Martinek K. Anal. Biochem., 1981, v. 118, p. 42.
  129. Armstrong D. W., McNeely M. Anal. Lett., 1979, v. 12, p. 1285.
  130. Кабанов А. В., Левашов А. В., Мартинек К. Тез. докл. 16-й конференции ФЕБО, М.: Наука, 1984.
  131. Беляева Е. И., Бровко Л. Ю., Угарова Н. Н., Клячко Н. Л., Левашов А. В., Мартинек К., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1983, т. 273, с. 494.
  132. Абакумова Е. Г., Левашов А. В., Кабанов А. В., Мартинек К. Труды III Всесоюзной международной конференции по физико-химической биологии. Тбилиси: Изд-во Тбилисского университета, 1982, часть 1, с. 3.

Московский государственный  
университет им. М. В. Ломоносова,  
химический факультет.